

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**PAPEL DE JAK3 EN LA ACTIVACIÓN MEDIADA POR
RECEPTORES DE QUIMIOCINAS DURANTE PROCESOS DE
RESPUESTA INMUNE INNATA**

TESIS

**QUE PARA OTENER EL TÍTULO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
ANA CECILIA RIVAS CAICEDO**

**TUTOR RESPONSABLE:
DR. EDUARDO GARCÍA ZEPEDA**

MÉXICO D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedico especialmente este trabajo a mis Padres

Pedro Pablo Rivas y Cecilia Caicedo

Y a mis hermanas

Dalila, Adelina y Diana

AGRADECIMIENTOS

Se supone que en esta sección del trabajo debo agradecer a todas aquellas personas que me acompañaron y dejaron su huella durante el tiempo en el que realicé el doctorado en México. **Obviamente 7 años de agradecimientos no se pueden resumir.** He esperado muchos muchos años, todos estos años este momento, y ahora que ha llegado estoy aterrada por la rapidez con que ha venido a presentarse.

Así entonces, aquí y ahora agradezco...

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por el apoyo económico para realizar mis estudios.

A mi tutor, el Dr. Eduardo García: Por haber respondido a mi correo solicitando que me permitiera ingresar a su laboratorio, por haber ido personalmente a pelear a la DGEP con mis papeles bajo el brazo para que me dieran la beca, por dejar en mis manos sus reactivos, por confiar en mi.

A los miembros de mi comité tutorial: La Dra. Gloria Soldevila por compartirme sus ratones, por su tiempo (incluyendo algún sábado), su interés en mi trabajo y sobre todo por brindarme su conocimiento. El Dr. José Moreno por haber asistido puntual a todos mis tutorales, desde el cero, en el cual yo no sabía nada de Jak3 (SOCS) ni los LPS, hasta el 9.

A los miembros de mi Jurado de grado, El Dr. Carlos Rosales, Dr. Leopoldo Flores, Dra. Laura Bonifaz, Dra. Martha Robles y Dr. Juan Riego, por leer mi trabajo y por sus observaciones.

A las personas que me apoyaron en el bioterio, Gina, Gerardo, Fernando, Josefina, Rodolfo... por su disponibilidad y su paciencia.

Especialmente agradezco a mi familia. Papá y mamá. Gracias por su apoyo incondicional, por su preocupación con aquello de la tardanza en obtener el título, con aquello de que se hace tarde y no llego a casa...y estoy muy lejos... gracias por esperarme cada diciembre. Gracias por ser pacientes, confiar en mí y estar siempre seguros que tarde o temprano llegaría este momento. A mis hermanas les agradezco sus llamadas incondicionales y acertadas en momentos difíciles (cuando andaba en las Europas por ejemplo), en otros no tan difíciles y en otros muy buenos. A mi hermana Dalila le agradezco especialmente por haberme dado una casa cuando llegué al DF, por hacerme un espacio en su México, por sus consejos, sus sancochos, sus palabras de aliento, por comprar el mercado , por preocuparse tanto por mi, por alimentarme y en resumen, por compartir conmigo la vida en este país.

A Diana Ordoñez, muchas gracias por hacerme reír tanto, por estar siempre alegre. Gracias por superar conmigo el miedo al citómetro, por trasnochar juntas haciendo resúmenes. Por Francia y la Riviera Maya. Gracias por soportarme cuando estuve insostenible, por ser mi amiga, por haber decidido venir.

A Mayte le agradezco la paz que trajo a mi casa, a mi alma. Gracias por prepararme el desayuno y la comida tantas veces, fueron el alimento de mi corazón. Aunque ya no estés aquí en México, siempre serás parte crucial de mi México.

Gracias a Angelita Páramo, gracias por escucharme siempre a tiempo ya sea con copa en mano, o solo con el corazón abierto.

A Ruth por sus consejos sabios.

A Ana Rojas por apuntarse a mis planes, por divertirse siempre, por ser tan fresca.

A Nelly por sus consejos tan llenos de esperanza, por transmitir tanta tranquilidad.

A Gustavo Cogollo por darme de comer, por estar siempre disponible para cualquier plan. Por escucharme.

Agradezco a los miembros de mi laboratorio que me recibieron: Ana, Paco, Erika, Ileana, Julio; y del laboratorio de Gloria: Paula, Ramsés, Germán, Diana ... por haber soportado en aquel tiempo que el seminario se hiciera los sábados a las 9 de la mañana. Por todos sus aportes en los seminarios y por el tiempo en el que nos divertimos y acompañamos. A Marcela Ramírez, por sus enseñanzas.

A Miguel por haberme enseñado a vivir los colores de México, comenzando por el rosa.

Agradezco a toda la banda del Gato Macho, por traer un cachito de Colombia a Copilco. Armando, Martín, Carlos (pelicano), Ricardo, Ingrid, Giovany, Holber, Felix, Eduardo Peinado, Gustavo Forero... Gracias a todos y todas por compartir las bailadas con Carlos Vives, las experiencias, expectativas y la vida. Felicidades a los que ya son padres y madres, quién lo hubiera pensado?

A mi Chiqui, Isaac, gracias por ser tan paciente con mis indecisiones, por darme tu amor incondicional y sin límite de tiempo. Gracias por aprender esos nuevos pasos de baile para poder bailar conmigo; gracias por estudiar juntos, comer juntos, chismear juntos, viajar juntos y despertar juntos. Gracias por ser mi parce y al mismo tiempo pasear de la mano conmigo.

Y por último gracias a México, por ser un país tan soleado y seductor. Por su gente amable y sus lugares encantadores.

TABLA DE CONTENIDO

I. RESUMEN	7
II. ABSTRACT	8
III. INTRODUCCIÓN	9
IV. ANTECEDENTES	13
1. QUIMIOCINAS.....	13
1.1 Un poco de Historia.....	14
1.2 Clasificación.....	15
1.3 Nomenclatura.....	17
1.4 Estructura.....	17
1.5 Funciones de las Quimiocinas.....	20
1.5.1 Migración.....	21
1.6 Señalización a través de Receptores de Quimiocina.....	25
2. CINASAS DE JANUS (JAKs).....	32
2.1 Jak3.....	34
2.2 Vía de Señalización Jak/Stat.....	37
2.3 Señalización de Receptores de Quimiocina a través de la Vía Jak/Stat.....	38
3. CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	42
3.1 Precursores y Marcadores.....	44
3.2 Migración de Células Dendríticas.....	46
3.3 Células Dendríticas dentro de los Ganglios Linfáticos.....	52
3.4 Presentación de Antígeno por las Células Dendríticas.....	53
3.5 Maduración de Células Dendríticas.....	57
3.6 Otros Papeles de CCL19, CCL21 y su Receptor sobre las Células Dendríticas.....	58
3.7 Células Dendríticas y Jak3.....	59

V. JUSTIFICACIÓN.....	61
VI. HIPÓTESIS.....	63
VII. OBJETIVOS.....	64
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
IX. RESULTADOS.....	75
X. DISCUSIÓN.....	97
XI. CONCLUSIONES.....	108
XII. PERSPECTIVAS.....	109
XIII. GLOSARIO.....	110
XIV. BIBLIOGRAFÍA.....	111

I. RESUMEN

Las células dendríticas se encuentran localizadas prácticamente en todos los tejidos, incluyendo los sitios de entrada de antígeno como piel y mucosas. Estas células capturan estos antígenos, los procesan y migran hacia los ganglios linfáticos, donde llevan a cabo la presentación a los linfocitos T. Al contactar el antígeno, en la célula dendrítica se induce un proceso de maduración que consiste, entre otros aspectos, en el aumento de moléculas MHCII así como de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en la superficie celular. De la misma manera se induce el aumento en la expresión del receptor de quimiocina CCR7, cuyos ligandos, las quimiocinas CCL19 y CCL21, se encuentran en vasos y ganglios linfáticos. CCL19 y CCL21 atraen a las células dendríticas desde el lugar donde capturan hasta el lugar donde presentan el antígeno. Recientemente se ha observado que en ausencia de los ligandos para CCR7 se induce en las células dendríticas un fenotipo “parcialmente maduro”. Sin embargo los mecanismos involucrados en este proceso aún no se han descrito. Los receptores de quimiocinas están acoplados a proteína G heterotrimérica; además, algunos actúan a través de la vía Jak/Stat. Así, trabajos realizados en el laboratorio indican que la estimulación de timocitos con los ligandos CCR7 induce la fosforilación de la cinasa Jak3; además, los timocitos de ratones deficientes en Jak3 presentan una marcada inhibición en su proceso de migración hacia los ligandos de CCR7, CCL19 y CCL21.

En este trabajo analizamos la participación de CCR7 y Jak3 en los procesos de migración y maduración de células dendríticas. Utilizando células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones deficientes en Jak3 hemos encontrado que la migración *in vitro* e *in vivo* se encuentra inhibida en ausencia de esta tirosina cinasa. De la misma manera, la expresión de marcadores de maduración después del estímulo con LPS se ve afectada negativamente por la falta de Jak3. Estos resultados indican que la vía de señalización mediada por Jak3 tiene un papel importante en estos procesos.

II. ABSTRACT

Chemokines are important regulators of leukocyte migration. We are interested in the molecular mechanisms controlling chemokine mediated responses. In particular, we have investigated the role of the Jak/Stat pathway in chemokine receptor signalling. Recently, it was shown that CCR7 mediated signals are important for dendritic cell (DC) maturation and homing to the lymph nodes. We have previously shown that Jak 3 is involved in chemokine receptor signalling in murine thymocytes and bone marrow progenitors. Here we have used a Jak 3^{-/-} mouse model to investigate its role in CCR7 mediated DC migration and maturation. We have found that there are no differences in the generation of DCs from Jak 3^{-/-} bone marrow progenitors, when compared to wild type cells. However, phenotypic analysis of the bone marrow derived DCs obtained from Jak 3^{-/-} mice showed reduced expression of costimulatory molecules compared to wild type, suggesting that Jak 3 is required for DC maturation. In addition, when we analyzed the migration of Jak 3^{-/-} and wild type mature DCs in response to CCL19 and CCL21 *in vitro*, we found that the absence of Jak 3 results in an impaired chemotactic response towards these ligands. This decreased migration was not due to reduced levels of CCR7 expression on Jak 3^{-/-} DCs. To investigate the homing capacity of Jak 3^{-/-} DCs *in vivo*, we performed adoptive transfer assays using Jak 3^{-/-} GFP positive or Jak 3^{+/+} GFP positive donor cells into C57/BL6 recipients and showed that Jak3 was required for the entry of mature DCs into skin-draining lymph nodes. Finally, we performed DTH experiments to assess DC function and showed that Langerhans cells from Jak3^{-/-} mice were found in reduced numbers in the skin, after a second challenge in a sensitization contact assay, as compared with wild type mice. Therefore, our data provides strong evidence that Jak3 is important for dendritic cell maturation and migration through its involvement in CCR7-mediated signalling.

I. INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune innata se compone de barreras físicas, como la piel y las mucosas; y de células como los neutrófilos, macrófagos y Células Dendríticas (CDs) entre otras, que reconocen antígenos de manera “inespecífica” a través de Receptores de Reconocimiento de Patrón (PRR) como los Receptores Tipo Toll. Los antígenos reconocidos por los PRR son moléculas como el LPS, el dsRNA y el CpG no metilado, los cuales reciben el nombre de PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos). El reconocimiento de PAMPs conduce a la secreción de citocinas y quimiocinas, y a la activación de células que contribuyen a la eliminación del antígeno ^{1;2}.

Para inducir la respuesta inmune adaptativa, en la cual los antígenos son reconocidos por receptores específicos como el TCR y el BCR, el antígeno debe ser conducido hasta los ganglios linfáticos, lugar donde se encuentran los linfocitos T vírgenes; estas células deben ser activadas mediante la presentación de antígeno que es llevada a cabo por las CDs. Estas últimas son Células Presentadoras de Antígeno Profesionales (APC), que poseen la capacidad de ingresar a los ganglios linfáticos gracias a que expresan el receptor de quimiocinas CCR7, cuyos ligandos, las quimiocinas CCL19 y CCL21 se localizan en tejido linfoide ³.

En periferia, las CDs reciben el nombre de inmaduras. Estas células cuentan con una gran capacidad para capturar antígeno, pero no tienen capacidad presentadora; reconocen PAMPs como LPS y otros estímulos inflamatorios como TNF- α y CD40-ligando, que conducen al proceso de maduración de la célula dendrítica, el cual consiste en el aumento de moléculas coestimuladoras como CD80, CD40 y CD86 en la superficie celular. La maduración de células dendríticas les permite presentar el antígeno en un contexto que induce la activación de linfocitos T. Asimismo, las CDs aumentan la expresión del receptor de quimiocina CCR7, el cual les permite migrar

hacia los ganglios linfáticos siguiendo la interacción con sus ligandos, las quimiocinas CCL21 (en vasos linfáticos) y CCL19/CCL21 (en ganglios linfáticos) ⁴.

Las quimiocinas son proteínas de bajo peso molecular conocidas principalmente por su capacidad de inducir quimiotaxis celular tanto en procesos inflamatorios como homeostáticos. Son producidas por leucocitos, células endoteliales y epiteliales. Activan receptores de siete hélices transmembranales acoplados a una proteína G heterotrimérica (GPCRs), la cual se disocia al interaccionar el ligando (quimiocina) con su receptor, activando diversas vías de señalización que inducen la activación de MAPK, aumento en el flujo de calcio y rearrreglo del citoesqueleto, promoviendo la migración de la célula ^{5,6}. Recientemente se ha visto que algunos receptores de quimiocinas pueden activar la vía Jak/STAT ⁷. Esta vía de señalización se activa normalmente con receptores que no poseen actividad enzimática, pero que se encuentran estrechamente asociados a cinasas de tirosina, en este caso las Jaks. En la vía Jak/Stat, la unión del ligando con su receptor, induce la dimerización de éste último; las Cinasas de Janus (Jak) que se encuentran asociadas al receptor se fosforilan y transfosforilan al receptor en un residuo de tirosina, lo cual permite el reclutamiento de las proteínas STAT (Signal Transducer and Activators of Transcription), su consecuente fosforilación, dimerización y translocación al núcleo para unirse a secuencias específicas de DNA promoviendo la transcripción de diversos genes ⁸. La dimerización del receptor es necesaria para la activación de la vía Jak/STAT. En este sentido, se ha observado que las quimiocinas pueden inducir dimerización de sus receptores y que este proceso es necesario para la activación de la vía Jak/STAT mediada por quimiocinas. Entre los receptores de quimiocinas que señalizan a través de la vía JAK/STAT están CCR2, CCR9, CCR5, CXCR4 y CCR7. CCR7 se expresa en linfocitos B, LT vírgenes y células dendríticas maduras; se encuentra implicado en el “homing” de éstos tipos celulares hacia órganos

linfoides. Así por ejemplo, las células dendríticas del ratón deficiente en CCR7 presentan una migración muy reducida hacia ganglios linfáticos ⁹. Sin embargo, la importancia del estímulo a través de CCR7 inducido por CCL19 y CCL21 sobre células dendríticas no se debe únicamente a su efecto quimioatrayente hacia el sitio de presentación de antígeno ¹⁰.

En trabajos realizados en nuestro laboratorio en células de médula ósea, timocitos y células de ganglios linfáticos, se ha observado que Jak3 se encuentra involucrado en la señalización a través de CCR7. Jak3 es uno de los cuatro miembros de la familia de cinasas de tirosinas de Janus. Es expresada principalmente por células de origen hematopoyético y se asocia con receptores de citocinas que poseen la cadena γ común (γc) cuyos ligandos son IL-2, 5, 7, 9 y 15 ¹¹. Esta cinasa ha sido ampliamente estudiada debido a que su carencia produce falla en el desarrollo de linfocitos T causada entre otros aspectos, por la falta de señalización inducida por IL7.

La maduración de células dendríticas puede ser inducida tanto *in vivo* como *in vitro* por estímulos como LPS, TNF- α y CD40-L. CD40-L se une a CD40 activando Jak3/STAT5a. De esta manera, se ha reportado que células dendríticas que han sido maduras con CD40L expresan menor cantidad de marcadores de maduración cuando han sido tratadas con un inhibidor de Jak3 ¹².

La evidencia de que Jak3 es importante para la señalización de CCR7 en linfocitos T y timocitos y siendo este receptor importante tanto para la maduración como para la migración de células dendríticas, nos llevó a enfocarnos en este trabajo en elucidar el papel de Jak3 en estos dos procesos en células dendríticas.

IV. ANTECEDENTES

1. QUIMIOCINAS

Las quimiocinas son citocinas de bajo peso molecular (8-14Kda) producidas tanto por leucocitos como por células endoteliales, epiteliales y fibroblastos. Se caracterizan por poseer cuatro cisteínas conservadas en el extremo N-terminal; la primera unida por un puente disulfuro a la tercera y la segunda a la cuarta. Hasta el momento se han identificado cerca de 50 quimiocinas y 20 receptores. Estas proteínas se clasifican en cuatro familias denominadas CC (quimiocinas β), CXC (quimiocinas α), XC y CX3C, donde X representa los aminoácidos en medio de las primeras dos cisteínas. Por otra parte, la familia CXC se divide en dos grupos dependiendo de la presencia del motivo ELR (Glu-Leu-Arg) antecediendo a la primera cisteína. Este dominio es crítico para la activación de las quimiocinas que lo poseen^{13 5}. La función principal y más conocida de las quimiocinas es dirigir la migración celular tanto en procesos de inflamación como en homeostasis; sin embargo, la señalización inducida por estas proteínas resulta también en procesos como angiogénesis, angiostasis, degranulación de leucocitos, diferenciación celular y maduración de células dendríticas^{14 15 16}. Las quimiocinas también se encuentran implicadas en varias enfermedades inflamatorias como asma, artritis reumatoide y aterosclerosis entre otras. Sumado a esto, desempeñan un papel importante en la metástasis de cáncer y la entrada de VIH a linfocitos a través de los receptores para quimiocinas CXCR4 y CCR5^{17 6}. Por esta razón, su estudio ha cobrado importancia enfocándose en la búsqueda de agonistas o antagonistas que permitan controlar la función biológica de las quimiocinas. Sin embargo, la redundancia que presentan estas moléculas funcionalmente, dificulta encontrar agonistas/antagonistas que bloqueen o promuevan una respuesta específica.

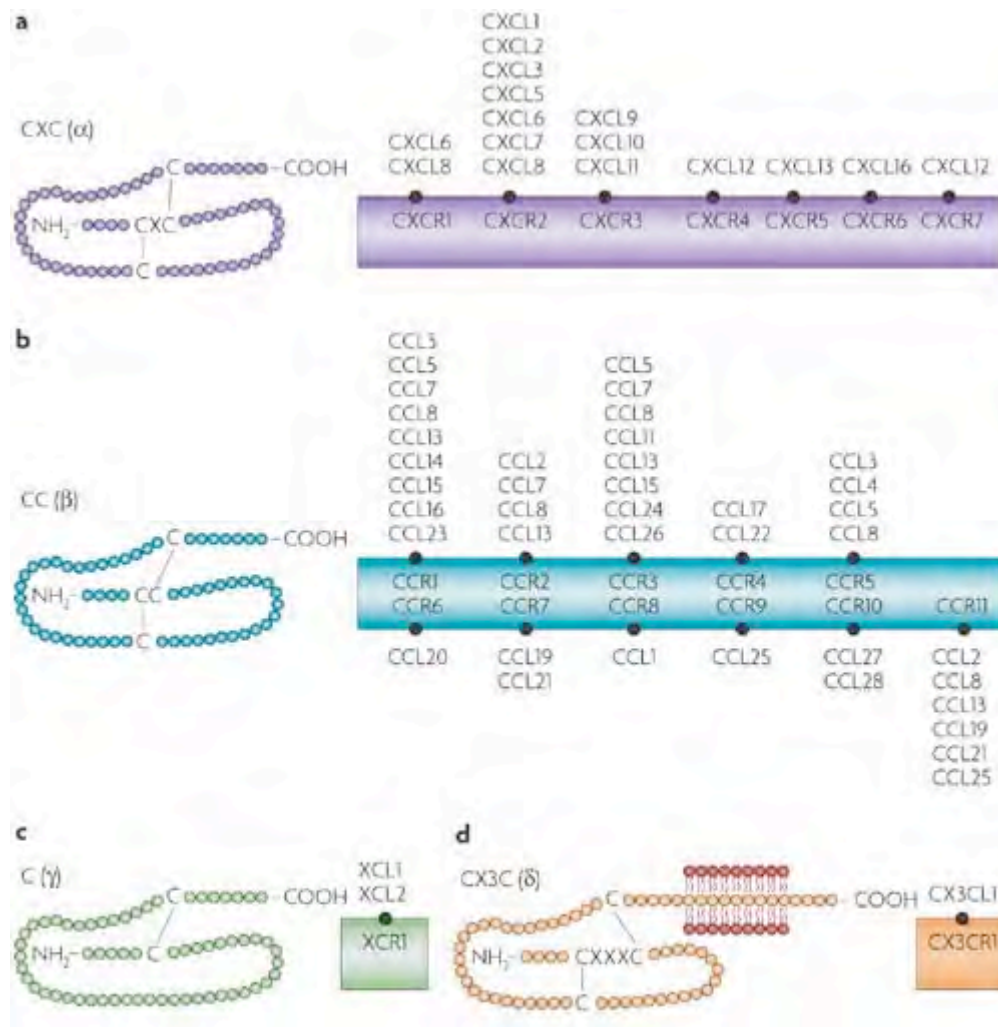
In vivo, las quimiocinas se unen a glicosaminoglicanos de heparán sulfato en la superficie de células endoteliales para generar gradientes de concentración que los leucocitos perciben a medida que los receptores que se encuentran en su superficie se unen a sus respectivos ligandos. En una serie de pasos que incluyen el rodamiento, la adhesión firme y la transmigración, que se resumen en el denominado “modelo de múltiples pasos”, las células pasan del torrente sanguíneo al interior de ganglios linfáticos, órganos o tejidos tanto en inflamación como en homeostasis ¹⁸.

1.1 Un Poco de historia

A pesar de que fue CXCL8 (IL8) la primera quimiocina que se describió en 1987, desde hacía algunos años atrás, a principios de los setenta, se tenía indicios de que moléculas que se encontraban en sobrenadantes de células mononucleares activadas de sangre, ejercían función quimioatrayente para monocitos y neutrófilos. Después fueron identificados otros factores como el TDCF (Tumor-derived chemotactic factor), que ahora se denomina CCL2, y el SMDFC (Smooth muscle derived cell factor) los cuales inducían migración para monocitos y células mononucleares respectivamente. IL8 fue descubierta a raíz de experimentos realizados con la citocina IL1 purificada, la cual no era capaz de inducir ni activación ni reclutamiento de neutrófilos, propiedades que se le habían atribuido anteriormente a esta molécula. Esto condujo a pensar que estas actividades biológicas eran consecuencia de factores contaminantes. Sumado a esto se descubrió que IL1 y TNF- α eran capaces de inducir la expresión de otras citocinas, lo cual llevó a la búsqueda e identificación del factor activador de neutrófilos, denominado CXCL8. La quimiocina CCL2 (Monocyte chemotactic protein 1) fue descrita en 1989 por varios grupos al ser aislada de sobrenadantes de un glioma humano, una línea celular mielomonocítica y una de fibrosarcoma ^{19 20}.

Los receptores para CXCL8 fueron clonados en 1991, y el hecho de que su activación biológica en neutrófilos fuera bloqueada con toxina pertusis indicaba que la señalización inducida a través de receptores de quimiocinas era similar a la atribuida a otros factores quimioatrayentes como los péptidos formilados (FMLP), los cuales inducen respuesta biológica a través de receptores de siete hélices transmembranales que se encuentran acoplados a proteína G α i^{21 22 23}.

1.2 Clasificación: A pesar de que las quimiocinas tienen una baja similitud en cuanto a secuencia de aminoácidos, su estructura terciaria es muy semejante^{24 5}. Las dos principales familias son la CXC a la cual pertenecen quimiocinas que poseen un solo aminoácido entre las primeras dos cisteínas y la CC cuyos miembros no poseen aminoácidos entre las primeras dos cisteínas. Estas familias cuentan con aproximadamente 15 y 26 miembros respectivamente (algunos ligandos solo existen en ratón como CCL12 y CCL9/10). La familia XC, cuyos miembros poseen un solo par de cisteínas, se compone de dos miembros, XCL1 (linfotactina) y XCL2 (SCM-1b). Linfotactina ejerce actividad quimiotáctica sobre linfocitos pero no sobre monocitos o neutrófilos²⁵. La familia CX3C tiene como único miembro a CX3CL1 (Fractalcina), la cual se expresa principalmente en sistema nervioso central. Ésta se puede encontrar tanto unida a la membrana como de forma soluble. En su forma soluble tiene actividad quimiotáctica, mientras que unida a la membrana funciona como molécula de adhesión entre las células que la expresan y aquellas que poseen el receptor (Figura 1)^{26;27}.



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 1. Clasificación estructural de las quimiocinas. Estas proteínas se clasifican en cuatro familias dependiendo de la posición de los residuos de cisteína de la región N-terminal. Entre estos residuos podemos encontrar o no aminoácidos. En esta figura, junto a cada familia encontramos los ligandos que pertenecen a dicha familia y sus respectivos receptores. C: Cisteína. X: Aminoácidos. (Tomado de Rostène, 2007)

1.3 Nomenclatura: Anteriormente, las quimiocinas eran agrupadas en homeostáticas e inflamatorias. En el primer grupo se encontraban aquellas quimiocinas que se secretan “constitutivamente” y que participan en procesos como hematopoyesis en médula ósea y timo, y aquellas que tienen un papel en la iniciación de la respuesta inmune en bazo,

	RECEPTOR	LIGANDO(S) (Nomenclatura Actual)	LIGANDO(S) (Nomenclatura anterior)
CXC	CXCR1	CXCL8, CXCL6	IL8, GCP-2
	CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5	IL8, GCP2, Gro α , Gro β , Gro γ , ENA-78
	CXCR3	CXCL9, CXCL10, CXCL11	MIG, IP10, I-TAC

ganglios linfáticos y placas de peyer. En el segundo grupo, como su nombre lo indica se ubicaba a aquellas quimiocinas que se secretan tras estímulos inflamatorios, infección, daño en tejidos y en tumores ¹³. De la misma manera, anteriormente las quimiocinas eran denominadas dependiendo de su localización, o de las células que atraen y/o secretan; así por ejemplo encontramos a las quimiocinas MIP (Macrophage inflammatory proteins) o las MCP (Monocyte chemotactic proteins). En la actualidad estos nombres se siguen siendo utilizados por algunos investigadores; sin embargo, debido al gran número de miembros con que cuenta esta familia, fue necesario realizar un consenso y emplear una nomenclatura sistemática. Por esta razón, a partir del año 2000 las quimiocinas se denominan dependiendo a qué familia pertenecen (de la misma manera se nombra a los receptores) seguidas por un número (tabla 1) ²⁸

1.4 Estructura: Las quimiocinas poseen de 67 a 127 aminoácidos. La identidad de sus secuencias varía de menos del 20% a más del 90%. Sumado a esto, existen modificaciones postranscripcionales llevadas a cabo por diversas proteasas que ejercen actividad enzimática en la región amino terminal de las quimiocinas dando como resultado proteínas NH₂-truncadas. Estos productos difieren de la proteína completa y por lo tanto varían en su capacidad para unirse y activar a sus receptores. Entre estas proteasas encontramos a CD26, una enzima unida a membrana presente en células hematopoyéticas estimuladas que corta en la posición 2 de la región N-terminal de varias quimiocinas²⁹. Las metaloproteasas de

	CXCR4	CXCL4	SDF-1/PBSF
	CXCR5	CCL13	BCL/BCA-1

	CXCR6		
CC	CCR1	CCL3, CCL4, CCL5, CCL14, CCL15, CCL16	MIP1 α , MIP1 β , RANTES, HCC-1,2,3 Y 4
	CCR2	CCL2, CCL8, CCL7, CCL13	MCP1, MCP2, MCP3, MCP4
	CCR3	CCL11, CCL24, CCL7	Eotaxin-1, eotaxin-2, MCP3
	CCR4	CCL17, CCL22, CCL3, CCL5	TARC, MDC, MIP-1 α , RANTES
	CCR5	CCL3, CCL4, CCL5	MIP-1 α , MIP-1 β , Rantes
	CCR6	CCL20	MIP- α /LARC/Exodus-1
	CCR7	CCL19, CCL21	MIP-3 β /ELC, 6CKine/SLC, exodus-2
	CCR8	CCL1	I-309
	CCR9	CCL25	TECK
	CCR10		
	CCR11		
XC	XCR1	XCL1, XCL2	Linfotactina, SCM-1 β
CX3C	CX3CR1	CX3CL1	Fractalcina

Tabla 1. Clasificación de las quimiocinas en cuatro familias; su nomenclatura actual y su nomenclatura anterior.

matriz (MMPs) que han sido involucradas en la degradación de las quimiocinas MCPs (CCL2, 7, 8, 11 y 13) y CXCL12. Estas son producidas por leucocitos y células de estroma durante procesos inflamatorios y sus productos de degradación conservan la capacidad para unirse al receptor; Así, en el caso de CCL7, CCL8 y CCL13, los productos resultado del procesamiento enzimático funcionan como antagonistas de la migración. Fractalcina (CX3CL1) también puede ser degradada por MMPs, específicamente por MMP-2 en un mecanismo que la libera de la membrana celular ³⁰. Asimismo, una enzima, la Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α) convertidora, es capaz de liberar a fractalcina de la membrana celular. Existen también microorganismos capaces de inducir la degradación de quimiocinas a través de la generación de proteasas, y modular así la respuesta quimiotáctica de leucocitos. Por ejemplo, la proteasa de

cisteína de *Entamoeba histolytica*, EhCP2 que corta las quimiocinas CCL2, CCL13 y CXCL8, disminuye la capacidad de estas quimiocinas para inducir migración en monocitos y granulocitos ³¹.

Sólo 2 de las quimiocinas, la CXCL16 y la CX3CL1, se encuentran unidas a membrana. Seguido a su dominio NH₂-terminal se encuentra un dominio parecido a mucina de aproximadamente 110 aminoácidos rico en serina y treonina, luego se encuentra el dominio transmembranal y por último la cola citoplásmica ⁵. El resto de quimiocinas se une a glicosaminoglicanos de heparán sulfato (GAGs) en la superficie de células endoteliales y en matriz extracelular, lo cual es necesario para generar el gradiente de quimiocinas. Es más, para la oligomerización de ciertas quimiocinas *in vivo*, lo cual constituye la estructura cuaternaria de estas proteínas, es necesaria la interacción con GAGs. Así, mutantes de CCL2, CCL4 y CCL5 que son incapaces de unirse a GAGs, retienen la capacidad de activar al receptor *in vitro*, pero pierden la facultad para reclutar células al peritoneo ³².

Los primeros estudios de estructura y avidéz de las quimiocinas condujeron a la identificación en CXCL8 de la secuencia Glu-Leu-Arg, conocida como motivo ELR, el cual es importante para las quimiocinas que unen CXCR1 y CXCR2 ³³. Las quimiocinas poseen una estructura terciaria conservada con un dominio N-terminal de 6-10 aminoácidos, el cual es clave en la señalización inducida por estas proteínas. Esta región es seguida por el loop N, que contiene determinantes importantes para la unión al receptor. Las láminas β que siguen a estos dominios se encuentran antiparalelas formando un plato de láminas interconectadas mediante asas, seguidas de una hélice alfa en el extremo carboxilo-terminal. La estructura de las quimiocinas es estabilizada por puentes disulfuro en el extremo amino ⁵.

1.5 Funciones

Las funciones de las quimiocinas dependen de la interacción de un receptor y su ligando, aunque se da la posibilidad de que un receptor puede unir a varias de estas moléculas y a la vez una quimiocina puede unirse a diferentes receptores (Tabla1). CXCL8 (IL8) por ejemplo, se puede unir con alta afinidad a los receptores CXCR1 y CXCR2 (los cuales poseen una alta homología y activan la misma proteína G) pero induce respuestas diferenciales en la vía de señalización dependiendo del receptor al que se una. Aunque mediante ambos receptores CXCL8 induce la activación de proteínas G α i, movilización de calcio intracelular y quimiotaxis, solo CXCR1, que es exclusivo para IL8, induce la activación de fosfolipasa D y la formación de superóxido por la oxidasa NADPH^{34 35}.

La función más conocida de las quimiocinas es la inducción de migración de leucocitos ya sea hacia sitios de inflamación o hacia sitios donde las células deben localizarse en estados de homeostasis. También están involucradas en la organogénesis, angiogénesis y angiostásis; metástasis, supervivencia y maduración de células dendríticas; así como en la regulación del tráfico linfocitario, el desarrollo de los linfocitos T, linfocitos B y la compartimentación de los órganos linfoides.

Las quimiocinas actúan en conjunto con moléculas de adhesión para inducir la extravasación de leucocitos desde sangre hacia ganglios linfáticos. También inducen la migración direccional y el posicionamiento de leucocitos tanto en ganglios linfáticos como en tejidos y órganos, para lo cual se generan gradientes de quimiocinas que las células pueden ir censando en la superficie de células endoteliales.

1.5.1 Migración: Las quimiocinas dirigen la localización y retención de los leucocitos en la hematopoyesis y en la organogénesis. Participan también reclutando a

las células hacia diferentes tejidos durante los procesos de inflamación y en homeostasis; y hacia órganos linfoides promoviendo la organización dentro de éstos. Los leucocitos que se encuentran migrando en el flujo sanguíneo pueden ser retenidos sobre el endotelio vascular por acción de diversas moléculas de adhesión y realizar extravasación. Se ha estimado que uno de cada cuatro linfocitos transmigra a través de las vénulas de endotelio alto (HEVs) hacia ganglios linfáticos (LN) y que la mayoría de linfocitos que entran a ganglios no encuentran antígeno y retornan a circulación en cuestión de horas o días ³⁶.

Los leucocitos entran a microcirculación a una velocidad de 5 mm s^{-1} por medio de las arteriolas, las cuales cuentan con un diámetro de 15 a 100 μm . Pasan luego por vasos capilares, que con un diámetro promedio similar al de los leucocitos (5-10 μm) inducen que los glóbulos rojos, los cuales tienen un diámetro mucho menor, se apilen alrededor (por encima y debajo) de los leucocitos. Finalmente las células llegan a las vénulas postcapilares (que en el caso de ganglios linfáticos se denominan vénulas de endotelio alto, HEVs), que con un diámetro de 10 a 100 μm , permiten que el flujo sanguíneo se mueva a una velocidad de 3 mm s^{-1} y una fuerza de 1 a 50 dinas cm^{-2} . Estas condiciones del flujo sanguíneo son necesarias para el funcionamiento de las moléculas de adhesión. De esta manera, las células no se adhieren al endotelio si el flujo se detiene. Sumado a esto, en las HEVs, el movimiento de los eritrocitos colabora en la marginación de los leucocitos hacia el endotelio “forzando” su encuentro con las moléculas de adhesión ³⁷

^{38 23}.

En los ganglios linfáticos, los vasos post-capilares se denominan HEVs debido a que tienen una estructura singular. Estas vénulas poseen una envoltura perivascular seguida de una espesa lámina basal y una capa de células endoteliales con morfología cúbica. Las HEVs se encuentran en las áreas de células T y alrededor de los folículos B de los

LN³⁶. A través de estas vénulas realizan trans migración los linfocitos y las células dendríticas plasmacitoides, el resto de leucocitos es excluido a pesar de expresar las moléculas de adhesión adecuadas para retenerse y trans migrar, lo que ha llevado a pensar que la exclusividad que tienen los linfocitos para llevar a cabo este proceso está dada por quimiocinas. En el proceso de trans migración los leucocitos son retenidos sobre el endotelio vascular, luego se adhieren firmemente a éste y finalmente trans migran. Esta serie de pasos se ha denominado “modelo de múltiples pasos”, el cual se ha estudiado ampliamente en ganglios linfáticos y placas de peyer (Figura 2)³⁹. Las moléculas involucradas en este proceso son las selectinas y sus ligandos, las quimiocinas, las integrinas, y proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Las primeras moléculas que actúan son las selectinas, una familia conformada por tres glicoproteínas: L, P y E-selectina. La L-selectina se expresa en todos los leucocitos circulantes exceptuando a los linfocitos T de memoria periférica. La P-selectina es almacenada en los cuerpos de Weibel-Palade (que también contienen quimiocinas⁴⁰) y en gránulos α de células endoteliales y plaquetas. Estos cuerpos se exponen en la superficie de la membrana celular bajo estímulos de inflamación aguda como histamina o trombina, para unir principalmente monocitos y neutrófilos. El hecho de que la P-selectina se encuentre almacenada proporciona la ventaja de que no necesita ser sintetizada de novo. La E-selectina se sintetiza de novo en células endoteliales bajo estímulos como TNF α e IL-1. Los ligandos de estas moléculas de adhesión se expresan en leucocitos (PSGL-1) y endotelio vascular (ácido siálico antígeno Lewis). Las selectinas se asocian y disocian con sus ligandos rápidamente en cuestión de segundos sin generar señales de activación sobre las células. A pesar de que este proceso es eficiente para frenar a las células debido a que el rompimiento de una interacción laxa permite la formación de una nueva, no promueve su adhesión firme al endotelio

vascular. Además, el flujo sanguíneo sigue ejerciendo presión sobre los leucocitos promoviendo que continúen fluyendo en el torrente sanguíneo aunque con menor velocidad. Esta constante asociación y disociación de leucocitos con el endotelio recibe el nombre de “rodamiento”^{9;38}. La adhesión firme de los leucocitos al endotelio está mediada por la interacción de las integrinas con sus ligandos, los cuales pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Las integrinas son proteínas que forman heterodímeros constituidos por una cadena α y una cadena β unidas por enlaces no covalentes. Son importantes tanto en la interacción de células con la matriz extracelular como en el contacto célula-célula. Para que las integrinas induzcan arresto de los leucocitos deben recibir la denominada señal “de adentro hacia afuera” (Inside-out) que es proporcionada por medio de la activación de receptores de quimiocinas, los cuales al ser activados, inician señales intracelulares que promoverán el aumento de la afinidad de las integrinas por sus ligandos^{41 42}. La inmovilización de quimiocinas sobre la matriz extracelular y sobre el endotelio vascular es importante para la detención y el arresto de linfocitos *in vivo*¹⁴. Las quimiocinas, tienen un importante papel en la especificidad del *homing* de los leucocitos ya que, como se mencionó anteriormente, todos cuentan con moléculas de adhesión necesarias para realizar trans migración; sin embargo, depende de qué receptor(es) de quimiocina(s) se esté expresando sobre la célula y qué ligando se encuentre presente en la superficie endotelial, el que las células tengan preferencia por entrar a un órgano (o tejido) u otro. Así por ejemplo, CCL19 y CCL21, dos quimiocinas que se expresan en órganos linfoides, atraen específicamente linfocitos vírgenes, linfocitos de memoria central y células dendríticas hacia ganglios linfáticos, ya que son células que expresan CCR7⁴³. De manera similar CXCR5 y su ligando CXCL13 que es producido por células del estroma y células dendríticas foliculares dentro de las áreas B, definen la estructura de los folículos B en los órganos linfoides secundarios⁴⁴.

La afinidad de las integrinas también se ve aumentada por otras moléculas tales como péptidos derivados de bacterias (fMLPs) que activan a las integrinas Macrophage-1 antigen (Mac-1) y lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1); asimismo, componentes del complemento, leucotrienos, metabolitos de ácido araquidónico y mediadores lipídicos como el Factor Activador de Plaquetas (PAF), pueden inducir activación de las integrinas al provocar cambios conformacionales en éstas moléculas ⁴⁵ ⁴⁶ ⁴⁷. La mayor parte de los estudios enfocados a evidenciar los cambios en la afinidad de la integrinas se han hecho con LFA-1. Sus ligandos, las Moléculas de Adhesión Intracelular 1, 2 y 3 (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3) inician la señal “de afuera hacia adentro” (outside-in). Estos ligandos se encuentran tanto en endotelio como en leucocitos.

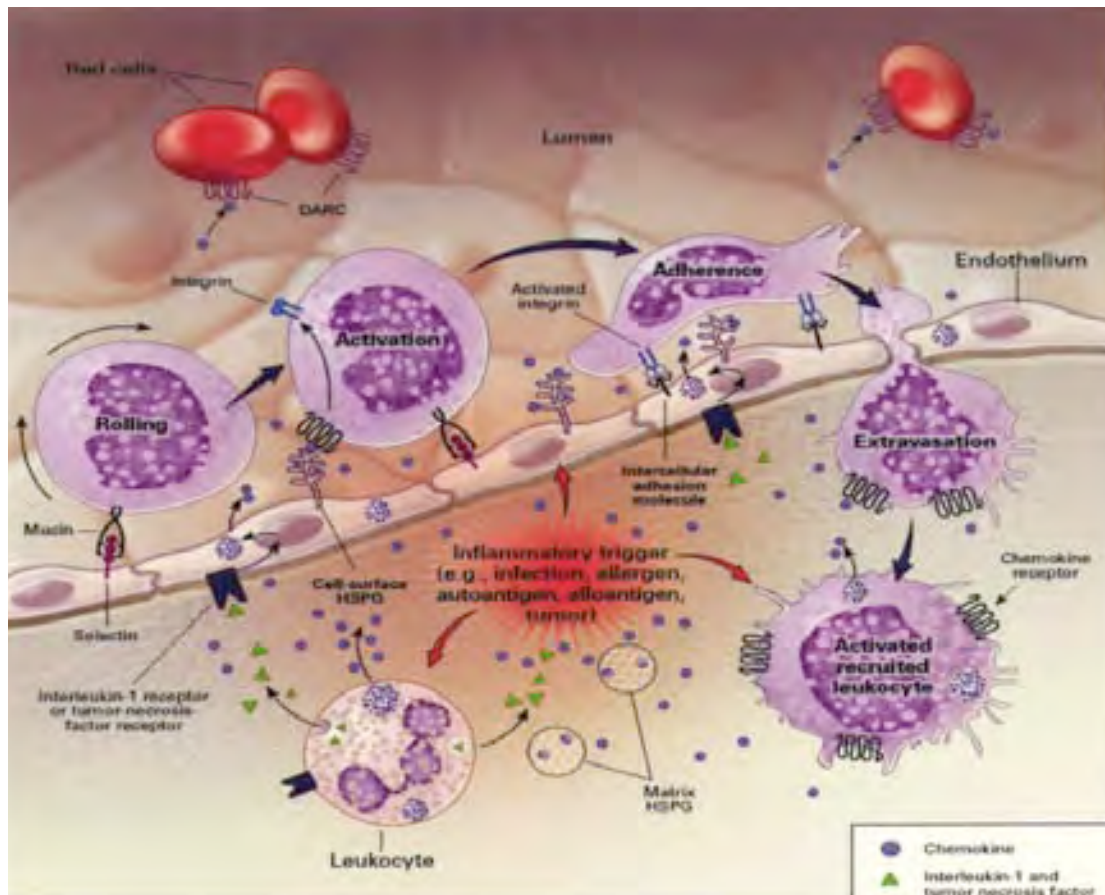


Figura 2. El modelo de migración de múltiples pasos. Este modelo está conformado principalmente por tres pasos: El rodamiento, mediado por selectinas; la activación, mediada por quimiocinas; y el arresto, mediado por integrinas. (Tomado de Luster, 1998).

1.6 Señalización a través de receptores de quimiocinas.

Las quimiocinas ejercen su actividad biológica a través de receptores de siete hélices transmembranales (GPCR) acoplados a proteínas G heterotriméricas, constituidas por las subunidades α , β y γ . Estos receptores poseen aproximadamente 350 aminoácidos y un peso molecular de alrededor de 40Kda. Los detalles de la estructura de los receptores de quimiocinas no han sido observados directamente sin embargo, se han generado modelos mediante la observación de la rodopsina bacteriana (*Halobacterium halobium*) con ayuda de la criomicroscopía electrónica⁴⁸ y posteriormente difracción de rayos X

de cristales crecidos en fases lipídicas cúbicas ⁴⁹. Los receptores 7TM son una sola cadena proteica en la que hay 7 regiones de mucha hidrofobicidad correspondientes a 7 hélices α transmembranales y 6 asas β de conexión entre ellas, tres de las cuales son extracelulares y tres intracelulares, con la región N-terminal expuesta extracelularmente. La segunda y la tercera asa citosólica están implicadas en el reconocimiento de las proteínas G.

La subunidad $G\alpha$ que emplean principalmente los receptores de quimiocinas es la de la proteína G inhibitoria de adenilato ciclasa ($G_{\alpha i}$), aunque anticuerpos que reconocen las subunidades α de las proteínas G_0 , G_s y G_q son capaces de bloquear la movilización de calcio inducida por CXCL12 (SDF1), demostrando que otras subunidades α pueden ser empleadas ⁵⁰. Estudios llevados a cabo inicialmente con CXCL8 demuestran que la inducción de migración está mediada por regiones conservadas en el extremo amino de la quimiocina ya que al quitar estas regiones o al modificarlas usualmente se afecta negativamente la señalización sin alterar la interacción de la quimiocina con su receptor, lo cual indica que los dominios que emplea la quimiocina para unirse al receptor y aquellos con los que induce su activación son diferentes. Para explicar la interacción quimiocina-receptor se ha propuesto un modelo de dos pasos en el que en primera instancia, la quimiocina se une a su receptor mediante interacciones que no inducen activación. La unión se da entre el loop N de la quimiocina y el dominio amino terminal del receptor, lo cual conduce a un cambio conformacional en la quimiocina (Paso I). Finalmente es por medio de la interacción del dominio N-terminal de la quimiocina con los tres bucles extracelulares del receptor que se lleva a cabo la activación del mismo (paso II) ⁵¹.

Al ser ocupados por su ligando, estos receptores inducen el intercambio del GDP por GTP en la proteína G, lo cual conduce a la disociación de la proteína G heterotrimérica en las subunidades $G\alpha$, la cual queda unida al GTP y posee actividad intrínseca de GTPasa; y $\beta\gamma$, la cual activa a la fosfolipasa $C\beta 2$ (PLC- $\beta 2$) y a la PLC $\beta 3$ que a partir del fosfoinositol (PI) induce la formación de inositol 1-4-5, trisfosfato (InsP3) y el aumento en la concentración de calcio intracelular. Asimismo la activación de PLC conduce a la formación de diacilglicerol (DAG) y la subsecuente activación de PKC. Por otra parte, *in vitro*, las subunidades $\beta\gamma$ activan directamente a la fosfatidilinositol 3 cinasa gama (PI3K γ). En neutrófilos provenientes del ratón PI3K $\gamma^{-/-}$, no se observa la acumulación fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PtdIns(3,4,5)P3) en respuesta a fMLP y C5a (moléculas que inducen migración y que al igual que las quimiocinas poseen receptores de siete dominios transmembranales, GPCRs), lo cual indica que PI3K γ promueve la formación de este PtdIns en respuesta a quimioattractantes a través de GPCRs. PtdIns(3,4,5)P3 se desfosforila dando como resultado PtdIns(3,4)P2. AKT (también denominada PKB) posee dominios PH por medio de los cuales se puede unir a PtdIns(3,4,5)P3 y ser así transportada a la membrana celular. Una vez en la membrana, las cinasas dependientes de fosfoinositido 1 (PDK1) y PDK2 fosforilan a AKT en dominios serina y treonina. Por otra parte, en neutrófilos deficientes en PI3K γ , la fosforilación de las MAPKs, ERK1 y ERK2 inducida por fMLP o C5a, se encuentra afectada negativamente; no obstante, no se afecta la fosforilación de p38 ni la activación de JNK. De esta manera, confirmando la importancia del papel de PI3K γ en la migración de leucocitos a través de la vía señalización de los GPCRs, la respuesta quimiotáctica *in vitro* de neutrófilos hacia fMLP y C5a; y de linfocitos T hacia CCL19, CCL21 y CXCL12 está drásticamente disminuida en ausencia de PI3K γ . Sumado a esto, al inducir inflamación en el ratón PI3K $\gamma^{-/-}$ mediante un modelo de peritonitis, el

reclutamiento de neutrófilos hacia la cavidad peritoneal se ve disminuido ^{20;52}. La activación de PI3K inducida por quimiocinas puede ser bloqueada utilizando inhibidor de cinasas de tirosina, inhibidor para PI3K y toxina pertusis. Esta toxina ADP-ribosila la subunidad α de las proteína Gi, G0 y Gt, impidiendo la interacción de la proteína G con el receptor, alterando negativamente la activación del mismo. (Figura 3) ^{53 54}.

Por otra parte, la subunidad $G\alpha_i$ unida a GTP es capaz de unir directamente y activar cinasas de la familia src ⁵⁵. Src puede activar por medio de la proteína adaptadora *shc* a las MAPK⁵⁵. Sumado a esto, c-src está involucrada con la señalización que induce adhesión, reclutándose a sitios de adhesión focal. Estas adhesiones consisten en agrupaciones de integrinas y proteínas que ligan la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina y con las proteínas intracelulares relacionadas con adhesión. Utilizando la línea celular Swis 3T3, que son “fibroblastos-like”, transfectada con Cdc42, Rac, Rho o src acoplada a la proteína verde fluorescente (GFP) se observó que la localización de src en los sitios de adhesión focal, lamelipodios o filopodios requiere de la activación de estas GTP-asas de la familia Ras, Rho-a, Rac-1 y Cdc42 respectivamente. Así, la coexpresión de src con una forma activada de Rac indica que esta activación induce que src se localice en la periferia de la célula en un “anillo” de actina. Estas GTPasas de Ras se encargan del rearreglo del citoesqueleto así: Rho-a lleva a cabo la contracción de miosina, lo cual conduce a la agrupación de fibras de estrés de actina; Rac-1 polimeriza actina en periferia (lamelipodios) y Cdc42 es responsable de la formación de protusiones finas ricas en actina (filopodios). De esta manera, la coexpresión de una forma activada de Cdc42 en la línea celular Swis 3T3 induce la formación de filopodios y el movimiento de src desde la zona perinuclear a la región membranal en la base de los filopodios⁵⁶. Rac-1 y Cdc42 agrupan complejos focales, los cuales contienen proteínas como vinculina, paxilina, FAK/Pyk2 y src. A su vez, la

actividad catalítica de src se requiere para la remodelación del citoesqueleto inducida por Rho-a, Rac-1 y Cdc42⁵⁶. Rho y Rac se regulan mutuamente, ya que están encargadas de la contracción de miosina en el urópodo y la polimerización de actina en el “leading edge” respectivamente; sin embargo se ha observado que al expresar una dominante negativa de Rac-1 la activación de Rho disminuye, lo que indica que Rac-1 también regula positivamente a Rho⁵⁷ (Figura 3). Por otra parte, se ha observado que la activación de Rac-1 y Pyk -2 es importante para la migración trasendotelial de células NK de humano, así cuando células endoteliales han sido estimuladas con TNF α , la unión de las células NK al endotelio resulta en la fosforilación de Pyk-2. La activación de Rac-1 inducida por las quimiocina CCL2 se da rápidamente a los 30 segundos y la de Pyk-2 un minuto después; sin embargo el expresar una dominante negativa de Pyk-2 bloquea la activación de Rac-1^{57;58}. El homólogo de Pyk-2, FAK, induce formación de contactos focales, extensión celular y señalización que induce movilidad y coordina la adhesión y disociación de la célula en un mecanismo que comprende su fosforilación y desfosforilación. En condiciones de desensibilización del receptor de quimiocina, FAK incrementa sus niveles de fosforilación afectando negativamente su desfosforilación y por lo tanto el ciclo de adhesión y disociación. La fosforilación de FAK requiere de los filamentos de actina y de microtúbulos; de la misma manera los filamentos de actina y β -tubulina relocalizan a FAK durante la extensión celular⁵⁹.

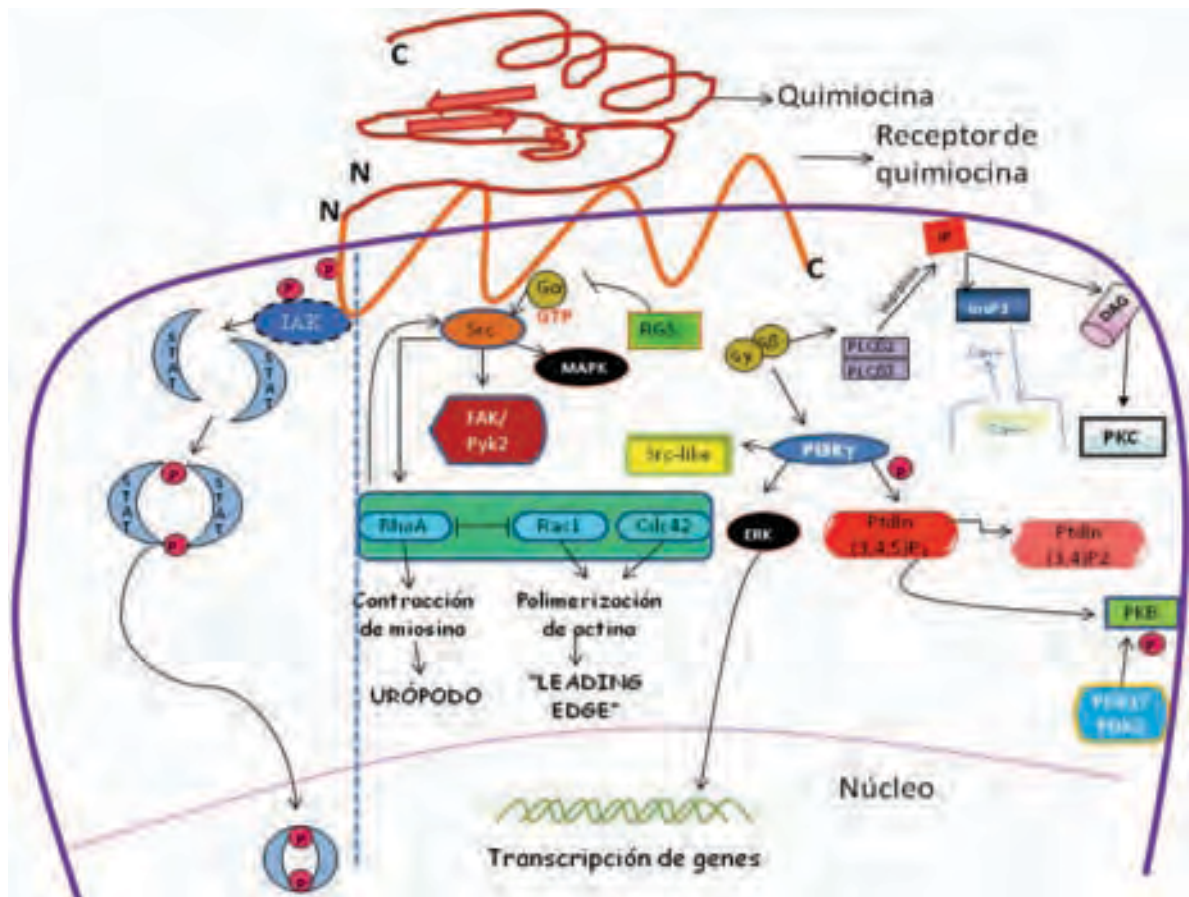


Figura 3. Señalización a través de receptores de quimiocinas.

La velocidad de la respuesta quimiotáctica está determinada por la internalización de receptores y su síntesis de novo o recirculación en superficie, aunque se ha demostrado para CXCR4 en células hematopoyéticas, que los receptores de quimiocinas polarizan en el leading edge, la migración no depende de este reclutamiento, sino más bien de la distribución uniforme de los receptores en la superficie celular^{60 61}.

La regulación de la activación de los receptores de quimiocina es llevada a cabo por varios mecanismos. Por ejemplo, las proteínas Reguladoras de la Señal de Proteínas G

(RGS) estimulan la capacidad GTPasa de la subunidad $G\alpha$. Así, esta subunidad pasa de estar unida a GTP (forma activa), a estar de nuevo ligada a GDP (forma inactiva); en este estado, $G\alpha_i$ tiene una gran afinidad por las subunidades $\beta\gamma$, por lo cual se revierte la señalización inducida por estas proteínas^{62 63}.

Otros mecanismos de regulación de la señalización de quimiocinas incluyen la desensibilización inducida por Cinasas de Proteínas G Acopladas a Receptor (GRKs) y PKC. Sumado a esto, la fosforilación del receptor induce el reclutamiento de arrestinas, las cuales unen a la Proteína Adaptadora 2 (AP-2) e inducen la internalización del receptor mediada por clatrina. El proceso de internalización de receptores de quimiocinas no se ve afectado por la toxina pertusis, lo cual indica que el receptor es capaz de percibir señales por mecanismos independientes de proteínas G_i o G_0 ⁶⁴. Por otra parte, los inhibidores de la vía Jak/Stat, los SOCS (Supressors of Cytokine Signaling), también están implicados en regular negativamente la activación mediada por quimiocinas, ya que recientemente se ha encontrado que quimiocinas como CXCL12 entre otras, utilizan esta vía de señalización⁶⁵.

2. CINASAS DE JANUS (JAKs)

Los receptores que no poseen actividad cinasa intrínseca frecuentemente se encuentran asociados a proteínas cinasas para poder llevar a cabo la transducción de señales. Las Jaks, son proteínas con actividad de tirosina cinasa; han sido identificadas en organismos como el cordado primitivo *Ciona*, *Drosophila*, aves y peces. Los mamíferos

poseen cuatro proteínas Jak, Jak1⁶⁶, Jak2⁶⁷, Jak3^{68, 69, 70} y Tyk2⁷¹, las cuales se expresan de manera ubicua con excepción de Jak3, que se localiza predominantemente en células de origen hematopoyético, aunque también se encuentra en células de músculo liso y en endotelio. Los genes que codifican para Jak1 y Jak2 en humano se encuentran en los cromosomas 1p31.3 y 9p24 respectivamente. Jak3 y Tyk2 en humano se codifican en genes que se localizan en el mismo cromosoma (19p13.1 y 19p13.2 respectivamente). En ratón los cromosomas implicados son el 4 y el 19 para Jak1 y 2; y el 8 para Jak3 y Tyk2⁸.

Aunque el dominio tirosina cinasa de la Jak3 humana ya fue cristalizado⁷², la estructura tridimensional de las Jaks aún no ha sido descrita. Estas proteínas poseen aproximadamente 20 exones, 1100 aminoácidos y un peso molecular de 120-140 KDa. Cuentan con siete dominios denominados *Jak homology* (JH) ubicados en tándem que se enumeran desde el extremo carboxilo al extremo amino del 1 al 7. El dominio JH1 es un dominio tirosina cinasa que tiene capacidad de autofosforilarse. Cuenta con el loop de activación, el cual posee un motivo conservado YY que es donde ocurre la fosforilación que conduce a la activación de la proteína⁷³. El JH2 es un dominio similar a tirosina cinasa y es debido a que se encuentran juntos un dominio tirosina cinasa (JH1) y uno similar a tirosina cinasa (JH2), que las Jaks reciben el nombre de Cinasas de Janus, en honor al dios romano de dos caras. El JH2 regula la actividad catalítica del dominio JH1. Así, por ejemplo, en una quimera del receptor para hormona de crecimiento y Jak2, la depleción de JH2 conduce a un aumento de la señal, llevando a los autores a concluir que JH2 inhibe la actividad tirosina cinasa⁷⁴. La función de este dominio esta conservada entre Jak2 y Jak3, así, al quitar JH2 en Jak3 incrementa la fosforilación de la misma Jak3 y resulta en la activación constitutiva de STAT5⁷³. Sin embargo, al quitar este dominio en Tyk2, se elimina la actividad de cinasa y la señal

inducida por IFN α/β . Así podemos decir que el dominio JH2 regula la actividad de la cinasa, sin embargo esta función depende de factores como la Jak implicada y el estímulo. Las regiones JH3 y JH4 forman un dominio SH2 y los JH6 y JH7 conforman un dominio FERM que está implicado en la unión de Jak con el receptor y en la regulación de la actividad de cinasa ⁷⁵.

La evidencia de que las Jaks participan en vías de señalización de citocinas se obtuvo mediante experimentos en los que quitando Tyk2 se perdía la señal inducida a través de IFNs α y β . Congruente con este dato, al restituir Tyk2 se restauraba la señal ^{76 77}; Sin embargo, ahora se sabe que Tyk2 está más involucrado en la señalización de IL6, IL10 y en la familia de citocinas IL12/IL23 ⁷⁸. Así, la deficiencia en esta cinasa resulta en el aumento de procesos alérgicos y en una defectuosa respuesta antimicrobiana.

Jak1, al igual que Jak3 es importante para la señalización de citocinas que utilizan la cadena γ común (γ_c) como parte del receptor, como lo son IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, e IL-21. Jak1 se encuentra físicamente asociado a los receptores de los IFN tipo I y II y a los de IL-6 e IL-2. Jak2 es importante para el funcionamiento de la hormona eritropoyetina, por lo cual el ratón deficiente en Jak2 muere en etapa embrionaria. Esta cinasa está involucrada en la señalización de receptores de una sola cadena como Epo-R, GH-R y Prl-R, así como en la vía de IL-3R, IL-5R y GMCSFR y en la de IFN γ R ⁷⁹. La deficiencia en Jak3, al igual que la carencia de la cadena γ_c , produce un timo hipoplásico y un defecto en el desarrollo de los linfocitos T los cuales no responden adecuadamente en periferia ⁸.

2.1 Jak3

Jak3 tiene un peso de 120 KDa; se localiza en el cromosoma 8 en ratón y en el 19 en humano⁸⁰. Esta molécula fue clonada en 1994 utilizando la técnica de PCR por cuatro grupos independientes. Kawamura et al. 1994⁶⁸ describió a Jak3, a la cual denominó L-Jak (Leucocyte Janus Kinase), en células NK y LT estimulados con PHA; Rane and Reddy en 1994⁶⁹ determinaron que Jak3 se expresa en células hematopoyéticas inmaduras a bajos niveles, y que éstos aumentan en las fases terminales de diferenciación; Takahashi y Shirasawa, en 1994⁷⁰ describieron esta cinasa en células mesangiales de rata; y por último Witthuhn et al, en 1994⁸¹ describen también a Jak3 encontrando que se activa tras el estímulo de IL2 e IL4 en linfocitos T y en células mieloides.

Esta tirosina cinasa se encuentra principalmente en células y tejidos hematopoyéticos como timo, bazo, médula ósea e hígado fetal; aunque también se localiza en células de músculo vascular liso, en endotelio y en epidermis de humano. Jak3 se asocia a la cadena γ_c ⁸²; razón por la cual esta cinasa es esencial para aquellos receptores de citocinas que utilizan esta cadena para la transducción de su señal⁸³, como lo son los receptores de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. Debido a la importancia de éstas citocinas para el desarrollo de linfocitos, es en estas células en las que esta cinasa ha sido principalmente estudiada. La deficiencia en Jak3 produce inmunodeficiencia Severa Combinada (SCID) autosómica recesiva. Así, las causas de un significativo número de pacientes con (SCID) son debidas a mutaciones en el IL7R, en la γ_c y en Jak3 (aproximadamente el 10%, el 50% y del 7-14% respectivamente)⁸⁴.

El ratón deficiente en Jak3 es similar al deficiente en IL7, IL7R o al deficiente en la cadena γ_c . Sobrevive en condiciones de esterilidad ya que presenta Inmunodeficiencia Severa Combinada (SCID). Este ratón no muestra grandes diferencias ni en peso ni en

tamaño respecto al ratón de la cepa silvestre ⁸⁵; no posee células Natural Killer (NK) ni linfocitos $\gamma\delta$. El número total de células pro-B ($CD43^+ CD45^+$) es normal; sin embargo el número de células pre-B, es decir LB inmaduros, ($CD43^-CD45^+$) se encuentra disminuido y casi no se encuentran células B maduras ($CD45R^+ IGM^+$). El timo del ratón $Jak3^{-/-}$ aunque es mucho más pequeño (1-10%) que el de un ratón de cepa silvestre, presenta una distribución en la cual las zona cortical y la medular son identificables ⁸⁶. A pesar de esto, el número total de timocitos varía entre el 5 y el 10% del habitual. Generalmente la proporción LT $CD4$ Vs $CD8$ es normal, aunque en los timos más pequeños hay un aumento en las $CD4^+CD8^-$. Los números de LT $CD4^+$, pero no de LT $CD8^+$, son equivalentes a los del ratón de la cepa silvestre en bazo aunque presentan marcadores de activación como $CD44$, $CD69$ y $CD25$ y expresión reducida de $CD62L$. Las placas de Peyer y los ganglios linfáticos periféricos, a excepción del mesentérico, se encuentran ausentes en el ratón $Jak3^{-/-}$. A pesar de que sí hay timocitos y de que los linfocitos T del bazo de los ratones deficientes en $Jak3$ se encuentran activados, al ser cultivados in vitro con diferentes mitógenos, estas células muestran baja proliferación en comparación con las células provenientes del ratón de la cepa silvestre ⁸⁷.

A pesar de que las células dendríticas deficientes en $Jak3$ sobreviven más ⁸⁸ en comparación a las que provienen de ratones silvestres (este punto se retomará más adelante), los niveles de apoptosis de linfocitos T en este ratón se encuentran aumentados. Esto se debe a que en condiciones normales, $Jak3$ reprime la expresión de Bax (el cual es pro-apoptótico) e induce la de Bcl2 (que es anti-apoptótico) ^{85 87}.

El número de granulocitos y monocitos en ratones $Jak3^{-/-}$ es normal ⁸⁶; sin embargo, se ha observado que la sobreexpresión de $Jak3$ acelera la diferenciación de granulocitos y monocitos en respuesta al Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Monocitos

(GM-CSF). La línea celular mieloide que normalmente toma de 8-10 días para su diferenciación, toma únicamente 4 días para lograrlo cuando Jak3 es sobreexpresado (algo similar ocurre con el G-CSF) ⁸⁹. Congruente con la importancia de Jak3 en la mielopoyesis, se ha visto que el estímulo con G-CSF aumenta los niveles de transcripción de Jak3 en una línea celular de precursores de linaje mieloide. Adicionalmente, en los ratones Jak3^{-/-} hay un incremento en el número de células MAC1⁺ en médula ósea y bazo. Así, aunque hay varios y graves defectos en células de linaje linfoide, las fallas en células de linaje mieloide también están presentes y se hacen evidentes con la edad expresados como esplenomegalia, incremento de células monocíticas y neutrófilos en sangre periférica, bazo y médula ósea e invasión de órganos periféricos con células mononucleares. Estos defectos son acentuados por los LT deficientes en Jak3, ya que cuando esta cinasa se restablece en estos linfocitos, la expansión de células de linaje mieloide disminuye ⁹⁰. Congruente con este dato, el ratón deficiente tanto en Jak3 como en RAG-1 no presenta ni esplenomegalia ni defectos en mielopoyesis ⁹¹.

Se ha determinado que Jak3 también es importante para la proliferación y supervivencia de mastocitos inducida a través de la señalización de IL4 e IL9. Congruente con esto, el número de mastocitos en el peritoneo de ratones deficientes en Jak3 se encuentra disminuido ⁹². Contrario a la importancia de Jak3 en la diferenciación y supervivencia en mastocitos, se ha observado que la ausencia de esta cinasa no afecta ni la diferenciación ni la maduración de células de médula ósea hacia células dendríticas cuando IL4 es utilizado ⁹³.

2.2 Vía De Señalización Jak/STAT

A través de la vía de señalización Jak/Stat se transducen señales de citocinas como los Interferones α , β y γ ; las citocinas IL12, IL23 e IL10, así como aquellas cuyos

receptores pertenecen a la superfamilia de receptores de citocinas tipo I como lo son IL2, IL3, IL4, IL5, IL7, IL9, IL13, IL15 y GM-CSF. También citocinas que señalizan a través de la subunidad gp 130, como lo son IL6, IL11, Oncostatin M (OSM), Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) y Cardiotrophin 1 (CT-1), Hormona de crecimiento, prolactina, eritropoyetina y trombopoyetina.

La vía Jak/STAT se activa cuando el ligando se une a su receptor induciendo su dimerización y su cambio conformacional, lo cual conduce a la activación de las cinasas Jak a través de la interacción recíproca de dos Jaks que se encuentran asociadas al receptor intracelularmente en regiones próximas a la membrana celular a través de los dominios FERM (se ha observado que en ausencia del receptor las Jaks pueden ser encontradas en el citosol) ⁹⁴. Las Jaks se autofosforilan en dominios de tirosina presentes en el loop de activación y transfosforilan al receptor en un residuo de tirosina, lo cual permite el reclutamiento de las proteínas STATs al receptor a través de un dominio SH2 que las STATs poseen. Antes de esta fosforilación, la estructura del loop de activación impide el acceso del sustrato ⁸². Así, las STATs se convierten en sustrato para las Jaks siendo fosforiladas, proceso que conduce a su liberación del receptor, su dimerización (pueden homodimerizar u heterodimerizar), donde el dominio SH2 de una STAT une a la fosfotirosina de la otra STAT. Estos dímeros son capaces de translocar al núcleo para unirse a secuencias específicas de DNA promoviendo la transcripción de diversos genes (Figura 4) ^{95 82}.

Las STATs son una familia de 7 proteínas (STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b y 6) con un tamaño de 750 a 900 aminoácidos. En reposo, las STATs se encuentran en el citoplasma formando dímeros inactivos, sin embargo, como se mencionó anteriormente, al ser activado el receptor por las Jaks, se crea un dominio para el reclutamiento de las STATs, a través de su dominio SH2. Estos factores de transcripción se acumulan en el

núcleo rápidamente. En cuestión de horas la señal de Stat disminuye y es re-transportado nuevamente al citoplasma⁹⁶.

2.3 Señalización de receptores de quimiocinas a través de la vía Jak/STAT

En la señalización de receptores de quimiocinas se ha implicado, además de la clásica vía de las proteínas G, la vía JAK/STAT. Entre los receptores de quimiocinas que señalizan a través de la vía JAK/STAT están CCR2⁹⁷, CCR5⁹⁸, CXCR4⁹⁹, CCR9¹⁰⁰ y CCR7¹⁰¹. Los primeros dos receptores están involucrados en procesos inflamatorios; CXCR4 es un receptor ampliamente expresado por varios tipos celulares en procesos homeostáticos. CCR7 se expresa en linfocitos B, LT naive y células dendríticas maduras, y se encuentra implicado en el homing de éstos dos últimos tipos celulares hacia órganos linfoides secundarios.

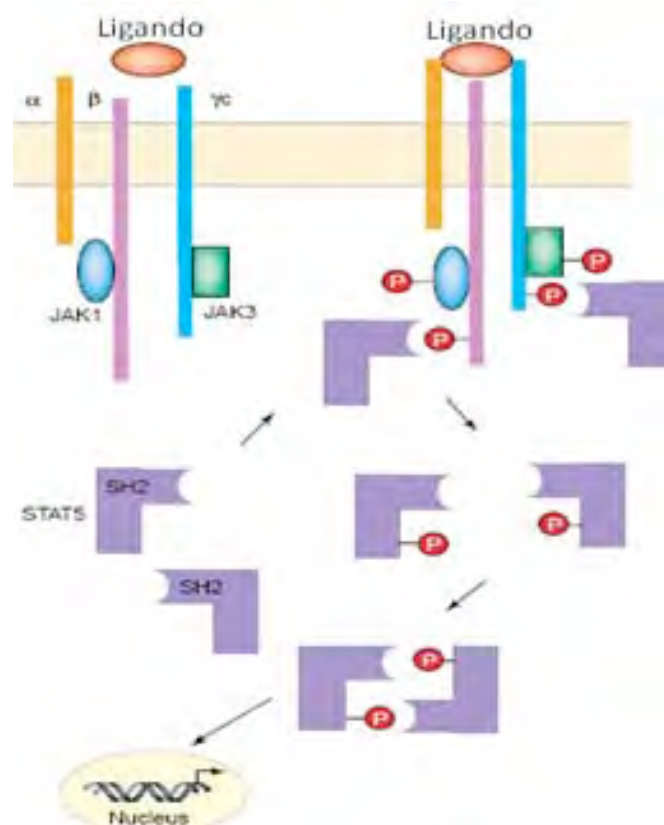


Figura 4. Vía de señalización Jak/Stat. La unión del ligando al receptor conduce a su dimerización, lo cual induce la fosforilación de Jak y la transfosforilación del receptor, creándose un sitio para el reclutamiento de los factores de activación y transcripción STAT, que se fosforilan, se dimerizan y se translocan al núcleo para promover la transcripción de diversos genes.

En la activación mediada por citocinas, la activación de las Jaks procede después de la dimerización del receptor inducida por el ligando. Congruente con esto, la dimerización es un mecanismo que ha sido descrito para varios receptores de quimiocinas. Los estudios fueron iniciados con CCR2b¹⁰², y ahora el mecanismo ha sido evidenciado también en receptores como CXCR4⁹⁹, CCR5⁹⁸ y CXCR2¹⁰³. Estos receptores pueden homodimerizar y / o heterodimerizar, como es el caso de CXCR2 y CXCR1, receptores de CXCL8¹⁰⁴.

CCR2 es capaz de unir a varias quimiocinas, sin embargo CCL2 (MCP1) se une únicamente a este receptor. En macrófagos de peritoneo y en una línea de monocitos humanos, CCL2 es capaz de inducir la fosforilación de tirosinas mediada por Jak2 en un mecanismo dependiente de proteína G α i. La activación de STAT3 y STAT5 ha sido observada en estas células tras el tratamiento con CCL2 pero inhibir la fosforilación de Jak2 inducida por esta quimiocina abate la señal de calcio y la migración. La tirosina de CCR2 implicada en la fosforilación inducida por Jak2 es la Y139, que se ubica en la secuencia DRY, un dominio conservado en los GPCRs⁹⁷.

Asimismo, CCR5 al ser activado por CCL5 (RANTES), induce la fosforilación de Jak1 y la subsecuente activación de STAT5b en células de hígado embrionario (HEK 293) transfectadas con el receptor. Por el contrario, la activación de CCR5 inducida por

CCL5 en la línea de células T PM1 no conduce a la activación de Jak1, pero sí a la rápida fosforilación de Jak2 y Jak3 de manera independiente de proteínas G α i, ya que este proceso es insensible a toxina pertusis. En estas células, la fosforilación de Jak3 inducida por CCL5 conduce al reclutamiento de la proteína cinasa src p56^{lck}. Además, en células T también se ha observado que la activación de CCR5 mediada por CCL5 induce la activación y formación de los dímeros STAT 1:1 y STAT1:3¹⁰⁵.

En una línea de células T, CXCL12 (SDF1) induce, a los 60 segundos, la fosforilación de Jak2 y Jak3 a través de CXCR4 en un mecanismo independiente de proteínas G α i y conduce asimismo al reclutamiento de STAT1, STAT2, STAT 3 y STAT 5. El tratamiento de estas células con el inhibidor de Jaks AG490 inhibe totalmente el flujo de calcio y la migración de células inducida por CXCL12 indicando la importancia de la activación de las Jaks para el buen funcionamiento del receptor CXCR4. Sumado a esto, en una línea de células progenitoras de humano, CXCL12 es capaz de inducir la fosforilación de Jak1, Jak2 y Tyk2¹⁰⁶. En este caso las STATs involucradas en la señalización son STAT 2 y STAT 4. Jak2 se encuentra involucrado en la activación de PI3K inducida por SDF1, lo cual indica que esta Jak se encuentra río arriba de PI3K en la vía de señalización de CXCR4. Además, en esta línea de células progenitoras de humano, Jak2 se encuentra también implicado en la activación de proteínas de adhesión focal como FAK, RAFTK, Paxilina, CrkII y P130Cas.

Jak3 participa en la señalización a través de CCR9 y CXCR4 en progenitores de médula ósea y en timocitos, lo cual podría afectar negativamente tanto la migración de progenitores al timo, como la de timocitos a través del estroma tímico. Esta cinasa se fosforila rápidamente a los 15 segundos en respuesta a CCL25 y CXCL12, ligandos de CCR9 y CXCR4 respectivamente¹⁰⁰. Jak3 también se fosforila tras el estímulo de CCR5, y en células de ganglios linfáticos esta cinasa se activa tras el estímulo con

CCL19 y CCL21. Así, linfocitos deficientes en Jak3 migran menos hacia estas quimiocinas *in vitro*, lo cual indica que esta cinasa participa en la señalización a través de CCR7. Sumado a esto, mediante experimentos de transferencia adoptiva se ha demostrado que *in vivo*, células progenitoras deficientes en Jak3 tienen defectos para llegar a timo, ganglios linfáticos periféricos, mesentéricos y placas de Peyer y que esta falla no se debe a irregularidades en el estroma, sino que es intrínseca de las células; tampoco se debe a deficiencias en la expresión de los receptores, ya que en las células Jak3^{-/-}, CCR9 y CXCR4 se expresan normalmente y CCR7 se encuentra en niveles aún mayores que en las células de un ratón silvestre^{100;101}.

La señalización a través de CCR7 en linfocitos CD4+, CD8+ y B220+ igualmente se ve bloqueada al utilizar el inhibidor de tirosinas cinasas AG490, que actúa sobre Jak2 y Jak3. Congruente con este dato, Jak2 se fosforila tras la estimulación de CCR7 con CCL21. Así, además de que el inhibidor AG490 inhibe la migración hacia CCL19 y CCL21, la adhesión mediada por integrinas como ICAM-2 y VCAM-1, que es dependiente de la estimulación con CCL21, también se ve afectada negativamente; por el contrario, cuando la activación de integrinas no depende de quimiocinas, la adhesión mediada por estas proteínas no se ve alterada¹⁰⁷.

3. CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas (CDs) son las células presentadoras de antígeno profesionales (APC por sus siglas en inglés) más potentes debido a su capacidad para tomar, procesar antígenos y migrar a ganglios linfáticos para hacer contacto mediante la presentación antigénica con los linfocitos T conduciéndolos a estados de activación o tolerancia³.

Las CD_s que se descubrieron inicialmente fueron las que residen en piel, aunque su relevancia en la respuesta inmune sólo se dio a conocer mucho tiempo después. En 1868 Paul Langerhans describió las células que llevan hoy su nombre. Por medio de la técnica de Cloruro de Oro logró observar la morfología de las células de Langerhans, caracterizada por la presencia de dendritas extendidas, catalogándolas como parte del sistema nervioso. En 1973, es decir más de un siglo después, la Dra. Inga Silberbeg describió la importancia de las células de Langerhans en la respuesta inmune por medio de ensayos de sensibilidad por contacto ¹⁰⁸. En este mismo año, el Dr. Ralph Steinman identificó a las CD_s en suspensiones celulares preparadas de órganos linfoides periféricos de ratón. Él determinó que estas células son morfológicamente irregulares, poco adherentes y con poca capacidad endocítica (aunque hoy sabemos que esta capacidad es muy alta cuando se encuentran en estado inmaduro). Por medio de ensayos de transferencia adoptiva se evidenció que las células no adherentes del bazo eran capaces de restituir la población de CD_s de bazo de ratones irradiados dando las pautas acerca del origen de las CD_s ¹⁰⁹.

Las células dendríticas se ubican prácticamente en todos los tejidos incluyendo tejido linfoide, piel y mucosas donde forman una gran barrera contra la entrada de agentes extraños. En la periferia, las CD_s capturan antígenos tanto propios como extraños eficientemente por medio de mecanismos que consisten en receptores como el Fc γ R CD32 y CD64; el receptor de alta afinidad para IgE Fc ϵ RI y el de baja afinidad Fc ϵ R2; los receptores de complemento CD11b y CD11c así como el receptor de manosa tipo lectina C, DEC205. También pueden fagocitar partículas de látex y células muertas por medio de los receptores scavenger $\alpha\beta$ 5 y CD36. Estas CD_s inmaduras no tienen capacidad presentadora; no obstante, reconocen señales de peligro como PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) como LPS (Lipopolisacáridos) y otros

estímulos inflamatorios como TNF α y el Ligando de CD40, que conducen al proceso de maduración de la CDs, el cual consiste entre otros aspectos en el aumento en la superficie celular de moléculas coestimuladoras como CD80, CD40 y CD86 así como de MHCII. La maduración de CDs les permite a estas células presentar el antígeno en un contexto que induce la activación de linfocitos T^{3 110}.

3.1 Precursores y marcadores.

Las CDs se derivan de precursores de médula ósea y se localizan prácticamente en todos los tejidos. Teniendo en cuenta su ubicación, fenotipo y funciones, las CDs se agrupan en diferentes poblaciones entre las que podemos encontrar las denominadas células de Langerhans que se encuentran en piel; las CD dermales o intersticiales; las CD plasmacitoides, ubicadas en sangre y órganos linfoides especializadas en la producción de IFN α , importante para la respuesta antiviral; las recientemente descritas interferon-producing killer DCs (IKDCs), CDs productoras de IFN α que poseen marcadores típicos de células NK; las células dendríticas CD8⁻ y CD8⁺, antes denominadas mieloides y linfoides respectivamente, criterio que cambió por la demostración de varios grupos de que ambos tipos celulares, CD8 α^+ y CD8 α^- pueden originarse tanto de precursores mieloides (CMP) como linfoides (CLP), aunque aproximadamente el 90% de las CDs de bazo y el 50% de las de timo vienen de CMP; y por lo tanto, el 10% de las CDs de bazo y el 50% de las de timo vienen de CLP. Esto indica que pese a que ambos precursores son capaces de originar CDs, los CMP y CLP contribuyen de manera diferente para producir este tipo celular *in vivo*^{111 112}.

Las subpoblaciones de CD son heterogéneas y no se pueden catalogar simplemente por la expresión o la no expresión de CD8 α ; por ejemplo, las CD8 α^+ son CD11b⁻ y las CD8⁻ son CD11b⁺. Sumado a esto, las CD8 α^- pueden ser a su vez CD4⁺ o CD4⁻ y existen

niveles intermedios de expresión de CD8 α . Además, existen precursores presentes en sangre que pueden migrar hacia los tejidos durante procesos inflamatorios y diferenciarse hacia CD8. Además las CD8 son células que cuentan con gran plasticidad para cambiar su patrón de secreción de citocinas dependiendo del ambiente en el que se encuentran.

Por otra parte, las células de Langerhans son CD8 que forman una red “capturadora” de antígenos en la barrera más externa del organismo: la piel. Aunque se conoce su origen mieloide desde hace varios años, estudios recientes han hecho importantes avances acerca del origen y comportamiento de éstas células tanto en condiciones de reposo como en inflamación^{17,19}. Las células de Langerhans tienen largos periodos de vida en comparación con otras CD8. El principal marcador de éste tipo celular es la Langerina (CD207), que es una lectina tipo C que estimula la producción de los gránulos de Birbeck. Las células de Langerhans están migrando constantemente tanto en estado de reposo como en inflamación hacia ganglios linfáticos. Anteriormente se creía que las células dendríticas que llegaban a ganglios linfáticos eran células terminales que pronto sufrirían apoptosis. Sin embargo, se ha demostrado que estas células son capaces de incorporar BrdU, lo cual indica que proliferan in situ. Sumado a esto, mediante experimentos de parabiosis se evidenció que los precursores de las células dendríticas de órganos linfoides provienen de sangre y que tienen un promedio de vida de 14 días. Adicionalmente, las células dendríticas que portan antígeno y son capaces de multiplicarse, están capacitadas para traspasar el complejo MHC-péptido a sus células hijas, prolongando así el proceso de presentación antigénica^{113 114 115}.

3.2 Migración de células dendríticas

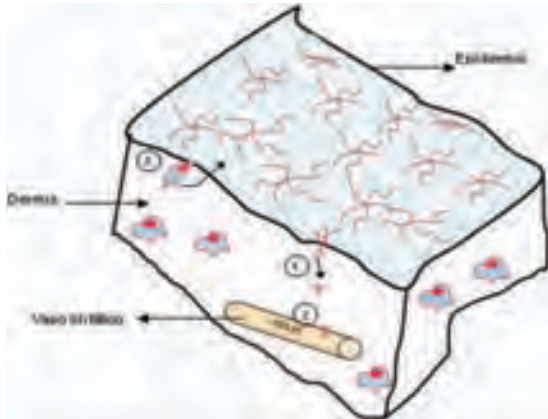
Las CD_s inmaduras poseen una amplia gama de receptores de quimiocinas como CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2 y CXCR4. Sumado a esto, las células de Langerhans poseen CCR6. Además, las CD_s pueden secretar varias quimiocinas como CCL3, CCL4, CCL5 y CCL19 entre otras ¹¹⁶. Por otra parte, las CD_s plasmacitoides inmaduras expresan CCR2, CCR4, CCR5, CCR7, CXCR3 y CXCR4. Estos receptores están implicados en el reclutamiento de células hacia sitios de inflamación.

Al madurar, las CD_s aumentan la expresión de CCR7 y CXCR4 en su superficie celular, lo cual es importante para llegar a ganglios linfáticos. Los ligandos para CCR7, CCL19 y CCL21 se expresan en órganos linfoides secundarios y en timo. CCL21 es codificado por dos genes, lo cual resulta en la traducción de dos proteínas: CCL21 –Leu que es producida por endotelio linfático y CCL21-Ser, que se produce en células de estroma de las áreas T y en las HEVs de órganos linfoides secundarios. Así, Las CD_s llegan a ganglios linfáticos a través de la interacción CCR7- CCL21-Leu. Congruente con estos datos, en el ratón *plt/plt*, el cual únicamente posee CCL21-Leu, la llegada de CD_s a ganglios linfáticos se encuentra afectada de manera negativa ¹¹⁷.

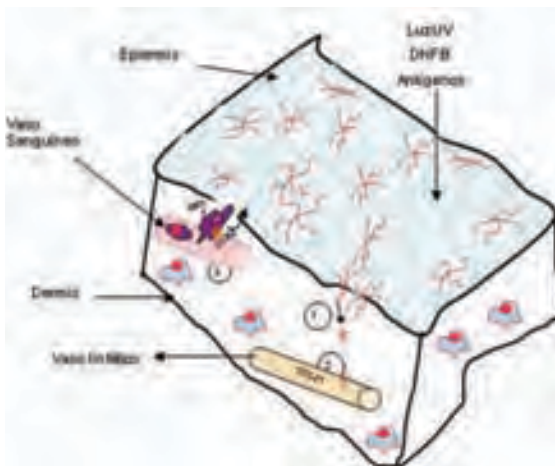
La mayoría de experimentos de migración de células dendríticas se han realizado utilizando modelos de células de Langerhans. Al igual que otras CD_s su función principal es presentar antígenos a los linfocitos T. Sin embargo, se diferencian de las demás por su capacidad de renovación en estado de reposo e inflamación, condiciones que, según se ha demostrado recientemente, influyen en la procedencia de los precursores de las células de Langerhans. Después de la transferencia de médula ósea el 90% de las CD_s de bazo, hígado y riñón provienen del donador mientras que las células de Langerhans pertenecen al ratón receptor durante un periodo de al menos 18 meses, demostrando que, en condiciones de reposo, las células de Langerhans no son reemplazadas por precursores de médula ósea ¹¹⁴. Por otra parte, debido a que las

células de Langerhans de ratones quiméricos (a los cuales se les ha transferido médula ósea congénita) incorporan BrdU en proporciones similares a los del ratón control (no quimérico) en condiciones de reposo, existe la posibilidad de que las células de Langerhans sean reemplazadas por precursores presentes en la misma piel ya que están proliferando localmente. Además en ratones parabióticos, es decir que comparten la misma sangre en circulación, se observa que a los 10 días de parabiosis hay una completa mezcla de linfocitos B, T y granulocitos, mientras que las células de Langerhans no se mezclan en un periodo de al menos 6 meses. Esto confirma que los precursores de células de Langerhans no vienen de circulación (o médula ósea) en condiciones de reposo. No obstante, al inducirse inflamación o trauma en la piel, las células de Langerhans adquieren movilidad: extienden y retraen sus dendritas y migran de la epidermis. En este caso, sí hay reconstitución de células de Langerhans con precursores provenientes de sangre en un proceso dependiente del receptor de quimiocinas CCR2. Aunque la población de LC del ratón deficiente en este receptor no tiene deficiencias, el número de LC de ratones a los cuales se les ha transplantado médula ósea $CCR2^{-/-}$ está disminuido en un 75% comparado con el número de LC provenientes de médula ósea $CCR2^{+/+}$; y aunque la frecuencia de LC provenientes de médula ósea $CCR2^{-/-}$ incrementa con el tiempo hasta casi igualar al $CCR2^{+/+}$, este retraso indica la importancia de CCR2 para renovar la población de LC si bien otros receptores deben contribuir ^{114 115 118} **(Diagrama 1)**.

Diagrama 1



En condiciones de Reposo Una CL puede tardar en salir de la epidermis periodos de más de 18 meses. **1.** Las CL salen de la epidermis hacia la dermis en un proceso que no depende de CCR7. **2.** Luego, En un proceso dependiente de la interacción CCR7-CCL21 entran a los vasos linfáticos para migrar hasta los Ganglios linfáticos¹¹⁵. **3.** Precursores presentes en dermis son los encargados de renovar la población de Lc en condiciones de reposo¹⁰⁸.



En estado de Activación Una CL sale de la epidermis en cuestión de horas. **1.** Después de censar o captar un antígeno, Las CL salen de la epidermis hacia la dermis en un proceso que no depende de CCR7¹¹⁵, pero si de MMPs¹²² y MRP1¹²⁰. **2.** Luego, en un proceso dependiente de la interacción CCR7-CCL21 las CL entran a los vasos linfáticos para migrar hasta los ganglios linfáticos¹¹⁵. **3.** Precursores GR1⁺ CCR2⁺ presentes en sangre son los encargados de renovar la población de CL^{108,109,112}.

Al salir de la epidermis, las células de Langerhans pasan a dermis donde ingresan a vasos linfáticos; por tanto, es a través de la linfa que estas células llegan a ganglios linfáticos. Después de inducir inflamación por inmunización o por un trasplante alogénico, en la linfa se observa un gran número de neutrófilos y eritrocitos; además, también se pueden encontrar macrófagos y linfocitos. El encontrar eritrocitos en linfa podría indicar que la entrada de células a linfa se realiza por un mecanismo pasivo o no específico. De la misma manera, no se conoce aún si las CL se aproximan a los vasos linfáticos por quimiotaxis y luego ingresan a través de “huecos” entre células

endoteliales adyacentes; o si existen interacciones entre moléculas de células del endotelio y de las CDs. Lo que sí se conoce es que algunas moléculas de adhesión se encuentran involucradas en la migración de CDs, como por ejemplo ICAM1 expresada en el endotelio, aunque no es importante para la salida de la piel de células de Langerhans, si es importante para la entrada de éstas células a ganglios linfáticos ¹¹⁹; JAM-A retiene a las células en la epidermis. De esta manera, CDs deficientes en JAM-A muestran una aumentada motilidad in vitro y además, aunque su capacidad de migrar a través de endotelio vascular sanguíneo es igual a la de CDs de un ratón silvestre, cuando se utiliza endotelio vascular linfático, estas células incrementan su capacidad de transmigración ¹²⁰.

De igual manera, mediante estudios con células de Langerhans se conoce que las células dendríticas requieren de CCR7 para llegar a ganglios linfáticos, ya que el ratón CCR7^{-/-} tiene del 1-10% del número normal de CDs en éstos órganos linfoides ¹¹⁷. Aunque mediante cultivo de piel se ha demostrado que en el paso inicial, en el cual las células de Langerhans salen de la epidermis e ingresan a la dermis, este receptor de quimiocinas no es necesario, la llegada de células de Langerhans CCR7^{-/-} a ganglios linfáticos se encuentra en gran parte disminuida. Sumado a esto, normalmente en dermis, antes de ingresar a los vasos linfáticos, las células de Langerhans se alinean alrededor de éstos formando las estructuras conocidas como “cordones”. Así, las células de Langerhans del ratón deficiente en CCR7, no forman estas estructuras, indicando que la interacción de este receptor de quimiocinas con CCL21-leu (que es la que se expresa en vasos linfáticos) es importante para ingresar a los vasos linfáticos ¹²¹.

A pesar de que el aumento en la expresión de CCR7 suele estar relacionado con el incremento de moléculas coestimuladoras en la superficie de CDs, existen estímulos capaces de aumentar la expresión de este receptor independientemente del proceso de

maduración. Por ejemplo, la fagocitosis de células apoptóticas opsonizadas con iC3b regula negativamente la expresión de MHCII y CD86 en CDs inmaduras, aunque incrementa la de CCR7¹²². Además, las células dendríticas migran a ganglios linfáticos en ausencia de estímulos inflamatorios con el fin de mantener la homeostasis, y en este caso, CCR7 también es importante para la migración de CDs, ya que la población CD11c⁺MHCII^{hi} correspondiente a células de Langerhans que han migrado en estado de reposo, se encuentra ausente en los ganglios de este ratón¹²¹.

Varias moléculas inducen migración de CDs a ganglios linfáticos. Entre estas encontramos a la histamina y los leucotrienos, los cuales aumentan el flujo linfático. Prostaglandina E2 es capaz de aumentar la expresión de CCR7 cuando CDs derivadas de monocitos son inducidas a madurar con CD40L, y de incrementar la migración de CDs hacia ganglios linfáticos¹²³. Aunque las células de Langerhans del ratón deficiente en el receptor para prostaglandina E2 presentan disminución en su capacidad de migración¹²⁴, otros tipos de CDs no requieren de ésta molécula para responder a CCR7¹²⁵. La activación mediada por CCR7 también se encuentra mediada por los leucotrienos, lo cual ha sido demostrado utilizando el ratón deficiente para la proteína transportadora de leucotrieno 4 (LTC4), MRP1. Las células de Langerhans de este ratón son retenidas en la epidermis y llegan en un menor porcentaje a los ganglios linfáticos después de ser estimuladas. Además, aquellas que logran pasar a dermis, no forman “cordones” alrededor de los vasos linfáticos; sin embargo, la adición exógena de LTC4 restaura la migración de las células de Langerhans de estos ratones deficientes en MRP1 a ganglios linfáticos. Sumado a esto, la migración in vitro hacia CCL19 se encuentra afectada negativamente hasta en un 90%, no así la migración hacia CCL21. No obstante, esto no explica por qué las células de Langerhans no ingresan a los vasos linfáticos, ya que es CCL21 y no la quimiocina CCL19 la que se ha visto expresada en

vasos linfáticos ¹²⁶. Pese a esto, no se puede descartar un papel de CCL19 en la migración a través de éstos vasos, ya que es una quimiocina que las CDs secretan después de recibir estímulos de maduración, y que se ha visto además, es capaz de inducir, a bajas concentraciones, la rápida extensión de las dendritas en CDs maduras ¹²⁷.

Para la salida de CDs de la epidermis también es importante la acción de metaloproteasas. Así, en experimentos de cultivo de piel, el utilizar inhibidores para estas enzimas conduce a la retención de células de Langerhans en epidermis tanto de humano como de ratón. En este caso, las células que salen a la dermis logran formar los cordones, es decir que sí ingresan a los vasos linfáticos. Resultados congruentes se observan al realizar los ensayos con piel proveniente del ratón MMP 9^{-/-}, MMP que se expresa en células dendríticas de piel, demostrando la importancia de esta MMP en la salida de las células de la epidermis ¹²⁸. Moléculas como CD47 son además esenciales para la llegada de células dendríticas tanto a ganglios linfáticos como a bazo, órgano al cual ingresan a través de vénulas, es decir por vía sanguínea, no linfática. Congruente con esto, el ratón CD47^{-/-} tiene una drástica reducción de CDs en bazo y una acumulación de precursores de éstas células en sangre ¹²⁹.

Al igual que las células de Langerhans, las CDs derivadas de monocitos que migran hacia ganglios linfáticos requieren de CCR7 para realizar este proceso, sin embargo, el receptor CCR8 también es importante para la migración de estas células a estos órganos linfoides secundarios ¹³⁰. Asimismo, la interacción CXCR4-CXCL12 es necesaria para la migración de CDs de piel a ganglios linfáticos. Este receptor, al igual que CCR7, incrementa tras estímulos de maduración y su ligando único se ha visto expresado en vasos linfáticos de piel. La importancia de esta interacción se refleja en el menor número de CDs que llegan a ganglios linfáticos después de un estímulo en ratones que

han sido tratados con un antagonista para CXCR4 y en una disminución en su respuesta de hipersensibilidad por contacto ¹³¹.

A pesar de que la activación de LT requiere la presentación de antígeno por parte de las CDs, y éstas a su vez requieren de CCR7 para migrar a ganglios linfáticos, el ratón *plt/plt*, que no tiene CCL19 ni CCL21-ser, presenta una retrasada, pero fuerte y prolongada respuesta de hipersensibilidad por contacto, demostrando que en este caso la llegada de células al ganglio y las interacciones CD-LT no dependen ni de CCL19 ni de CCL21 ¹³².

3.3 Células dendríticas dentro de los ganglios linfáticos

Las CDs ingresan a ganglios linfáticos mediante los vasos linfáticos aferentes, donde se encuentra expresión de CCL21. Además de la continua migración de células de Langerhans a ganglios linfáticos en estado de reposo, las CDs que se encuentran en ganglios linfáticos y en bazo se están reemplazando constantemente mediante la llegada de células que provienen de precursores que se encuentran en sangre. Una vez en los órganos linfoides, las CDs tienen la capacidad de proliferar un número limitado de veces y de traspasar el complejo MHC-péptido a las células hijas con el fin de prolongar la presentación antigénica ¹¹³.

En estado de reposo, las CDs que residen dentro del ganglio linfático se mueven lentamente. Aunque se localizan en varias zonas del ganglio, las CDs se encuentran con mayor densidad entre el borde de las zonas T y los folículos B. Por el contrario, las células dendríticas que han llegado al ganglio después de ser activadas se mueven más rápido y se dispersan en las zonas T, para después de cierto tiempo comenzar a moverse más lentamente ¹³³. CCL19, que es una quimiocina que puede ser secretada por CDs maduras, induce que los linfocitos T incrementen su capacidad de escanear CDs de

manera independiente de antígeno, aumentando así la probabilidad de encuentro con un antígeno “correcto” ¹³⁴.

En ausencia de antígeno exógeno, las CDs inmaduras son capaces de inducir señales en los LT a través de la interacción ICAM1-LFA1, que inducen la movilidad y el aumento transitorio de flujo de calcio en los linfocitos T, así como el incremento en la expresión de CD69. Estas respuestas inducidas por CDs inmaduras son más intensas en LT de memoria, y las quimiocinas CCL17 y CCL22, dos quimiocinas que son producidas por CDs inmaduras, tienen un papel importante en provocar este tipo de respuestas en estos LT de memoria ¹³⁵.

3.4 Proceso de presentación antigénica por células dendríticas

Debido a que son las únicas APCs capaces de migrar a ganglios linfáticos, que es el lugar donde se encuentran los linfocitos T vírgenes, y a que cuentan con las moléculas adecuadas para inducir la coestimulación de linfocitos T y conducirlos a activación o tolerancia, las CDs son las APCs que dirigen el tipo de respuesta inmune que se debe generar hacia determinado antígeno (Figura 5). Estas APC están dotadas con facultades que les permiten muestrear su entorno continuamente en búsqueda de antígenos. De esta manera en el intestino, las CDs son capaces de separar las uniones entre las células epiteliales para muestrear la mucosa intestinal y así atrapar bacterias. Esto lo hacen gracias a que expresan proteínas de uniones estrechas que les permiten establecer interacciones con las células epiteliales, abriéndose espacio hacia el lumen intestinal sin dañar la integridad del tejido ¹³⁶. Por otra parte, en las zonas T de los ganglios linfáticos, las células dendríticas residentes son capaces de atrapar antígenos solubles que ingresan vía aferentes linfáticos antes de que las CD que han atrapado el antígeno en periferia lleguen al ganglio ¹³⁷.

Después de captar el antígeno, la CD debe interactuar con el linfocito T mediante el complejo MHC-Péptido, lo cual, en caso de haber reconocimiento por parte del TCR genera la “señal 1”; ésta es mediada por moléculas de adhesión como integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ y miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, CD2, CD50, CD54 y CD58 ⁴ Después, la “señal 2”, que se refiere a la coestimulación, puede ser generada si existe un contexto inflamatorio que induzca señales a través de los TLRs sobre la CD. En esta señal, las moléculas coestimuladoras de la CD, CD80 y CD86 se unen a su ligando CD28 sobre el linfocito T, quien a su vez puede activar a las CD a través de la interacción CD40L-CD40,

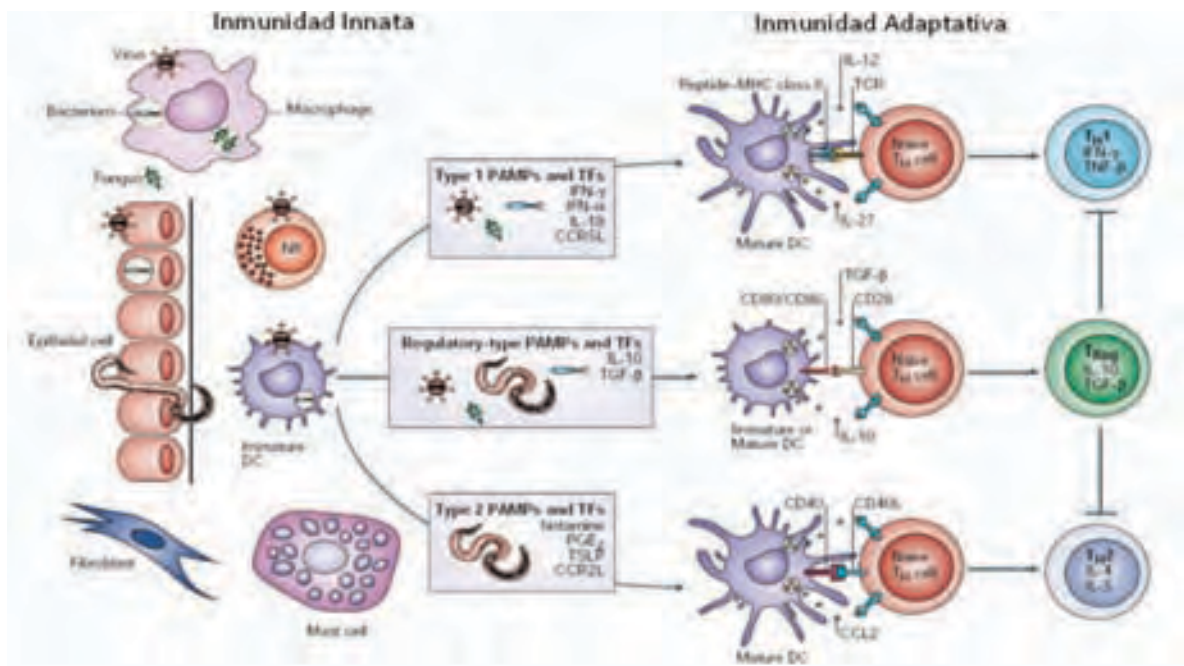


Figura 5. Las células dendríticas polarizan la respuesta inmune dependiendo del antígeno y del sitio de activación. Existen PAMPs tipo 1 y tipo 2, además de Factores Tisulares (TF) que inducen que la CD promueva una respuesta de linfocitos T tipo TH1, TH2 o de una células T reguladoras. Algunos antígenos pueden inhibir la maduración de las CDs, resultando una CD reguladora inmadura. Los factores tisulares pueden ser producidos por varios tejidos y células inmunes incluyendo células epiteliales, células

NK, Mastocitos y macrófagos entre otras. Estos factores pueden ser antígenos tipo 1 o tipo 2. Tomado de Kapsenberg, 2003.

induciendo un incremento en la expresión de CD80 y CD86, además de la secreción de citocinas como TNF- α , IL-12. Horas después, la producción de IL-12 disminuye a la vez que los linfocitos T aumentan la de IL-4 y adquieren un fenotipo de memoria no polarizado. La presencia de CD80 y CD86 en la CD no siempre genera activación de los linfocitos, ya que éstos tienen otro ligando para las moléculas coestimuladoras: CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) el cual se expresa en linfocitos T activados empleándose para apagar la activación que culmina ya sea en muerte o en estado de anergia ¹³⁸.

En estado de reposo las CDs están escaneando constantemente el ambiente en búsqueda de antígenos, los cuales son presentados sin generar activación de los linfocitos T. Las células apoptóticas son una importante fuente de éstos antígenos, que contribuyen a mantener la homeostasis. De esta manera, el fagocitar únicamente células apoptóticas no es suficiente para inducir la expresión de MHCII ni moléculas coestimuladoras en la superficie de la CD, aunque sí se produce un aumento en la expresión de CCR7. Por el contrario, se ha visto que si se activan TLRs al tiempo que se toman estas células, sí se genera maduración de CDs. Además, la señalización a través TLRs incrementa la capacidad coestimuladora y presentadora de las CD debido a que aumenta su habilidad para secretar citocinas y quimiocinas ¹³⁹. Sumado a esto, CDs activadas a través de TLR3 pueden activar células NK y NKT, indicando que la activación de los TLR capacita a las CD para incrementar la respuesta inmune ¹⁴⁰.

Adicionalmente, las CD_s maduras pueden secretar exosomas cargados con complejos MHC-péptido, los cuales pueden ser capturados por otras CD_s receptoras, y presentados para inducir la activación de linfocitos T^{141 142}. Estas vesículas se encuentran además cargadas con moléculas de adhesión como CD11a e ICAM1 entre otras, involucradas en la captura de los exosomas por las CD_s receptoras y en la activación de los linfocitos T¹⁴³.

Por otra parte, uno de los mecanismos de presentación antigénica más importantes para generar tolerancia es la presentación cruzada. En éste, las CD_s son capaces de tomar estos antígenos, que serían antígenos exógenos (ya que no son sintetizados por ella misma), acoplarlos en moléculas MHC-I y migrar a LN para presentarlos a los LTCD8. Así por ejemplo, de no ser por las CD_s, las células infectadas con virus o células tumorales no podrían ser vistas por los LTCD8 vírgenes y la respuesta citotóxica no se generaría^{144 145}.

3.5 Maduración de células dendríticas inducida por quimiocinas.

La maduración de CD_s puede ser inducida por citocinas como IL1b, TNF α y CD40-L o moléculas como LPS y secuencias CpG entre otras. El receptor CXCR4, al igual que CCR7, aumenta su expresión en la superficie de CD_s tras estímulos de maduración. Éste es un receptor que recientemente se ha involucrado en procesos de maduración de CD_s, de tal manera que el número tanto de CD_s maduras derivadas de médula ósea como el de células de Langerhans maduras se ve disminuido por acción de un antagonista de CXCR4. Además, debido a que las células de Langerhans no proliferan al ser cultivadas *in vitro*, la disminución del número de células en cultivo de este tipo de células indica que CXCR4 tiene un papel en la supervivencia de CD_s¹⁴⁶.

Por otra parte, CD_s de pulmón CCR5^{-/-} son menos eficientes que las CD_s del ratón silvestre en capturar FITC-dextran. Estas células que no fagocitan esta molécula expresan una menor cantidad de los marcadores de maduración CD86 y MHCII, contrario a lo que sucede con las CD_s del ratón de la cepa silvestre. Además, las CD_s de pulmón de los ratones CCR5^{-/-} y CCL5^{-/-} llegan con menor eficiencia a ganglios linfáticos. De esta manera, CCR5/CCL5 están involucrados tanto en la migración como en la maduración de CD_s pulmonares¹⁴⁷. Además, la activación de CCR5 mediada por una ciclofilina derivada de *Toxoplasma gondii* induce la producción de altos niveles IL12 por CD_s CD8⁺^{148 149}.

CCL16 es una quimiocina que se une a los receptores CCR1, CCR2, CCR5 y CCR8. La estimulación de CD_s inmaduras derivadas de monocitos humanos con esta quimiocina, aumenta los niveles de MHCII, CD80, CD86 y CD83 así como el de CCR7 y CXCR4. Estas CD_s maduras a través de CCL16 conservan la expresión de CCR5 y expresan de novo CCR6. Además estas células son capaces de inducir proliferación alogénica de linfocitos T al mismo nivel de CD_s inducidas a madurar con TNF α e IL1b¹⁵⁰.

La quimiocina CCL19 aumenta la proliferación de linfocitos T inducida por CD_s. Además, tanto CCL19 como CCL21 son capaces de inducir un aumento en la expresión de CD86 y CD40 en CD_s en un mecanismo dependiente de proteínas G e independiente de LPS. Sumado a esto, CCL19 aumenta la secreción de citocinas como IL-12 e IL-1 β y TNF- α por CD_s además de conducir la respuesta a TH1. Congruente con estos datos, en el ratón plt/plt, CD_s estimuladas a través de TLRs llegan a ganglios linfáticos en un estado semimaduro¹⁵¹.

3.6 Otros papeles de CCL19, CCL21 y CCR7 sobre Células Dendríticas

Las quimiocinas son citocinas que además de inducir migración de CD8, actúan sobre estas generando múltiples respuestas. De esta manera, por su importante papel en el reclutamiento de CD8 maduras hacia ganglios linfáticos, CCR7 ha sido ampliamente estudiado. Tras la estimulación con bajas concentraciones de CCL19 se inducen señales que conducen a la extensión de las dendritas en CD8 maduras, lo cual probablemente aumenta la capacidad de contacto con linfocitos T. Por el contrario, se requieren cantidades superiores de CCL21 para generar este efecto (121). Sumado a esto, las señales a través de CCR7 dirigen de manera independiente la velocidad y la quimiotaxis de las CD8¹⁵².

Aunque el proceso de maduración de CD8 va acompañado por una disminución en la capacidad de estas células para capturar antígenos, se ha observado que tanto CCL19 como CCL21 incrementan la capacidad de CD8 maduras para endocitar FITC-dextran mediante la activación de Rac y Cdc42, en un mecanismo que depende de proteínas G¹⁵³.

La activación de CCR7 también conduce a la protección contra la apoptosis al incrementar la fosforilación de AKT1 de manera persistente. Esta molécula fosforila a la cinasa I κ B, la cual a su vez fosforila y degrada a I κ B liberando a NF κ B que subsecuentemente se transloca al núcleo para inducir la transcripción de genes antiapoptóticos. La activación de AKT1 por CCL19 y CCL21 es dependiente de proteínas G y asimismo, el bloquear PI3K abate el efecto antiapoptótico ejercido por las quimiocinas¹⁵⁴.

3.7 Células dendríticas y Jak3

Poco se conoce acerca del papel de Jak3 en CDs. Esta tirosina cinasa se expresa a bajos niveles en CDs derivadas de monocitos humanos, pero aumenta sus niveles después de activar a las células con LPS. En contraste, Jak3 se expresa en bajos niveles en CDs derivadas de médula ósea inmaduras y estos niveles de expresión no cambian durante la maduración ⁸⁸.

Se sabe que la maduración de CDs en ratones Jak3^{-/-} no se afecta de manera negativa cuando IL4 (citocina que posee dos receptores, uno de los cuales utiliza la cadena γ acoplada a Jak3), es utilizada para obtener e inducir maduración de CDs ⁹³. Contrario a esto, cuando la maduración es inducida por CD40-L, no se observa un incremento de las moléculas coestimuladoras CD83, MHCII, CD80, CD86 y CD40 en la superficie de CDs derivadas de monocitos humanos que han sido tratadas con el inhibidor de Jak3 WHI-P-154. Congruente con este dato, estas células inhibidas no inducen proliferación de linfocitos T alogénicos ^{12 155}. Por otra parte, se ha reportado que el bazo de ratones Jak3 deficientes tiene un menor número de células dendríticas, pero que éstas se encuentran activadas al contar con marcadores de maduración como MHCII, CD80, CD86 y CD40. Además tanto CDs derivadas de médula ósea del ratón Jak3^{-/-} como las CDs derivadas de monocitos humanos tratadas con el inhibidor de Jak3, conservan su capacidad fagocítica ^{88 155}.

Por otra parte, contrario a lo que sucede en linfocitos T, Jak3 regula negativamente la supervivencia de CDs, es decir que Jak3 promueve la apoptosis; así en su ausencia, los niveles de apoptosis se ven disminuidos debido a que hay menor expresión de los factores proapoptóticos BAX y BAK. Además, las CDs deficientes en Jak3 producen mayores cantidades de IL12 e IL10 tras la estimulación de TLRs aunque *in vivo* conducen la respuesta inmune hacia TH1 ⁸⁸.

VI. Hipótesis

La ausencia de JAK3 afectara negativamente el proceso de maduración de Células Dendríticas y la función de migración mediada por quimiocinas.

VII. OBJETIVO GENERAL

Definir el papel de Jak3 en los proceso de maduración y migración de células dendríticas durante la respuesta inmune innata.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar el proceso de maduración de células dendríticas inducido por LPS en ausencia de Jak3.
- Estudiar la capacidad de las células dendríticas deficientes en Jak3 para migrar hacia las quimiocinas CCL19 y CCL21 *in vitro*
- Evaluar el papel de Jak3 en la migración *in vivo* de células dendríticas maduras hacia los órganos linfoides secundarios.
- Analizar la capacidad de activación de linfocitos T mediada por células dendríticas deficientes en Jak3.

V. JUSTIFICACIÓN

Las Células Dendríticas (CDs) se encuentran prácticamente en todos los tejidos donde cuentan con mecanismos para atrapar antígenos tanto en procesos de inflamación como en homeostasis. Al tener la capacidad de ingresar a los ganglios linfáticos y conducir a los linfocitos T vírgenes (LT) a adquirir características de células efectoras o tolerantes, las CDs son las APC que dirigen la respuesta inmune.

En periferia, las CDs tienen un fenotipo denominado “inmaduro” en el cual cuentan con una maquinaria completa para tomar antígenos, procesarlos y acoplarlos a moléculas de MHC en su superficie, lo cual les permitirá presentar antígenos a los linfocitos T. Para llegar e ingresar a los ganglios linfáticos, las CDs deben ser capaces de recibir señales proporcionadas por las quimiocinas CCL19 y CCL21. Para este fin, tras un estímulo de maduración que puede consistir en PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) como LPS, secuencias CpG entre otros; o en citocinas como TNF- α y CD40-L, las CDs cambian el repertorio de receptores de quimiocinas en su superficie pasando de expresar CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2 y CXCR4, a aumentar la expresión de CXCR4 y CCR7. Este último, es el receptor de CCL19 y CCL21, las cuales se expresan en órganos linfoides (CCL19 y CCL21-Ser) y en vasos linfáticos (CCL21-Leu). Las quimiocinas actúan a través de receptores de 7 hélices transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas. Sin embargo, recientemente se ha visto que receptores como CCR2, CCR5, CXCR4, CCR9 y CCR7 utilizan la vía Jak/STAT. En nuestro laboratorio particularmente se ha observado que Jak3 se encuentra involucrado en la señalización de CCR7 en timocitos y linfocitos de periferia. Así, en estas células, esta cinasa se fosforila tras la estimulación con las quimiocinas CCL19 y CCL21. Además, la ausencia de Jak3 disminuye notablemente la migración de estas células hacia estas quimiocinas. Adicionalmente, células

progenitoras del ratón $Jak3^{-/-}$ presentan deficiencias en el *homing* hacia órganos linfoides.

Por otra parte, se ha observado que CCL19 y CCL21 inducen la maduración de CD4⁺ T_H17 al promover el aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras en la superficie de estas células. Así, teniendo en cuenta que Jak3 se encuentra en la vía de señalización de CCR7; por ser la interacción CCL19/CCL21-CCR7 uno de los principales mecanismos utilizados por las CD4⁺ T_H17 para llegar a los ganglios linfáticos; y por estar estas quimiocinas involucradas en la maduración de CD4⁺ T_H17, decidimos estudiar el papel de Jak3 en la maduración y migración de este tipo de células.

VI. HIPÓTESIS

La ausencia de JAK3 afectara negativamente el proceso de maduración de Células Dendríticas y la función de migración mediada por quimiocinas.

VII. OBJETIVO GENERAL

Definir el papel de Jak3 en los proceso de maduración y migración de células dendríticas durante la respuesta inmune innata.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar el proceso de maduración de células dendríticas inducido por LPS en ausencia de Jak3.
- Estudiar la capacidad de las células dendríticas deficientes en Jak3 para migrar hacia las quimiocinas CCL19 y CCL21 *in vitro*
- Evaluar el papel de Jak3 en la migración *in vivo* de células dendríticas maduras hacia los órganos linfoides secundarios.
- Analizar la capacidad de activación de linfocitos T mediada por células dendríticas deficientes en Jak3.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

DERIVACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS A PARTIR DE CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA

Se utilizaron ratones deficientes en Jak3 procedentes de los Jackson Laboratories (Bar Harbour, ME, USA) y ratones GFP⁺ provenientes del laboratorio del Dr. Megumi Okawa (Okasawa University). Los ratones C57BL/6 se adquirieron en laboratorios Jackson (Bar Harbour, ME). Los experimentos fueron realizados con ratones entre 8-12 semanas de edad los cuales fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo los lineamientos institucionales.

Para derivar células dendríticas (CDs) a partir de médula ósea se obtuvo fémures y tibias de ratones Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-} en RPMI 10% Suero Fetal Bovino (SFB). Luego, haciendo uso de una jeringa de 5 ml se drenó la médula ósea con RPMI sin SFB y se lavó centrifugando 5 min. a 1700-1900 rpm y resuspendiendo en 5 ml de medio. Enseguida la médula se disgregó en jeringa con 5 ml RPMI sin SFB y se lavó nuevamente. (En este punto, se sacó una alícuota de 100 µl la cual fue centrifugada y resuspendida en buffer de lisis de eritrocitos (Cloruro de amonio 0.83%) para el recuento de las células). Por último las células se resuspendieron en 10 ml de RPMI con 10% de suero SFB y 15% de sobrenadante de células CHO-GMCSF (ver adelante), a una densidad de 1×10^6 células por ml. Al tercer día se adicionó 8 ml de RPMI suplementado con 10% SFB y 15% de sobrenadante CHO-GMCSF. Al quinto día las células se marcaron para citometría de flujo (FACS) con anti-

CD11c, anti-CD80, anti-CD86 y anti-MHCII (ver adelante) para verificar la presencia de CDs inmaduras. Además, al día 5 se adicionó 1 µg/ml de LPS de *E. coli* 0111:B4 y 24h después se marcó las células para verificar su maduración.

MARCAJE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Las CDs derivadas de médula ósea se mezclaron cuidadosamente sin pipetear. Una alícuota fue tomada para hacer el recuento con azul de tripano poniendo una relación 1:1 colorante:células. En el marcaje de células de bazo o de ganglios mesentéricos, estos órganos se extrajeron ya sea en RPMI o en PBS y se disgregaron con malla de nylon.

La tinción se realizó en placas de 96 pozos poniendo en cada uno el mismo número de células (3×10^5), las cuales se lavaron previamente con buffer de FACS centrifugando 5 minutos a 1500-1700 rpm (PBS 1x, Suero fetal bovino 2%, Azida de sodio 0.02%). Luego, las células fueron resuspendidas en 20 µL de las diluciones del (los) anticuerpo (s) a utilizar. Se incubó 15-20 min. a 4°C en oscuridad y se lavó con 100 µl de Buffer de FACS. Seguido a esto, cuando fue necesario, se resuspendieron las células en 20 µl de la dilución adecuada de anticuerpo secundario o estreptavidina. Se incubó 20 min. a 4°C y se lavó con 100 µl de buffer de FACS. La fijación se realizó con paraformaldehído al 1% en PBS.

En este trabajo se utilizaron los siguientes anticuerpos:

1. Anti- CD86 Pe, catálogo 553692 Pharmingen (BD) uso: 1/200.
2. Anti- CD80 Pe, catálogo 553769 Pharmingen (BD) uso: 1/200.
3. Anti- IA/IE (2G9) Biotinilado, catálogo 553622 Pharmingen (BD) uso: 1:400.
4. Anti- CD11c Pe, catálogo 557401 Pharmingen (BD) uso 1/400.

5. Anti- CD11c FITC, catálogo 557400 Pharmingen (BD) uso 1/100.
6. Estreptavidina APC, catálogo 554067 Pharmingen (BD) uso 1/400.

El citómetro de flujo FACS Cálibur de BD y el programa CellQuest Pro o Flowjo fueron utilizados para analizar las muestras.

ENSAYOS DE MIGRACIÓN IN VITRO: QUIMIOTAXIS

Los ensayos de migración *in vitro* se realizaron en cámara de Boyden utilizando una membrana de nitrocelulosa con poro de $0.5\mu\text{c}$. CDs derivadas de médula ósea, tanto maduras como inmaduras se resuspendieron en HBSS sin Ca^{++} y sin Mg^{++} a una densidad de 5×10^6 células por ml, para ser marcadas con calceína durante 15 minutos. Pasado este tiempo, las células se lavaron y se resuspendieron en HBSS con Ca^{++} y con Mg^{++} a una densidad de 2×10^6 células por ml. En la parte inferior de la cámara se adicionaron diferentes concentraciones de quimiocina, que van desde 10 ng/ml hasta 1000 ng/ml. 50 μl de la suspensión de células fueron adicionadas en la parte superior de la cámara. Estas células están separadas de la quimiocina por la membrana de nitrocelulosa. Su capacidad de responder al quimioatrayente y consecuentemente atravesar la membrana se determinó por medio de un detector de fluorescencia FX Bio-Rad Hercules, CA.

ENSAYOS DE MIGRACIÓN IN VIVO

Se obtuvieron ratones $\text{Jak3}^{-/-}\text{-GFP}^{+}$ al cruzar ratones deficientes en Jak3 con ratones que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor de actina. Se derivaron CDs

de médula ósea de ambos ratones y se hicieron madurar como se explicó anteriormente. 1×10^6 células fueron resuspendidas en 70 μ l de PBS e inyectadas en el cojinete plantar derecho de ratones C57BL/6. El cojinete izquierdo fue inyectado con PBS solo. A diferentes tiempos (24, 36, 48 y 72 h) después de la transferencia de CDs maduras, los ganglios poplíteos fueron extraídos, macerados y analizados por citometría de flujo para evidenciar la presencia de células GFP⁺.

CULTIVO DE PIEL

Las orejas de ratones Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-} se desinfectaron con etanol al 75%. Posteriormente las orejas se separaron en sus partes dorsal y ventral y fueron colocadas flotando sobre 3ml de RPMI suplementado con 10% SFB. El tejido se incubó a 37°C 5% CO₂ y a las 24 y 48h después se obtuvieron pedazos de piel que fueron procesados para la extracción de epidermis como se describirá en seguida en el protocolo de inmunohistoquímica de láminas epidérmicas.

INMUNOHISTOQUIMICA DE LÁMINAS EPIDÉRMICAS

Para la obtención del tejido que se utilizó en los ensayos de DTH, las orejas de ratones Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-} fueron extraídas y depiladas para luego, sin separarlas en sus partes dorsal y ventral, se hacen cortes de $\pm 1 \text{ mm}^2$. Cortes de este mismo tamaño son obtenidos de la piel proveniente de cultivo que sí ha sido separada en sus partes dorsal y ventral. Los pedazos de piel se sumergieron en ácido etilendiamina (EDTA) y se incubaron de 10-13 min a 65°C. Pasado este tiempo se separó la epidermis de la dermis raspando suavemente el

tejido con una jeringa de insulina. Enseguida se lavó con PBS y se fijó con acetona 10-15 min. En los experimentos en los que se utiliza la dermis, ésta también se fijó con acetona y luego se congeló en Tissue teck para realizar posteriormente cortes en criostato.

Para bloquear la peroxidasa endógena se utilizó Peróxido de Hidrógeno al 3%. Posteriormente se bloqueó con PBS + BSA 0.1% + Tween 0.05% y en este mismo buffer se resuspendió el tejido con la dilución de los anticuerpos a utilizar:

- anti-I-A/I-E (2G9) biotinilado cat# 553622 BD uso 1:50.
- Estreptavidina-HRP RPN 1231 Amersham uso 1:1000.
- DAB cat No. 93-1143 zymed.
- anti-Langerina (CD207) cat. No. 14-2073-82 from bioscience uso 1:500.
- FITC-Goat anti-rat cat No. 62-9511 from Zymed uso 1:500.

El tejido se dejó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario y con el secundario 1h a 37°C o 30 min en el caso de la estreptavidina. Las muestras se montaron con resina o con vectashield (invitrogen) cuando fueron marcadas con Isocianato de Fluoresceina.

ENSAYOS DE LINFOPROLIFERACIÓN POR REACCIÓN LEUCOCITARIA MIXTA (MLR).

Para realizar este ensayo se utilizaron mCDs, es decir células que han sido estimuladas durante 24h con de 1000 ng/ml de LPS provenientes de ambos tipos de ratones Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-}. Debido a que el ratón deficiente en Jak3 tiene un fondo genético C57BL/6, y es de éste del cual se derivan las células dendríticas, los linfocitos T fueron obtenidos de bazos de ratones Balb/c ANN mediante tamizaje utilizando un anticuerpo anti-B220. Éste anticuerpo

(anti-B220) es incubado en una placa para cultivo de bacterias toda la noche en PBS a 4°C. Pasado el tiempo de incubación el anticuerpo se retiró y se adicionó el macerado de células de bazo obtenidas previamente en RPMI 10% SFB. Se incubó a 37°C 5% CO₂ en RPMI 10% SFB durante 40-60 minutos, tiempo después del cual se retiró la suspensión celular correspondiente a linfocitos T. Una alícuota de estas células fue marcada con anti-CD4-Pe (cat No. 553653 BD Pharmingen) y anti-CD8 Pe-Cy5 (cat No. 553034 BD Pharmingen) provenientes de BD Pharmingen para verificar la pureza de la población. Estos linfocitos son marcados con Carboxi-fluorescein-diester-amida (CFSE Molecular Probes, ver más adelante).

Para evaluar la linfoproliferación varias relaciones de CDs:LT (1:1, 1:2, 1:4, 1:10 y 1:20) fueron utilizadas. La cantidad de linfocitos en cada pozo es de 1×10^5 células por pozo, y es un número constante. Como control negativo se dejaron linfocitos sin mCDs.

Los días 5, 6 y 7 después de haber iniciado el ensayo de linfoproliferación, se retiraron las células de los pozos y se tiñeron con α CD4 Pe y α CD8 Pe-Cy5. Las células fueron analizadas en un citómetro FACS Calibur para evaluar la pérdida de intensidad de fluorescencia de CFSE, la cual es directamente proporcional a la linfoproliferación.

TINCIÓN CON CARBOXI-FLUORESCEIN-DIESTER-AMIDA (CFSE)

Las células fueron lavadas dos veces con PBS estéril y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min. Al pellet de células obtenido se le adicionaron de 20µl-40µl de la dilución 1:200 de CFSE y se incubó 5 min. a 37° 5% CO₂ en oscuridad. Pasado este tiempo, la suspensión se

agitó y se incubó otros 5 min. Luego se adicionaron 100 μ l de SFB frío para detener la reacción y se lavó dos veces con 1 ml RPMI 10% SFB.

ENSAYOS DE VIDEOMICROSCOPIA.

5×10^5 células dendríticas inmaduras fueron expuestas toda la noche al péptido OVA (323-339) a una concentración de 100nM en 2 ml de RPMI 10%SFB y al mismo tiempo estimuladas con 1 μ g/ml de LPS. Las células fueron lavadas dos veces con PBS y 1.5×10^5 de células fueron colectadas en 500 μ l de PBS para ser inmovilizadas durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂ en laminillas previamente tratadas con fibronectina (esta incubación se hace con el fin de que las CD se adhieran a la laminilla). Pasado el tiempo de incubación, el PBS es removido y reemplazado por RPMI 10%SFB para ser incubado durante 5 minutos mas. 350 μ l de linfocitos T CD4 (7.5×10^5 células/ml) provenientes de ratones OTII separados previamente con columnas MACs se adicionaron al tiempo 0 sobre la laminilla en RPMI, 10% SFB. La videomicroscopía fue realizada usando un microscopio de epifluorescencia Leica DM IRBE equipado con un objetivo de 63x, con apertura numérica de 1.32 y una cámara acoplada con un sistema de enfriamiento. Se tomó 1 imagen cada minuto durante 2 horas. El análisis se realizó usando el software MetaMorph.

ENSAYOS DE LINFOPROLIFERACIÓN CON RATONES OTII.

Linfocitos T CD4 de ratones OTII fueron extraídos de los ganglios linfáticos utilizando columnas MACS para ser posteriormente marcados con CFSE y finalmente resuspendidos en RPMI, 10%SFB. Diferentes relaciones de CD:LT fueron probadas (1:2, 1:5, 1:10 y 1:20)

con diferentes dosis de péptido OVA (323-339). Las células se cultivan durante 3 días y su fluorescencia es analizada en FACS Calibur, BD.

TINCIÓN CON ANEXINA V

Linfocitos T CD4 de ratones OTII fueron extraídos de los ganglios linfáticos utilizando columnas MACS y finalmente resuspendidos en RPMI 10% SFB. Diferentes relaciones de CD:LT fueron probadas (1:2, 1:5, 1:10 y 1:20) con diferentes dosis de péptido OVA (323-339). Las células se cultivan durante 3 días. Pasado este tiempo, las células del cultivo se marcaron con anti-CD4 y anti-CD11C a 4°C y posteriormente con anti-anexina-V a temperatura ambiente. Las células fueron analizadas inmediatamente en FACS calibur, BD.

ENSAYO DE HIPERSENSIBILIDAD DE TIPO RETARDADO

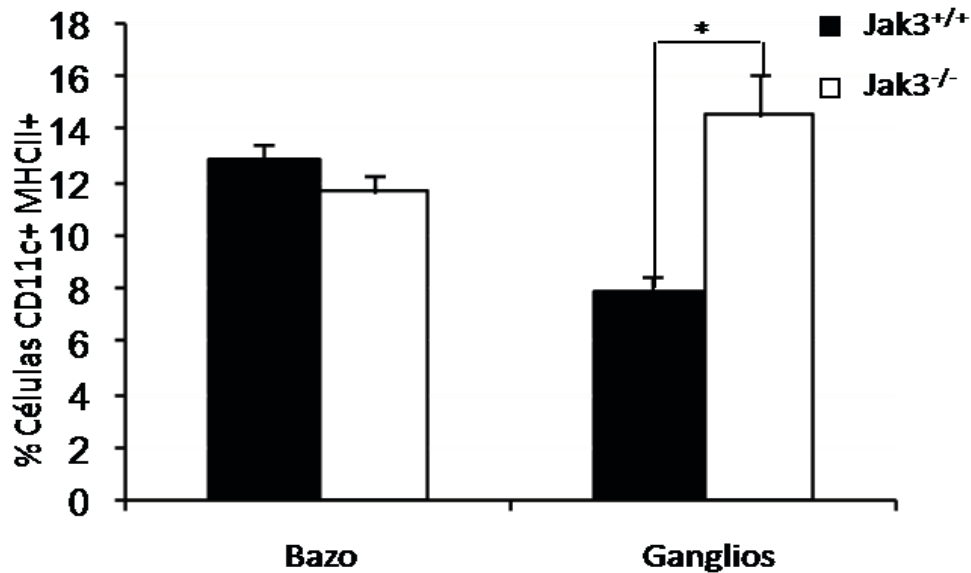
La etapa de sensibilización se indujo administrando 10µl de Dinitro-fluoro-benceno al 1% diluido en Acetona : Aceite de oliva (4:1) sobre la oreja izquierda del ratón. Para la etapa de reto se utilizaron 5ml de la misma solución, los cuales fueron aplicados 5 días después de la sensibilización. 6 horas (tiempo corto) y 72 horas (tiempo largo) después del reto, los ratones fueron sacrificados para obtener la oreja sobre la cual se puso el reto. El tejido se cortó en pedazos de aproximadamente 1 mm² y se siguió el protocolo de inmunohistoquímica de láminas epidérmicas. Otra parte del tejido se fijó en paraformaldehído al 4% para luego ser incluidos en parafina y cortados en el microtomo para realizar tinciones con hematoxilina/eosina. Se calculó el grosor del tejido midiendo la distancia desde el pericondrio hasta la membrana basal, haciendo uso del programa Motic Image plus 2.0. Sumado a esto se hizo el recuento de las células reclutadas al tejido.

IX. RESULTADOS

1. **Jak3 no es necesario para la generación de células dendríticas ni in vitro ni in vivo.**

La población de células dendríticas en el ratón Jak3 deficiente no ha sido totalmente caracterizada. O'shea et. al. en el 2006 examinó el porcentaje de esta población en bazo llegando a la conclusión de que el ratón deficiente en Jak3 tienen un menor porcentaje de células dendríticas en este órgano linfóide secundario, aunque los niveles marcadores de maduración como CD40, CD80, CD86 y MHCII se encuentran aumentados. De manera similar, en este trabajo analizamos por citometría de flujo, en órganos linfoides secundarios y en epidermis, el porcentaje de células dendríticas (el número en el caso de la epidermis) y el nivel de sus marcadores de maduración en ratones deficientes en Jak3 y lo comparamos con los datos provenientes de la cepa silvestre. Contrario a lo reportado, no detectamos diferencias en el porcentaje de células CD11c⁺ MHCII⁺ (es decir células dendríticas) en bazo; sin embargo, observamos un incremento significativo en el porcentaje de células dendríticas en ganglios linfáticos mesentéricos provenientes del ratón Jak3^{-/-} (**Figura 1a**). No se observaron diferencias en la expresión CD86 ni en bazo ni en ganglios mesentéricos; sin embargo en bazo, CD80 se encuentra levemente aumentado (**Figura 1b**). Para determinar el número de células dendríticas de piel, separamos la epidermis de la dermis como se describe en materiales y métodos, y marcamos la epidermis tanto con α -Langerina como con α -MHCII. Después, se realizó el recuento de células dendríticas en un área de 1mm² con un objetivo de 40X, evidenciando que no existen diferencias en el número de células dendríticas provenientes del ratón C57BL/6 y el deficiente en Jak3 (**Figura 9**).

1a.



1b.

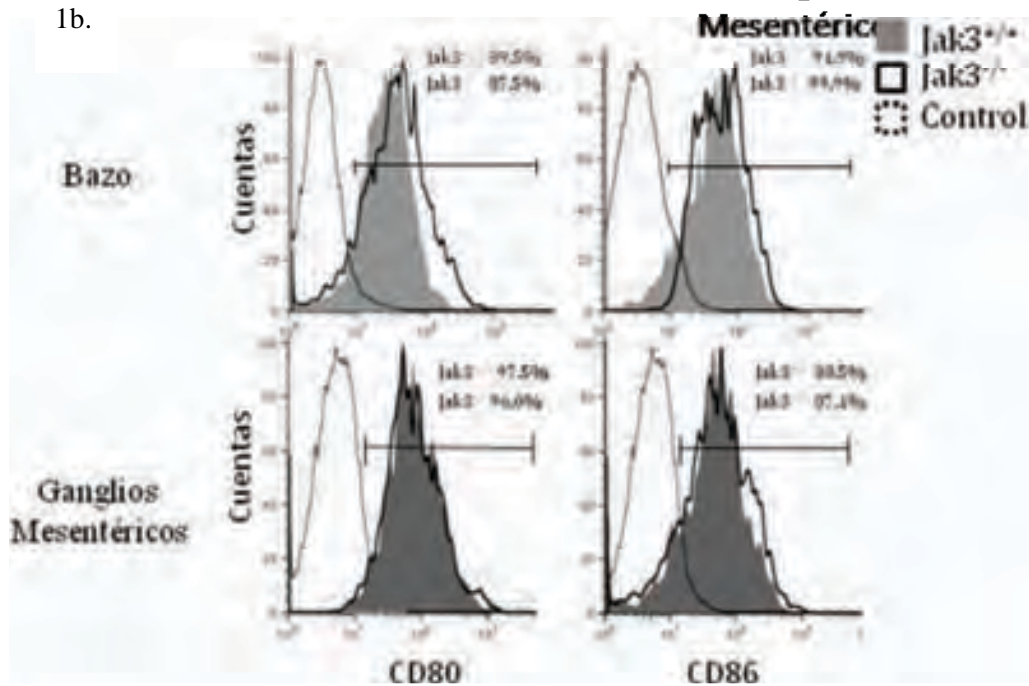
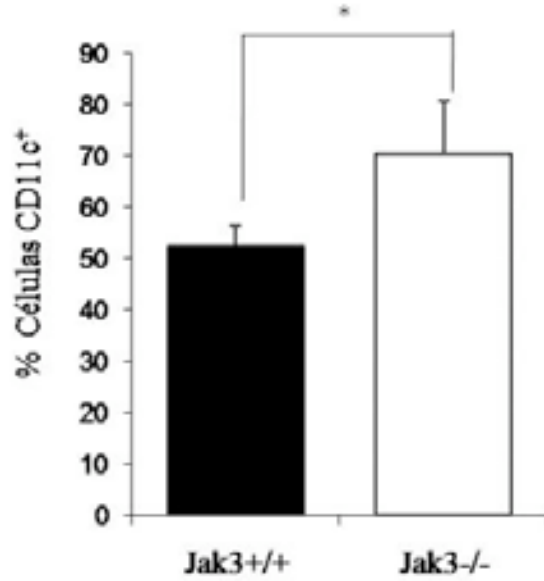


Figura 1a y b. *No hay diferencias entre el porcentaje de células dendríticas de bazo del ratón $Jak3^{+/+}$ y $Jak3^{-/-}$; sin embargo, el porcentaje es mayor en ganglios linfáticos mesentéricos del ratón $Jak3^{-/-}$.* Las células fueron extraídas y marcadas con anti-CD11c y anti-MHCII. a. Gráfica del promedio del porcentaje de células $CD11c^{+}MHCII^{+}$. b. Experimento representativos de la expresión de CD80 y CD86 (región $CD11c^{+}MHCII^{+}$). n=9. (* $p \leq 0.05$).

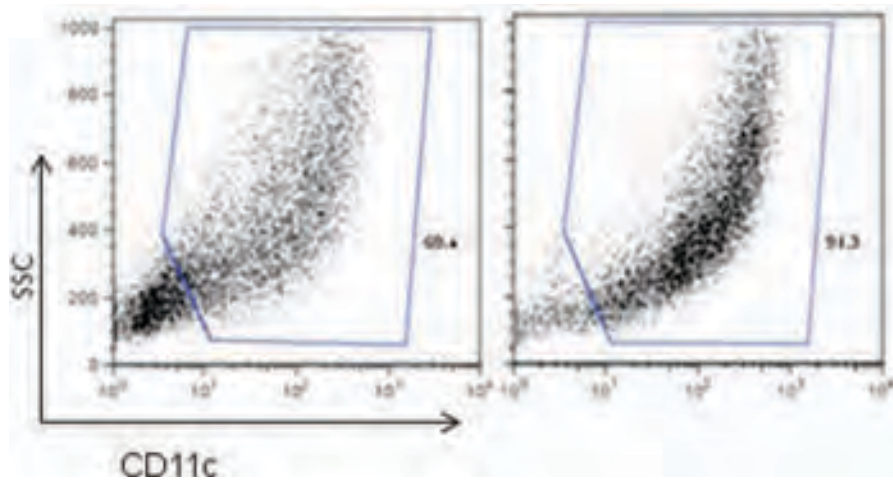
2. Células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones deficientes en Jak3 muestran un menor incremento en la expresión de sus marcadores de maduración después de ser estimuladas con LPS.

Las células dendríticas se originan a partir de precursores de médula ósea. *In vitro* se pueden obtener mediante el cultivo de estos precursores con citocinas como Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Monocitos (GMCSF), Il-4 y Flt3 entre otras. En este estudio utilizamos únicamente GMCSF, citocina que es capaz de conducirnos a la obtención de macrófagos y células dendríticas, por lo tanto, separamos la población de interés mediante adherencia. Las CDs obtenidas fueron posteriormente inducidas a madurar utilizando 1µg/ml de LPS de *E. coli*. Se realizó tinción con anti-CD11c para evidenciar células dendríticas totales y con anti-CD80, anti-CD86 y anti-MHCII tanto antes de estimular las células con el LPS como después de adicionar dicho estímulo para constatar el proceso de maduración. Encontramos que el porcentaje de células CD11c⁺ y la intensidad de fluorescencia de este marcador es mayor en las células provenientes del ratón deficiente en Jak3 (**Figuras 2a y 2b**). Así, el número total de CDs expresando los marcadores de maduración es mayor en los cultivos de células Jak3^{-/-} aunque los valores no fueron significativos (**Figura 2 c-d**). Sumado a esto, el porcentaje de células CD11c⁺ que expresan CD80, CD86 y MHCII es similar en ambos ratones tanto antes como después de adicionar el LPS (**Figura 2e**); No obstante, en la mayoría de los casos, las células que provienen del ratón deficiente en Jak3 no incrementan la intensidad de fluorescencia de sus marcadores de maduración al mismo nivel que las células del ratón C57BL/6 después de exponerlas a 1 µg/ml de LPS (**Figura 2f y tabla 1**).

2a.

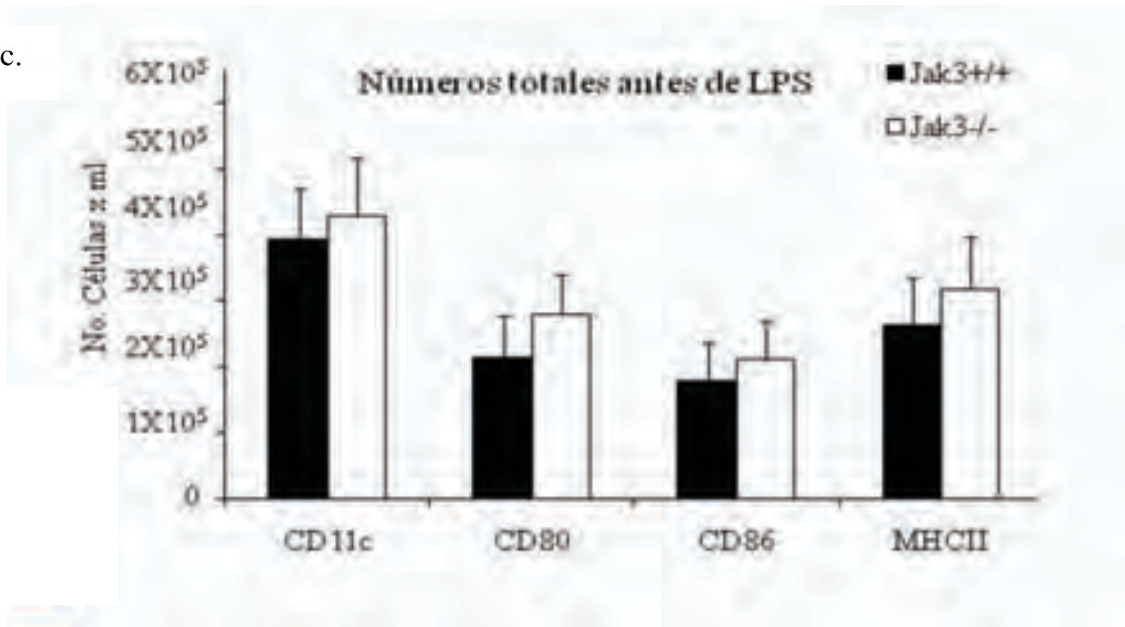


2b.



Figuras 2 a y b. **Células de Médula ósea de ratones deficientes en Jak3 pueden dar origen a células dendríticas.** Se obtuvieron células dendríticas a partir de médula ósea de ratones Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-} mediante su cultivo con GM-CSF. Estas células fueron marcadas con anti-CD11c para ser analizadas por citometría de flujo. a. Promedio del porcentaje de células CD11c⁺ después de adicionar LPS. b. Dot plots representativos de células después de adicionar LPS. n=14. *p≤ 0.05.

2c.



2d.

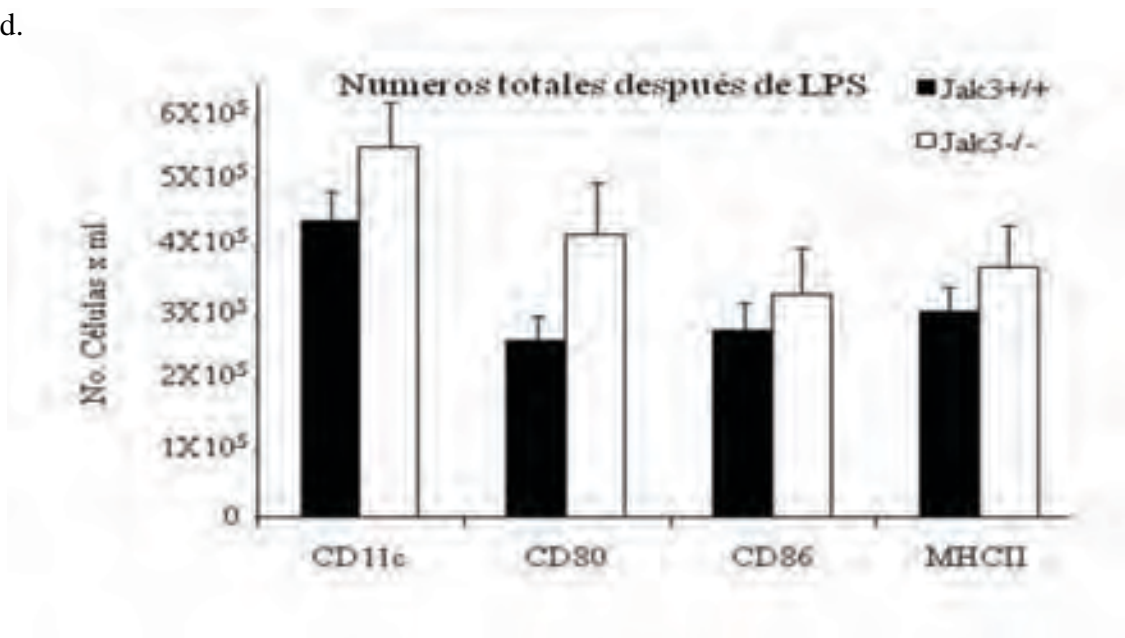
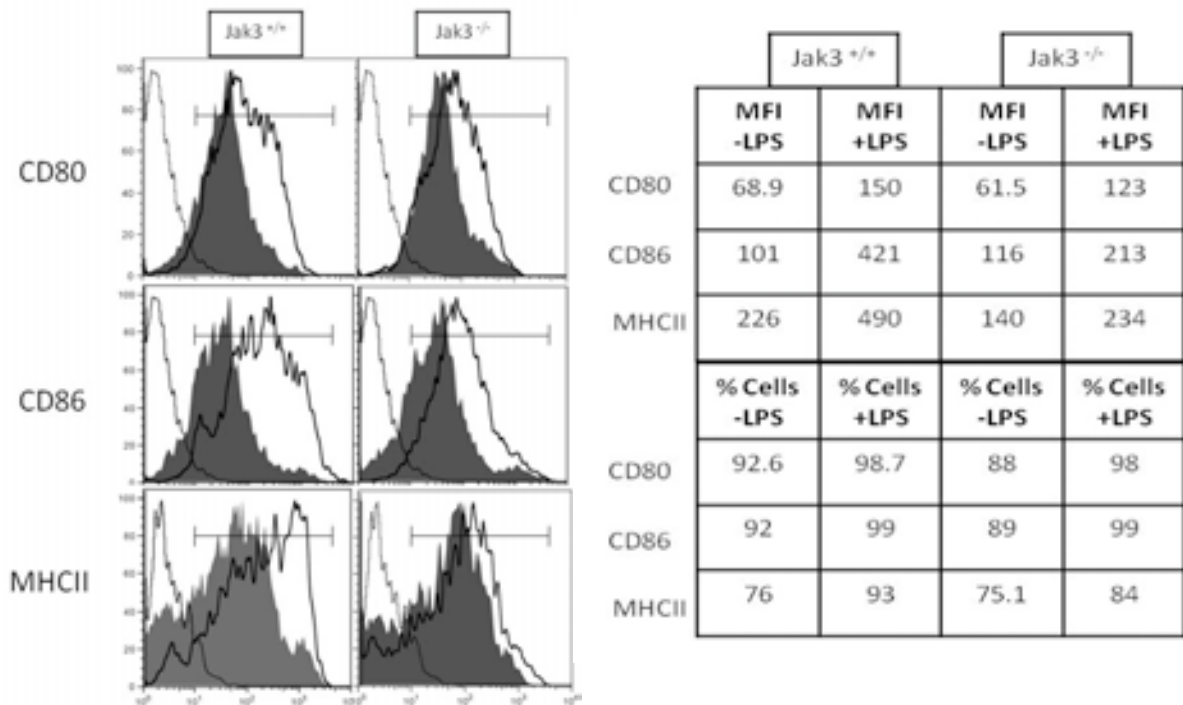


Figura 2 c y d. *El número total de células dendríticas exhibe una tendencia a ser mayor en los cultivos provenientes de células de médula ósea de ratones $Jak3^{-/-}$.* c. Antes de adicionar LPS. d. Después de adicionar LPS. n= 14.

2e.



2f.

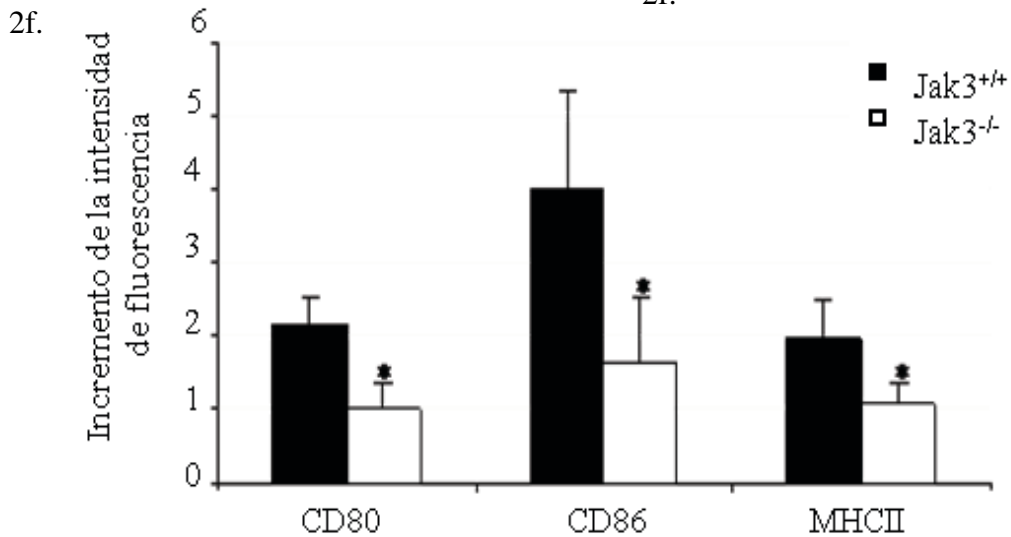


Figura 2 e y f. **La ausencia de Jak3 afecta negativamente el proceso de maduración de células dendríticas.** e. Izq. Experimento representativo. Der. Intensidad media de fluorescencia (MFI) y porcentaje de células positivas para los marcadores de maduración antes y después de LPS correspondientes al experimento representativo. f. El incremento en la intensidad de fluorescencia después del LPS respecto a la intensidad de fluorescencia antes de este estímulo es representado. n=14. *p≤ 0.05.

3. Células dendríticas deficientes en Jak3 no migran en respuesta a los ligandos de CCR7, CCL19 y CCL21.

Al madurar, las células dendríticas aumentan en su superficie la expresión del receptor de quimiocinas CCR7 a través del cual transducen señales inducidas por sus ligandos CCL19 y CCL21. Por esta razón, CCR7 es importante durante procesos inflamatorios dirigiendo el tráfico de células dendríticas hacia el sitio de presentación antigénica, aunque se ha visto que este receptor también es capaz de guiar a las CDs hacia ganglios linfáticos durante la homeostasis. Para verificar si las células dendríticas maduras derivadas de médula ósea de ratones deficientes en Jak3 responden al estímulo con CCL19 y CCL21 igual que células dendríticas provenientes de ratones de la cepa silvestre, se realizaron ensayos de quimiotaxis *in vitro* para los cuales se utilizó una cámara modificada de Boyden. En ésta, las células migran hacia el estímulo, es decir la quimiocina, a través de una membrana de nitrocelulosa. Concentraciones de quimiocina desde 10ng/ml hasta 1000ng/ml se depositaron en la parte inferior de la cámara. Las células, las cuales habían sido previamente marcadas con calceína, se hicieron migrar durante 90 minutos. Pasado este tiempo se analiza las células que migraron utilizando un detector de fluorescencia. En nuestros experimentos detectamos migración de células dendríticas hacia CCL19 y CCL21 tanto antes como después de adicionar el LPS. Por el contrario, las células dendríticas del ratón deficiente en Jak3 presentan una disminución significativa en su respuesta quimiotáctica hacia estas quimiocinas (**Figura 3a**).

Para verificar que la falta de migración de las células dendríticas deficientes en Jak3 no era causa de una menor expresión del receptor CCR7, estas células fueron marcadas tanto antes como después de adicionar el LPS, con una proteína de fusión CCL19-IgG humana. Así determinamos que no existen diferencias ni en el porcentaje de células dendríticas que expresan CCR7 ni en la intensidad de fluorescencia de este receptor (Figura 3 b-c). Además, en estos experimentos evidenciamos que las células dendríticas expresan CCR7 antes de adicionar el estímulo madurador, aunque los niveles de expresión si se aumentan al agregar LPS.

3a.

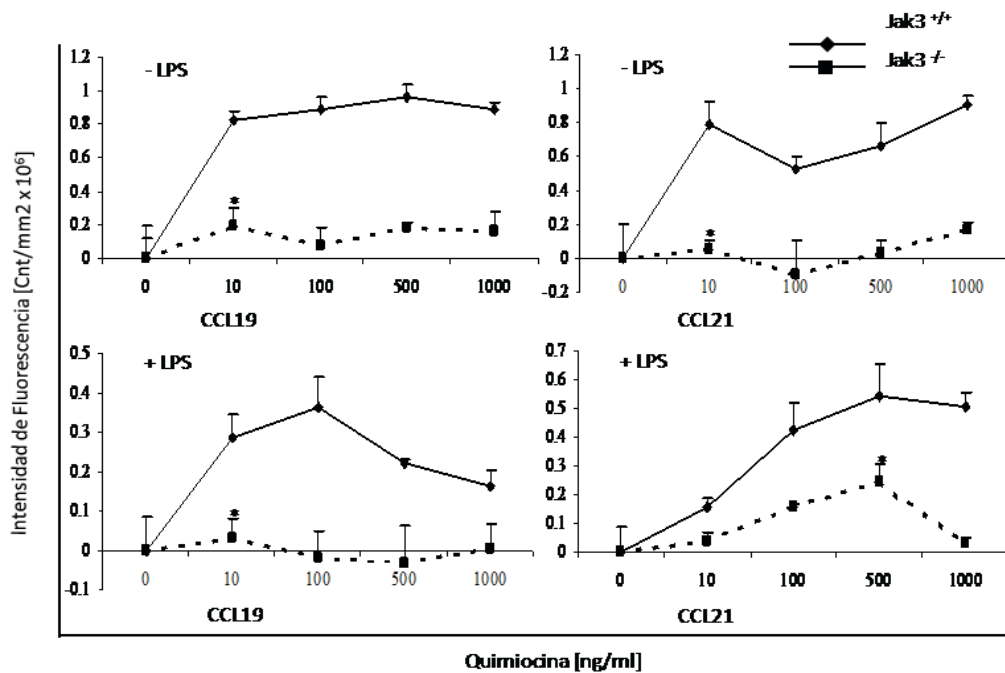


Figura 3 a. Células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones *Jak3^{-/-}* muestran una capacidad de migración reducida hacia las quimocinas CCL19 y CCL21. La quimiotaxis se realizó como se describe en materiales y métodos. Células dendríticas derivadas de ratones *JAK3^{+/+}* y *Jak3^{-/-}* hicieron migrar hacia diferentes concentraciones de quimiocina. Las células que han migrado a través de la membrana se cuantificaron usando un detector de fluorescencia. Los paneles superiores corresponden a las células antes de adicionar LPS y los inferiores a las células estimuladas con 1µg/ml de LPS. n= 12. *P≥0.05.

3 b.

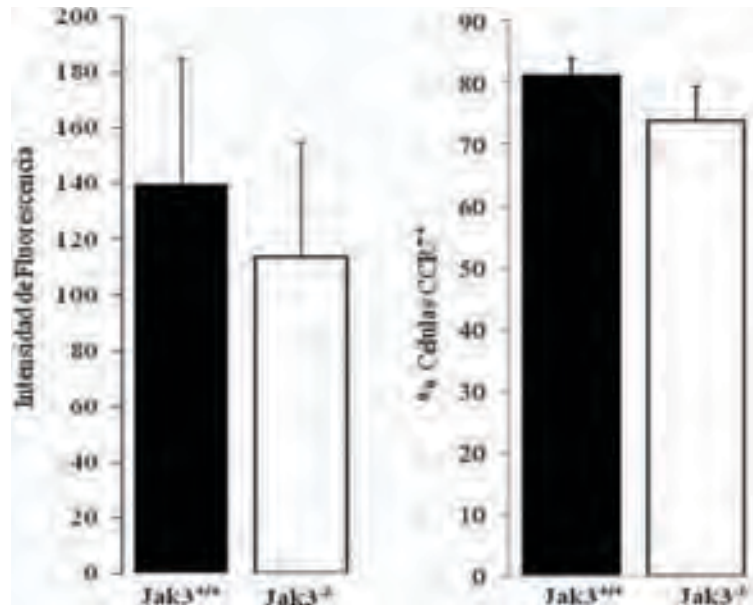
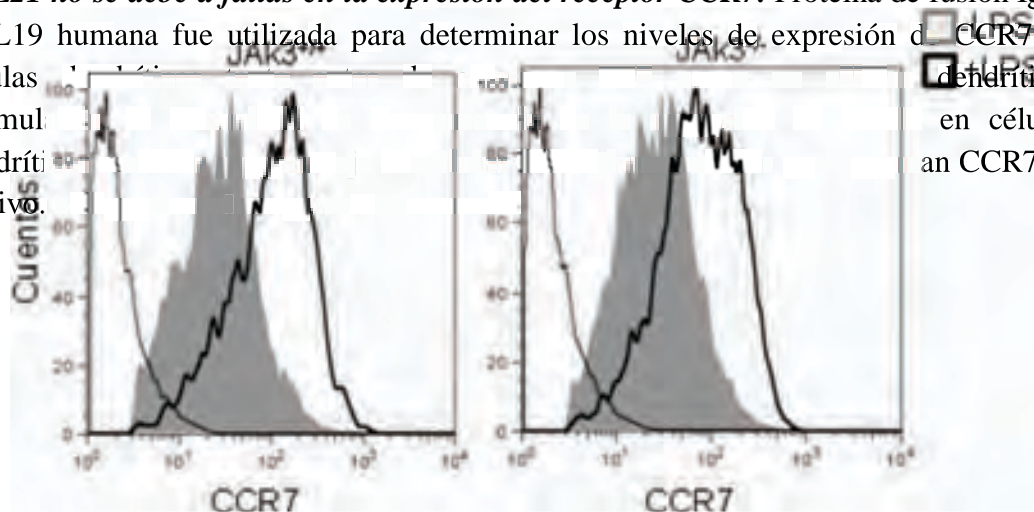


Figura 3 b-c. La falta de migración de las células dendríticas $Jak3^{-/-}$ hacia $CCL19$ y $CCL21$ no se debe a fallas en la expresión del receptor $CCR7$. Proteína de fusión IgG-

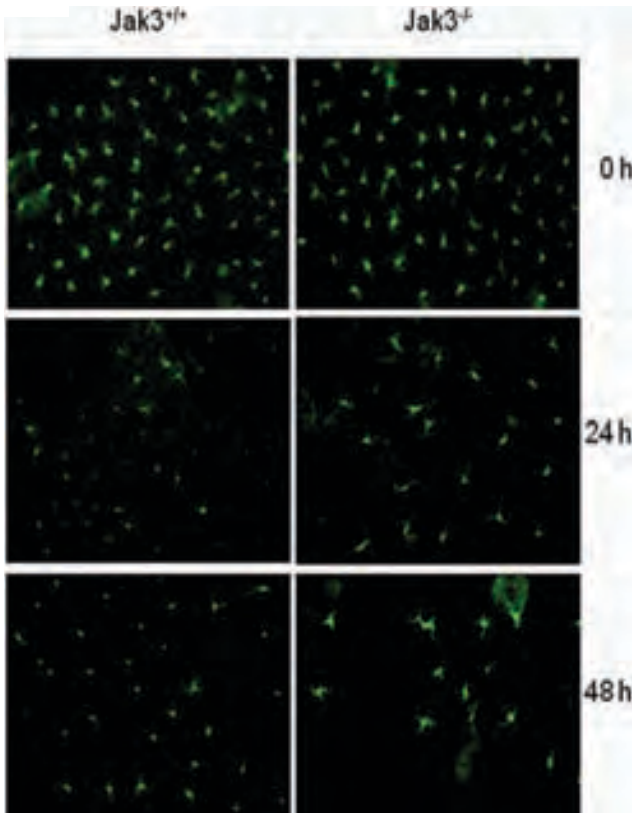
3 c. $CCL19$ humana fue utilizada para determinar los niveles de expresión de $CCR7$ en las células dendríticas en cultivo. $CCL19$ humana fue utilizada para determinar los niveles de expresión de $CCR7$ en las células dendríticas en cultivo. $CCL19$ humana fue utilizada para determinar los niveles de expresión de $CCR7$ en las células dendríticas en cultivo.



4. Las células dendríticas deficientes en Jak3^{-/-} son capaces de salir de la epidermis, pero no forman cordones (cords) alrededor de los vasos linfáticos.

Se ha reportado que las células de Langerhans, es decir las células dendríticas de piel, no requieren de CCR7 para pasar de la epidermis a la dermis. Por el contrario, este receptor es esencial para ingresar a los vasos linfáticos, donde se expresa uno de sus ligandos: CCL21; y posteriormente llegar a los ganglios linfáticos, lugar donde se expresan tanto CCL19 como CCL21. Así, las células de Langerhans del ratón CCR7 Ko no logran alinearse alrededor de los vasos linfáticos de la dermis quedando dispersas en este sitio, mientras que las células que si poseen el receptor forman los denominados “cordones”. Para comprobar si el fenotipo de las células de Langerhans del ratón Jak3^{-/-} era similar al de las células del ratón CCR7 Ko, se realizó cultivo de piel procedente de las orejas tanto de ratones Jak3^{+/+} como Jak3^{-/-}. Las orejas fueron separadas en sus partes dorso-ventral e incubadas en RPMI, 10% SFB durante diferentes tiempos. Luego la epidermis fue obtenida como se describe en materiales y métodos, y marcada tanto con a-MHCII (no mostrado) como con a-Langerina. Observamos que en ausencia de Jak3, las células de Langerhans si logran salir de la epidermis y que incluso lo hacen más rápido que las células del ratón de la cepa silvestre (**Figura 4a**). Sumado a esto, la presencia de “cordones”, solo se detectó en epidermis del ratón Jak3^{+/+} (**figura 4b**).

4a



4b

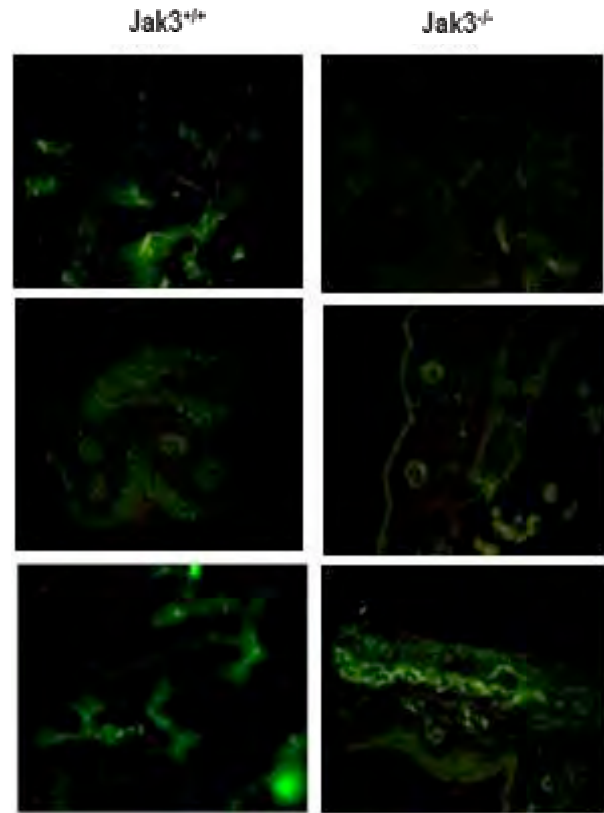


Figura 4. *Jak3* no se encuentra involucrado en la salida de células de Langerhans de la epidermis, sin embargo, participa en la formación de cordones alrededor de los vasos linfáticos. Piel de oreja ratones $Jak3^{+/+}$ y $Jak3^{-/-}$ fue cultivada en RPMI, 10% SFB. A diferentes tiempos se analizó la salida espontánea de las células de la epidermis separando la piel en dermis y epidermis como se describe en materiales y métodos y marcando con anti-Langerina. a. Epidermis, experimento representativo. b. Dermis, experimento representativo. n=6.

5. Las células dendríticas deficientes en *Jak3* no son capaces de migrar in vivo hacia los ganglios linfáticos de drenaje.

Para llegar a ganglios linfáticos, las células dendríticas deben seguir un gradiente de CCL21 presente en vasos linfáticos, y luego ingresar a los ganglios linfáticos a través de CCL19 y CCL21. En este trabajo se analizó si la ausencia de *Jak3* afectaba la llegada a ganglios linfáticos por medio de experimentos de transferencia adoptiva. Para estos

ensayos, ratones que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor de actina fueron cruzados con ratones $Jak3^{-/-}$ para obtener ratones $GFP^{+}-Jak3^{-/-}$. Así, células de médula ósea de estos ratones y de ratones $GFP^{+}-Jak3^{+/+}$ fueron derivadas a células dendríticas, inducidas a madurar con LPS e inyectadas en el cojinete plantar de ratones C57BL/6. A diferentes tiempos los ganglios poplíteos fueron extraídos y analizados por citometría de flujo para verificar la presencia de células GFP^{+} (**figura 5a**). Encontramos que el porcentaje de células dendríticas $Jak3^{-/-}$ que logran llegar al ganglio poplíteo entre las 36 y 48 horas corresponde al 15,5 - 27,5% de las células dendríticas $Jak3^{+/+}$ que consiguen ingresar a dicho ganglio (**Figura 5b**). Estos porcentajes no aumentan al analizar los ganglios a las 72 horas.

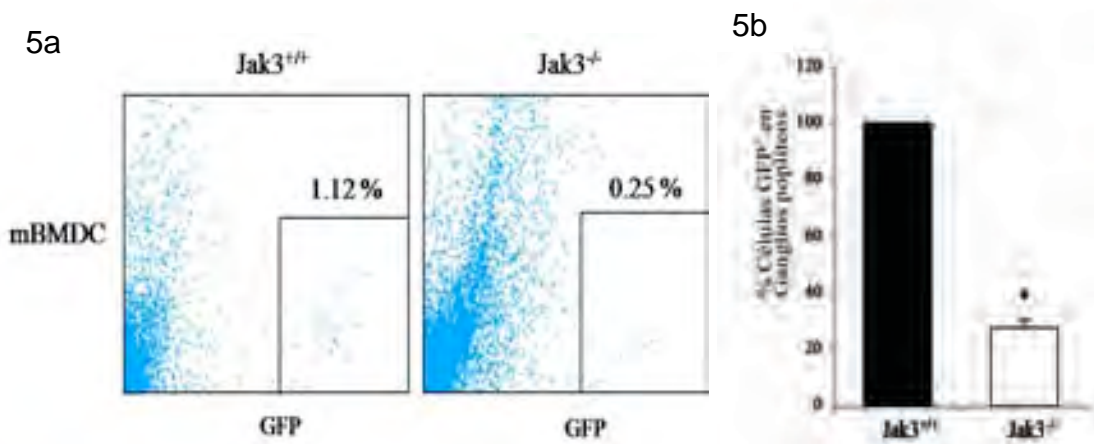


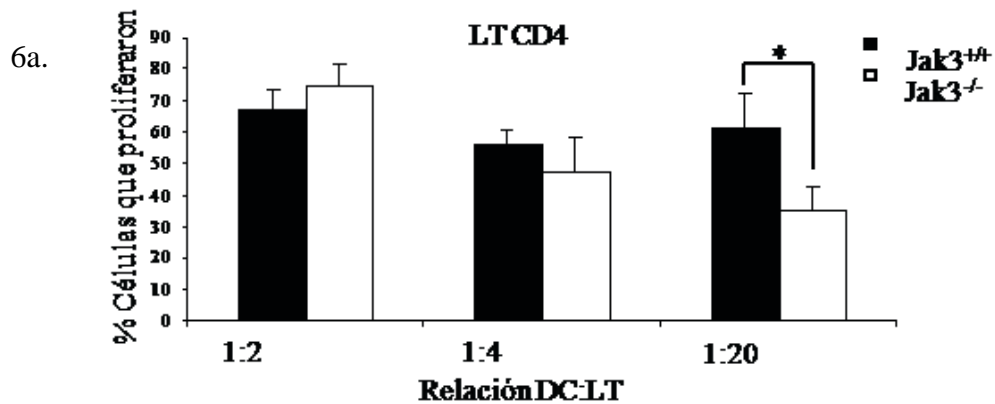
Figura 5 a y b. *Jak3* se requiere para la migración de células dendríticas a ganglios linfáticos. 1×10^6 células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones $Jak3^{+/+}-GFP^{+}$ y $Jak3^{-/-}-GFP^{+}$ fueron inyectadas en el cojinete plantar derecho de ratones $Jak3^{+/+}$. A diferentes tiempos, los ganglios poplíteos fueron obtenidos y analizados por citometría de flujo para evidenciar las células GFP^{+} . a. Experimento representativo. b. **Las células dendríticas deficientes en *Jak3* fallan en inducir la proliferación** Gráfica del promedio de tres experimentos individuales. $n=9$. * $P \geq 0.05$.

adecuada de linfocitos T CD4 y CD8.

Las células dendríticas maduras están altamente capacitadas para presentar antígenos a los LT CD4 y CD8 induciendo su proliferación o conduciendo a estas células a estado de anergia dependiendo de los factores en los que dicha presentación antigénica se lleve a cabo. Por medio de ensayos de Reacción Leucocitaria Mixta (MLR), en los cuales células dendríticas y linfocitos T de cepas alogénicas se ponen en contacto, evaluamos la capacidad de las células dendríticas deficientes en Jak3 para inducir linfoproliferación. Solo cuando la relación de células dendríticas: linfocitos T es entre 1:1 – 1:10, las células dendríticas Jak3^{-/-} logran inducir proliferación tanto de linfocitos T CD4 como CD8 a los mismos niveles que las células dendríticas del ratón C57BL/6; sin embargo, si la relación es de 1:20, las células dendríticas Jak3^{-/-} inducen niveles de proliferación significativamente menores que las células dendríticas Jak3^{+/+}. Esto parece indicar que la menor capacidad de las células dendríticas deficientes en Jak3 para aumentar la expresión de moléculas coestimuladoras en su superficie, tiene relevancia biológica ya que estas células, cuando se encuentran a bajas densidades en relación a los linfocitos T, se encuentran inhibidas en su capacidad de promover linfoproliferación **(Figura 6 a-c)**.

Sin embargo, en ensayos de proliferación en los que se utilizó un sistema de TCR específico para Ovoalbúmina (OVA), CDs cargadas con diferentes dosis del péptido de OVA 323-339 se pusieron en cultivo durante tres días con LT provenientes de ratones OTII teñidos con CFSE. Se observó que con este sistema, las células provenientes del ratón Jak3^{-/-} son capaces de inducir linfoproliferación incluso a la relación 1:20 (CD:LT) **(Figura 6 d-e)**; sin embargo, al parecer las células dendríticas deficientes en Jak3 conducen a los linfocitos T CD4 a un proceso de apoptosis. Esto lo evidenciamos

al marcar a los linfocitos T CD4 con Anexina V y encontrar que los niveles de apoptosis causados por células dendríticas $Jak3^{-/-}$ en una relación 1:2 son similares a aquellos provocados por las células dendríticas $Jak3^{+/+}$ a una relación 1:20 (**Figura 6 f-g**). Los ensayos en los cuales el modelo TCR específico para OVA fue empleado aun requieren de estudios posteriores.



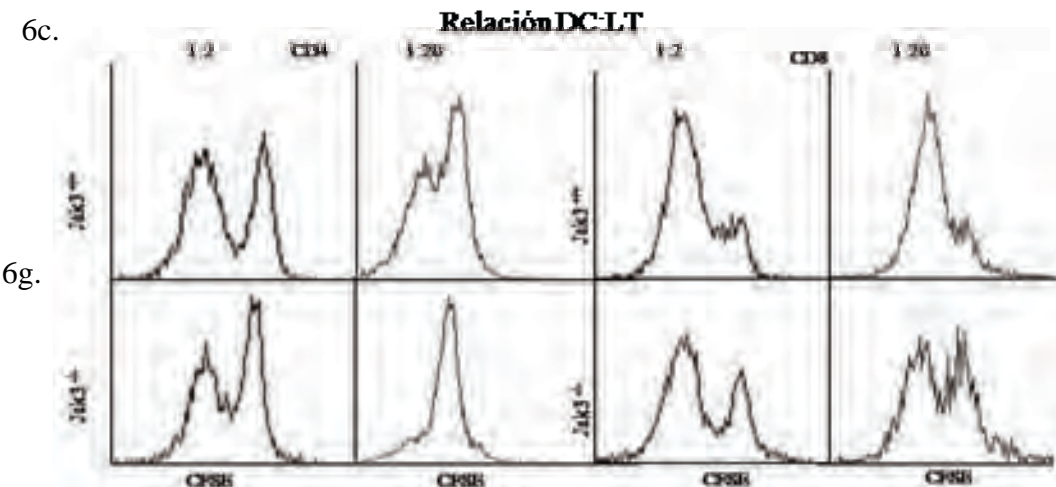
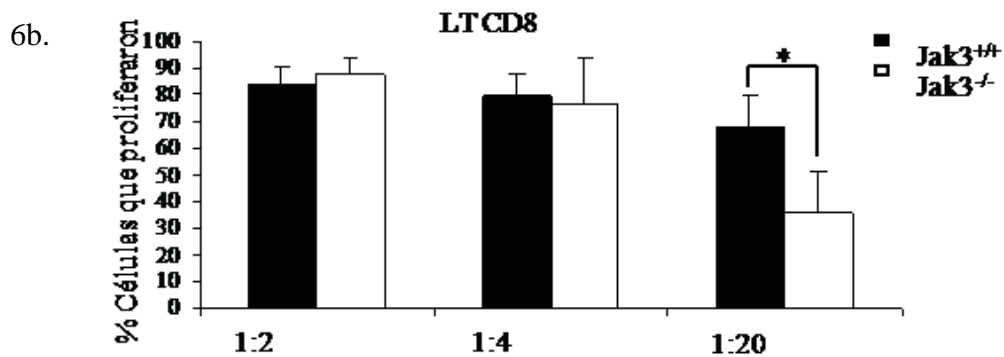
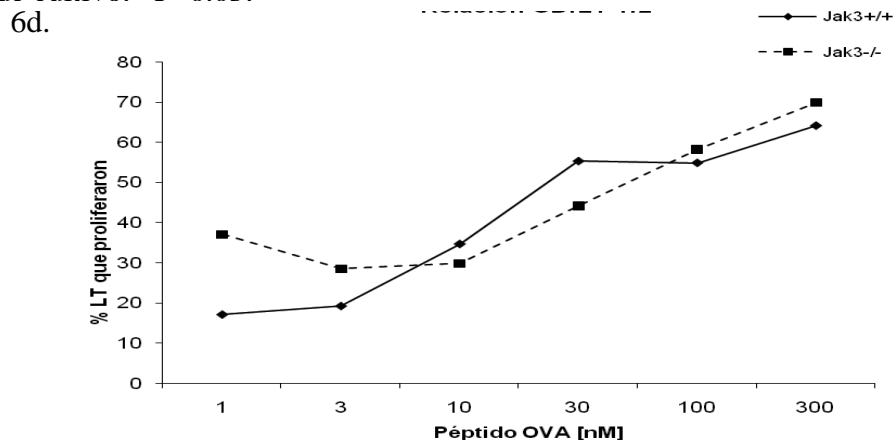


Figura 6 a-c. Las células *Jak3*^{-/-} inducen menos linfoproliferación que las *Jak3*^{+/+} en cultivos alogénicos cuando la relación CD:LT es baja. Linfocitos T de ratones Balb/c fueron separados con un anti-B220 y marcados con CFSE. Relaciones de CDs:LT de 1:1, 1:2, 1:4, 1:10 y 1:20 se cultivaron en RPMI, 10% SFB. 5, 6 y 7 días después se evaluó la linfoproliferación por citometría de flujo. a-b. Promedio de la proliferación obtenida en 3 experimentos, n=6. c. Histogramas representativos de 4 experimentos por separado en cada uno de los cuales se analizaron 3 ratones individualmente. Estos histogramas corresponden al día 6 de cultivo. *P>0.05.



6e

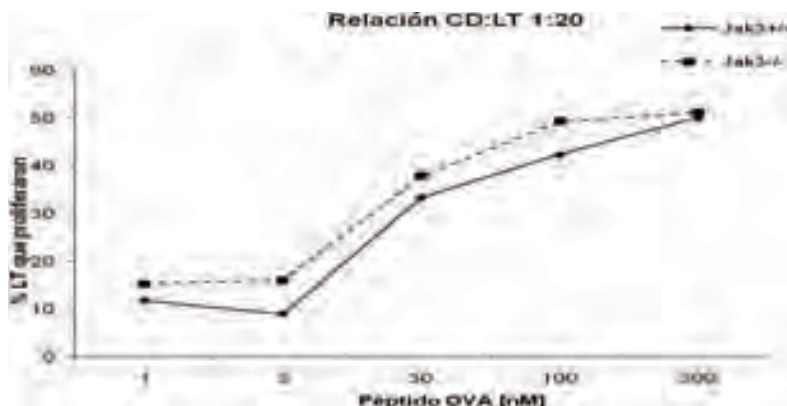
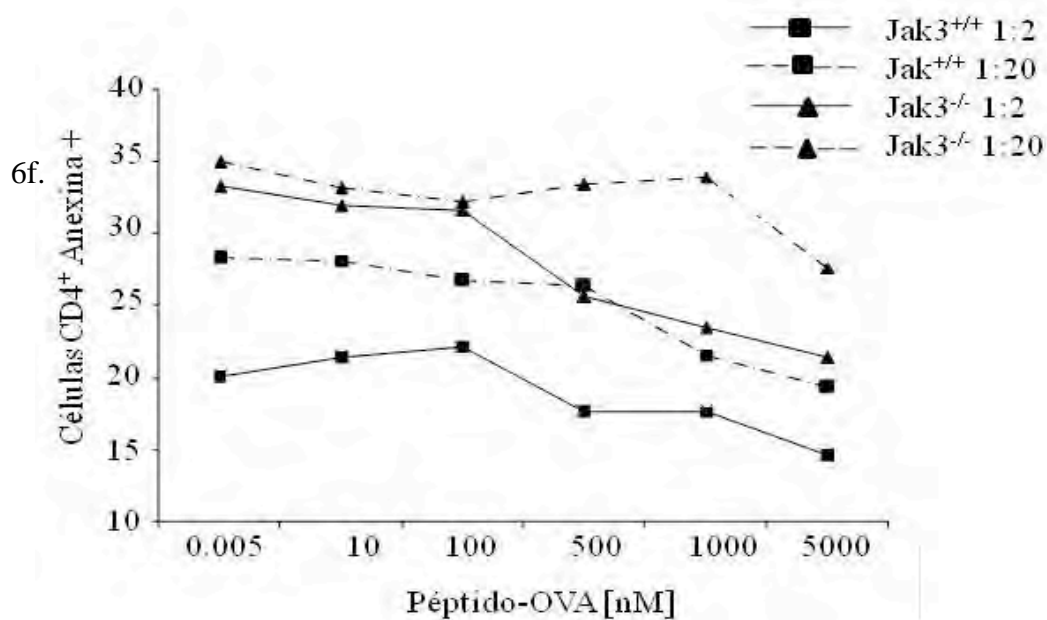


Figura 6 d-e. *En un sistema TCR específico, las células dendríticas Jak3^{-/-} si son capaces de inducir linfoproliferación a los mismos niveles de las células Jak3^{+/+}.* Células dendríticas Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-} se incubaron durante 1 hora con diferentes dosis del péptido de OVA 323-339. Linfocitos T CD4⁺ provenientes del ratón OTII fueron obtenidos por columna MACS y marcados con CFSE. Diferentes relaciones CD:LTs fueron incubadas y al tercer día la linfoproliferación fue analizada por citometría de flujo. Graficas correspondientes a las relaciones de CD:LT d. 1:2; y e. 1:20, de un experimento representativo.



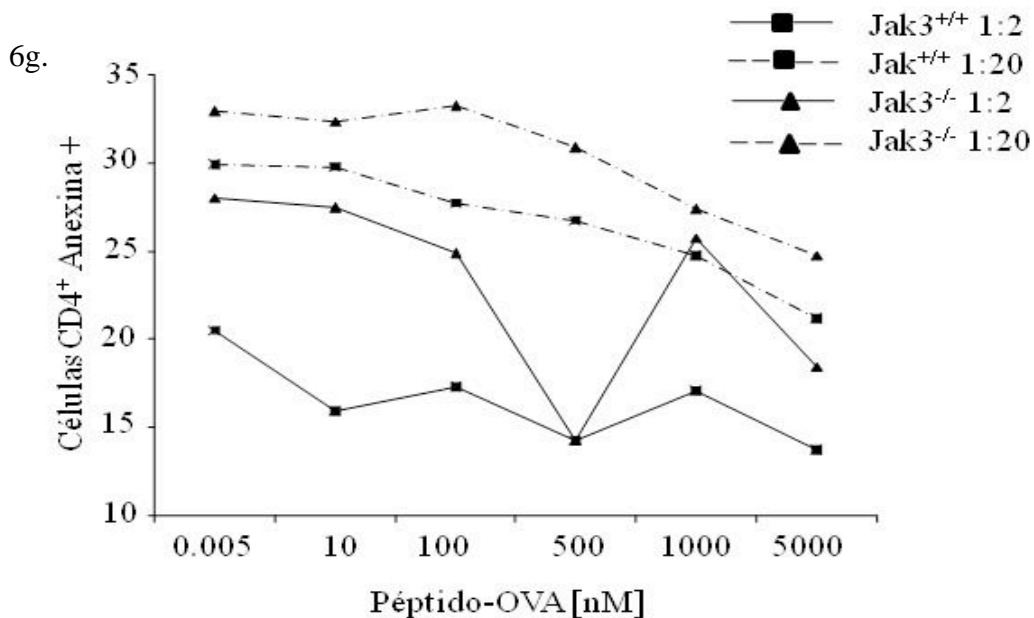


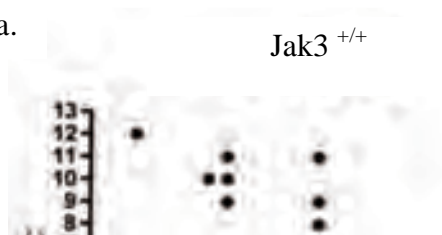
Figura 6 f-g. *Los niveles de apoptosis de los linfocitos T CD4 que han sido cultivados con células dendríticas Jak3^{-/-} son mayores que los de los linfocitos cultivados con células Jak3^{+/+}. Células dendríticas Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-} se incubaron durante 1 hora con diferentes dosis del péptido de OVA 323-339 y luego se pusieron en cultivo con linfocitos T CD4 provenientes del ratón OTII. 24h después las células fueron marcadas con anti-anexina V, anti-CD4 y anti-CD11c para ser posteriormente analizadas por citometría de flujo. Estas graficas corresponden a dos experimentos individuales. n=2*

7. Las células dendríticas deficientes en Jak3 si son capaces de establecer contacto con linfocitos T, aunque el número de linfocitos que pueden contactar al parecer es menor.

Para tratar de elucidar las causas de la deficiencia de las células dendríticas Jak3^{-/-} en inducir linfoproliferación en los ensayos de MLR, se realizaron experimentos de

videomicroscopia que nos permitirían, en primera instancia, verificar si se estaba produciendo o no un contacto entre las células dendríticas $Jak3^{-/-}$ y linfocitos T contando con un sistema optimizado de reconocimiento TCR-Péptido. Para tal objetivo, células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones $Jak3^{+/+}$ y $Jak3^{-/-}$ se pusieron en contacto con Linfocitos T provenientes de ganglios linfáticos de ratones OTII a una relación CD:LT de 1:2, y se tomó una imagen cada minuto durante dos horas. Utilizando el programa Metamorph se evaluó la duración y el número de contactos realizados por cada célula dendrítica en presencia o ausencia de Jak3. El tiempo mínimo que se tomó en cuenta para definir un contacto fue de 5 minutos. De esta manera se observó que ambos grupos de células, $Jak3^{+/+}$ y $Jak3^{-/-}$, son capaces de realizar contactos de más de 90 minutos (**Figura 7a-d**), y que aunque las células dendríticas del ratón deficiente en Jak3 son capaces de realizar contactos con más de 4 linfocitos T, el número de células capaces de contactar más de un linfocito se encuentra disminuido en comparación con las células $Jak3^{+/+}$ (**Figura 7e**). En las gráficas de duración de contactos en el eje Y se le ha asignado un número a cada una de las células dendríticas y cada punto representa un linfocito T. Así por ejemplo, en la figura 7a, la célula dendrítica número 2 contactó a 8 LT, y estos contactos tuvieron un tiempo de duración variado. En las gráficas de cantidad de contactos (**figura 7e**), en el eje de las Y esta representado el número de linfocitos T que han sido contactados por un número X de células dendríticas, las cuales están representados por cada punto; así por ejemplo, 8 células dendríticas provenientes del ratón $Jak3^{+/+}$ hicieron contacto con un solo linfocito T.

7a.



7b.

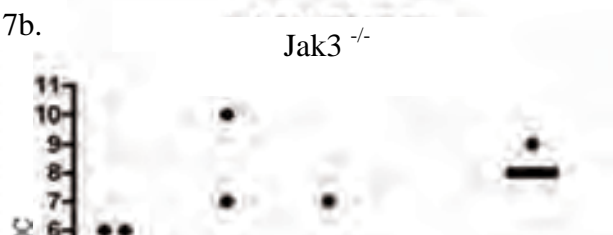


Figura 7a-d. *Tanto las células dendríticas $Jak3^{+/+}$ como las $Jak3^{-/-}$ son capaces de establecer contactos prolongados con los $LTCD4^+$* . Células dendríticas y linfocitos T en una relación de 1:2 se pusieron en contacto durante 2 horas en RPMI 10% SFB y 5% de CO_2 . Una foto fue tomada cada minuto. La duración de los contactos se determinó analizando las imágenes en el programa Metamorph. Cada número del eje Y corresponde a una célula dendrítica y en el eje X se representa el tiempo en minutos que cada célula dendrítica contactó a un determinado linfocito. Así por ejemplo, la célula dendrítica número 2 contactó a 8 LT en la figura 7a, n= 2

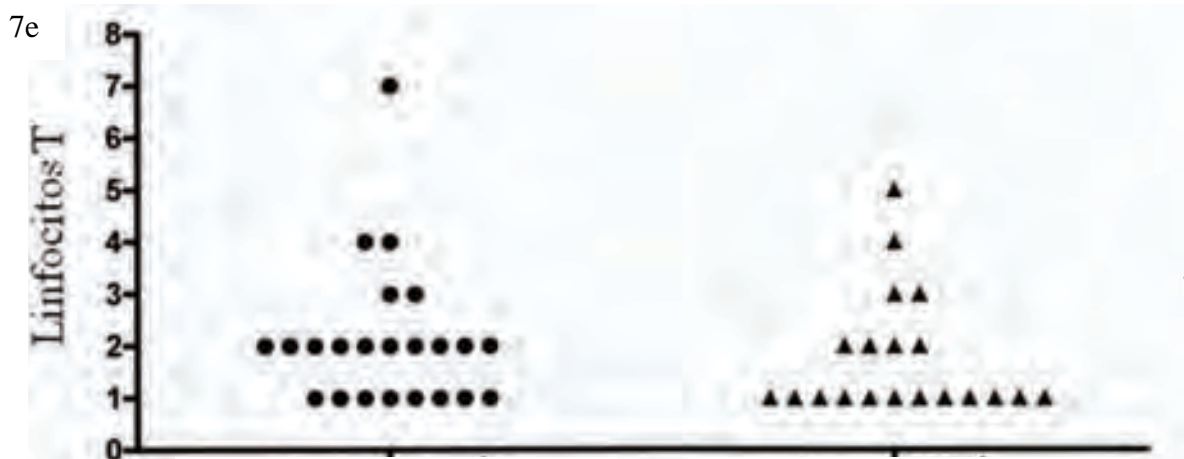


Figura 7e. *Una célula dendrítica $Jak3^{+/+}$ puede contactar un número mayor de linfocitos T en comparación con una célula dendrítica $Jak3^{-/-}$.* Por medio de videomicroscopía se cuantificó el número de linfocitos T que puede contactar una célula dendrítica durante dos horas. En el eje de las Y esta representado el número de linfocitos T que han sido contactados por un número X de células dendríticas, las cuales están representados por cada punto; así por ejemplo, 8 células dendríticas provenientes del ratón $Jak3^{+/+}$ hicieron contacto con un solo linfocito T. Grafica en la que se representan dos experimentos individuales.

8. Mediante ensayos de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) se determinó que el reclutamiento de células al sitio de inflamación así como la inflamación del tejido es menor después del reto en el ratón deficiente en $Jak3$.

Una DTH consta básicamente de dos etapas. En la primera de ellas, denominada sensibilización, un antígeno estimula a las células dendríticas a migrar hacia los ganglios linfáticos para realizar presentación antigénica a los linfocitos T vírgenes. Estos linfocitos proliferan y migran hacia el sitio de inflamación como células efectoras para tratar de resolver el daño. Algunos de los linfocitos que proliferan en el ganglio adquieren fenotipo de linfocitos de memoria quedando listos para responder rápidamente ante un segundo estímulo antigénico. Así, la en la segunda etapa de la DTH denominada reto, la subsecuente estimulación con el antígeno conduce a inmunidad celular, en la cual, se promueve la activación de macrófagos y linfocitos de memoria dando como resultado una respuesta inflamatoria más rápida y efectiva que la

primera. De esta manera utilizando un modelo de DTH en piel (sensibilización por contacto) empleando como estímulo Di-NitroFluoro-Benceno (DNFB), se determinó que el ratón deficiente en Jak3 presenta menos inflamación que el Jak3^{+/+}, evaluado como el grosor desde el pericondrio hasta la membrana basal de la oreja retada comparado con el grosor de la oreja estimulada con el vehículo (**Figura 8 a**). Similar a esto, el número de células infiltradas en el sitio de inflamación es menor en las orejas de los ratones Jak3 deficientes (**Figura 8 b -c**).

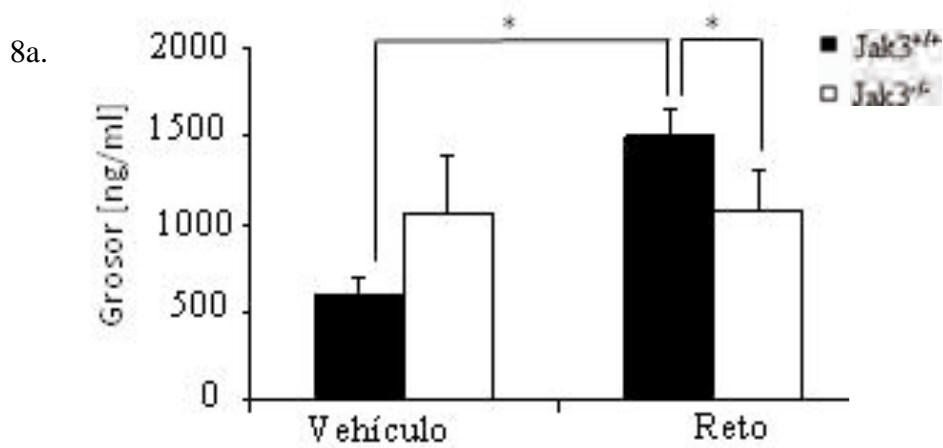
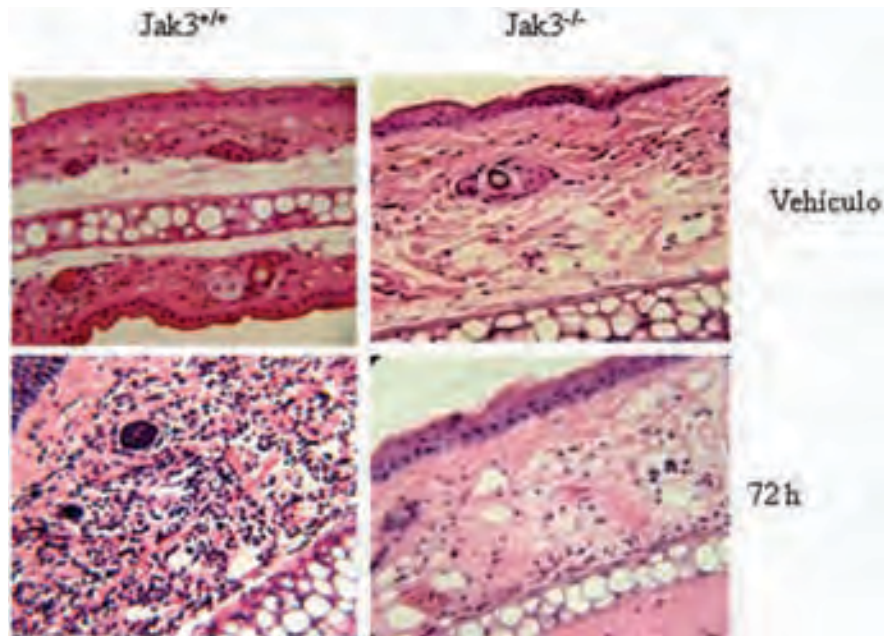


Figura 8a. El *grosor de la piel de ratones Jak3^{-/-} no aumenta después del reto en un ensayo de DTH*. Ratones Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-} fueron sensibilizados en la oreja izquierda con 10ml de DNFB 1% en Acetona: Aceite de oliva. Cinco días después fueron retados en la oreja derecha con 5ml de la misma solución. a. Promedio del grosor de la oreja desde el pericondrio hasta la membrana basal. El programa Motic Image plus 2.0 fue utilizado. n=3. *p≤ 0.05.

8b



8c

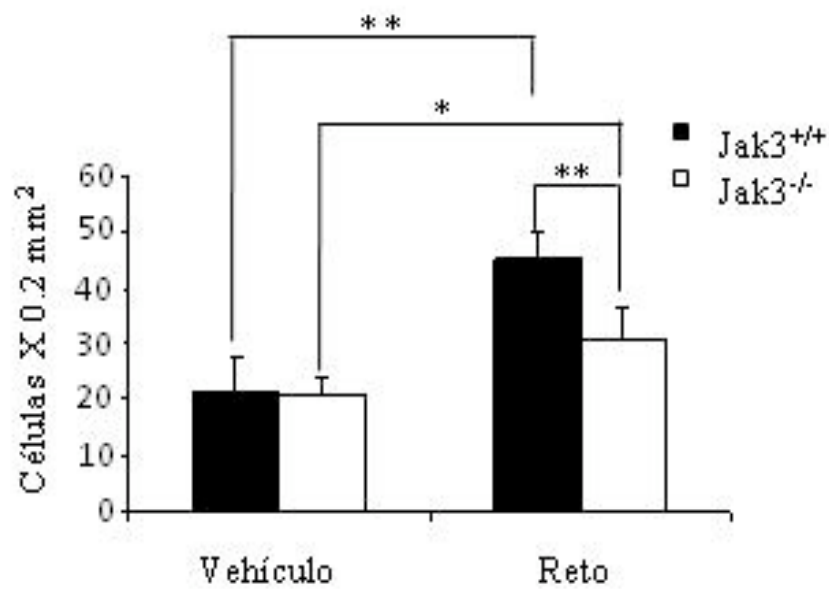


Figura 8b y c. El reclutamiento de células al sitio de inflamación es menor en el ratón *Jak3^{-/-}* después del reto en un ensayo de DTH. DNFB fue aplicado en la oreja izquierda de ratones *Jak3^{+/+}* y *Jak3^{-/-}*. 5 Días después se pone el mismo estímulo en la oreja derecha; pasadas 72h se obtiene tejido para cortes en parafina. b. Tinción con Hematoxilina/Eosina. c. Gráfica del promedio de 3 experimentos. n=3. * $P \geq 0.05$, ** $P \geq 0.001$.

9. La restauración del número de células dendríticas de piel (Células de Langerhans) después del reto de la DTH no se produce al mismo nivel en ratones deficientes en Jak3 comparando con ratones que si expresan esta cinasa.

Al percibir un estímulo las células de Langerhans dejan la epidermis para migrar a los ganglios linfáticos, dejando a la epidermis desprovista de células dendríticas. De esta manera, la población debe ser restaurada en un proceso en el que, en estado de reposo, los precursores provienen de dermis; sin embargo en un proceso inflamatorio los precursores se reclutan desde sangre en un mecanismo que depende en parte del receptor de quimiocinas CCR2. En nuestros ensayos observamos que la población de células de Langerhans de piel de ratones $Jak3^{-/-}$ se restablece con un número de células significativamente menor que el número de células de la piel de ratones $Jak3^{+/+}$ después del reto de la DTH, sugiriendo que Jak3 está involucrado en el reclutamiento de precursores de células de Langerhans durante procesos inflamatorios (**Figura 9 a y b**). Esto nos condujo a explorar si Jak3 se encontraba involucrado en la migración de células dendríticas a través de CCR2. Para abordar este planteamiento realizamos ensayos de quimiotaxis in vitro con células dendríticas derivadas de médula ósea. Observamos así, que las células dendríticas provenientes del ratón $Jak3^{-/-}$ si son capaces de migrar hacia CCL2 (cuyo único receptor es CCR2), por lo cual esta participación de Jak3 en el retorno de células de Langerhans a la epidermis queda por establecer.

Figura 9a.

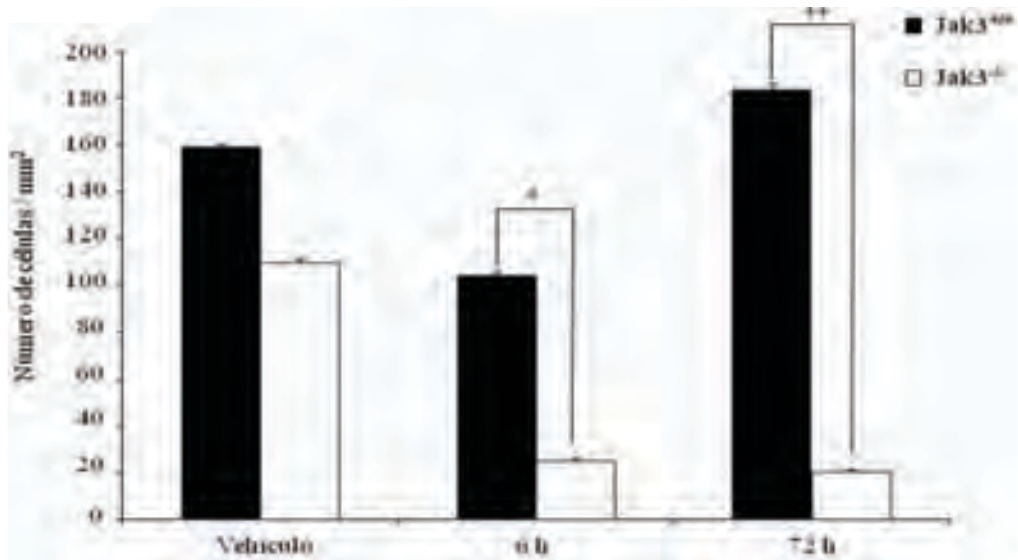


Figura 9b.

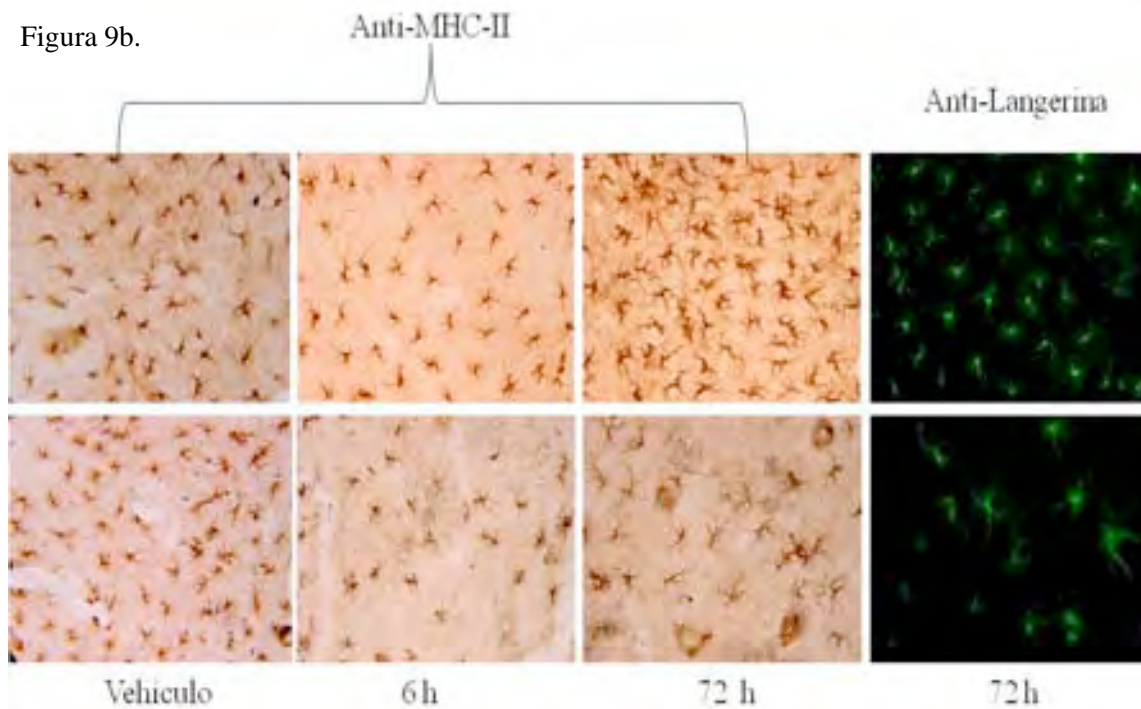


Figura 9a y b. El número de células de Langerhans que se encuentran después del reto en la piel de orejas de ratones $Jak3^{-/-}$ es menor que el número presente en las orejas de ratones $Jak3^{+/+}$. Después del reto la piel fue separada en dermis y epidermis, y ésta última fue marcada para su cuantificación utilizando anti-MHCII o anti-Langerina. a. Cuantificación de células de Langerhans en la epidermis. b. Fotos representativas. * $P \leq 0.05$; ** $P < 0.01$.

X. DISCUSIÓN

La respuesta inmune innata consta de barreras físicas como la piel y mucosas que dificultan la entrada de antígenos; También comprende células que reconocen estos antígenos mediante receptores de reconocimiento de patrón (PRR), es decir receptores que pueden unir, ya sea de manera directa o indirecta, moléculas que son comunes entre patógenos como LPS, dsRNA y CpG-no metilado, denominadas PAMPs. El reconocimiento de PAMPs por PRR como los Receptores Tipo Toll, conduce a la secreción de citocinas, moléculas que inducen el reclutamiento y la activación de células que contribuyen a la eliminación del antígeno ^{156 3}. Las células dendríticas (CDs) se encuentran ubicadas prácticamente en todos los tejidos. Al encontrarse en los principales sitios de entrada de agentes extraños, cumplen un importante papel como centinelas del sistema inmune. Así en la periferia, las CDs que reciben el nombre de inmaduras, son capaces de atrapar antígenos y/o reconocerlos por diversos mecanismos, lo cual conduce al proceso de maduración de la CD. Este proceso consiste, entre otros aspectos, en el aumento de moléculas coestimuladoras como CD80, CD40 y CD86, así como de MHCII en la superficie celular ¹⁵⁷. La maduración de células dendríticas les permite presentar el antígeno en un contexto que induzca la activación de linfocitos T ^{4 3}.

Para llegar a ganglios linfáticos, lugar donde realizan la presentación de antígenos a linfocitos T vírgenes, las CDs siguen la interacción CCL19/CCL21-CCR7 ^{117 158}. Anteriormente se ha observado que Jak3 participa en la señalización de CCR7 ¹⁰¹ y que además sus ligandos inducen maduración de CDs ¹⁵¹. De esta manera en este trabajo analizamos el papel de Jak3 tanto en la maduración como en la migración de CDs. Para este

objetivo utilizamos un modelo murino deficiente en Jak3. Las células de origen linfóide de este ratón han sido ampliamente estudiadas debido a la relación de esta cinasa con receptores de citocinas como IL7R. IL7 es una interleucina importante en la estimulación de la diferenciación de progenitores hematopoyéticos hacia células linfoides. Así, Este ratón Jak3^{-/-} no posee células Natural Killer (NK) ni linfocitos $\gamma\delta$. El número de LB inmaduros, se encuentra disminuido y casi no se encuentran células B maduras. El timo del ratón Jak3^{-/-} es más pequeño (1-10%) que el del ratón normal⁸⁶. En bazo, los números de LT CD4⁺, pero no de LT CD8⁺, son equivalentes a los del ratón de la cepa silvestre. Adicionalmente, los linfocitos T de este ratón son anérgicos⁸⁷ y las placas de Peyer y los ganglios linfáticos periféricos, a excepción del mesentérico, se encuentran ausentes en el ratón Jak3^{-/-}. El estudio de células de origen mieloide en este ratón, contrario a las investigaciones sobre células linfoides, no es amplio. El análisis fenotípico del ratón Jak3^{-/-}, cuando éste fue creado, evidenció que las células hematopoyéticas no tenían problemas para generar células mieloides⁸⁶. Sin embargo, se ha observado que la sobreexpresión de Jak3 acelera la diferenciación de granulocitos y monocitos en respuesta GM-CSF⁸⁹, y contrario a esto, la ausencia de esta cinasa disminuye los niveles de apoptosis de células dendríticas⁸⁸. Similar a esto, nosotros encontramos que el número total de CDs generadas en cultivo provenientes del ratón Jak3^{-/-} tiende a estar aumentado. En conjunto, nuestros ensayos aportan información que indica que Jak3 sí juega un papel en el desarrollo y funcionalidad de células mieloides, además de estar involucrada en la activación mediada por quimocinas, en este caso CCL19 y CCL21.

Congruente con trabajos anteriores encontramos que *in vivo*, el ratón Jak3^{-/-} no tiene problemas para la generación de CDs⁸⁸ lo cual comprobamos al examinar órganos linfoides

como bazo y ganglios linfáticos mesentéricos, único ganglio linfático presente en este ratón. De la misma manera, al analizar piel de ratones Jak3^{-/-} encontramos que el número de CDs presentes en este tejido no presenta diferencias en comparación con el de la cepa silvestre. Acorde con datos reportados previamente en los cuales células de médula ósea de ratones Jak3^{-/-} son capaces de generar CDs mediante el cultivo con IL4 o GM-CSF/IL4⁹³, nosotros encontramos que este ratón no presenta deficiencias para la generación de CDs *in vitro* a partir de precursores de médula ósea cultivadas con GM-CSF. Este factor de crecimiento señala a través de Jak2 y no a través de Jak3^{159 11}. Aunque IL4¹⁶⁰ e IL7^{161 162} son interleucinas que utilizan Jak3 en su vía de señalización y que pueden estar involucradas en el desarrollo de CDs¹⁶³, se ha visto que en el caso de IL4, el receptor implicado en la generación de CDs es el tipo II, es decir el que no requiere la cadena γc y por tanto no requiere Jak3⁹³. Por otra parte, IL7 puede actuar en conjunto con GM-CSF para producir un tipo de CDs distinto de aquel que resulta de la combinación GM-CSF/IL4¹⁶³.

Se ha reportado que Jak3 se expresa en CDs inmaduras y que los niveles de esta molécula no cambian con el proceso de maduración⁸⁸. No obstante, aunque la deficiencia en Jak3 no afecta la obtención de CDs ni *in vitro* ni *in vivo*, nosotros encontramos que la carencia de esta cinasa afecta negativamente el proceso de maduración inducido por LPS *in vitro*, lo cual es contrario a lo anteriormente reportado. Nosotros observamos que las CDs derivadas de médula ósea de ratones Jak3^{-/-} no incrementan la expresión de CD80, CD86 y MHCII al mismo nivel que las CDs del ratón de la cepa silvestre. Aunque en algunos experimentos de citometría de flujo, la intensidad de fluorescencia de los marcadores de maduración fue mayor en las CDs Jak3^{-/-}, estos fueron únicamente 3/14, 2/14 y 5/14 para CD80, CD86 y

MHCII respectivamente. Así, la mayoría de experimentos indican que hay un efecto negativo en el aumento de la expresión de estas moléculas debido a la falta de Jak3.

Anteriormente se reportó que las CDs $Jak3^{-/-}$ sobreviven más en cultivo en comparación con las CDs $Jak3^{+/+}$ debido a que esta cinasa regula positivamente la expresión de las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK ⁸⁸. En nuestros cultivos de CDs derivadas de médula ósea observamos que tanto el porcentaje de células que expresan CD11c, como la intensidad de fluorescencia de este marcador es mayor en la población $Jak3^{-/-}$. Congruente con esto, los números totales de CDs en los cultivos provenientes del ratón $Jak3^{-/-}$, son mayores que en los cultivos de la cepa silvestre. Así, a pesar de que el incremento de los marcadores de maduración es menor en las CDs $Jak3^{-/-}$ después de adicionar LPS, el número total de células expresando dichos marcadores resulta mayor.

Recientemente se ha observado que varias quimiocinas y receptores como CXCL12/CXCR4 ¹⁴⁶, CCL5/CCR5 ¹⁴⁷, CCL16 ¹⁵⁰, CCL19 y CCL21 ¹⁵¹ pueden inducir maduración de CDs, incluso al mismo nivel que lo hace el LPS. Así, antagonistas de CXCR4 disminuyen el número de CDs maduras derivadas de médula ósea ¹⁴⁶; CDs de pulmón del ratón $CCR5^{-/-}$ que son menos eficientes que las CDs del ratón silvestre en capturar FITC-dextran, expresan una menor cantidad de los marcadores de maduración CD86 y MHCII, contrario a lo que sucede con las CDs del ratón de la cepa silvestre ¹⁴⁷; además a través de CCR5 se induce la secreción de IL12 por CDs $CD8\alpha$ ¹⁴⁸. CCL16 induce el aumento de CD83 y CD86 entre otras moléculas. En la maduración inducida por CCL16, P38 y PLC están involucradas ¹⁵⁰. La MAPK p38 también ha sido implicada en el proceso de maduración de CDs inducido por LPS o citocinas proinflamatorias ¹⁶⁴ y sumado a esto,

la vía de señalización de CCR7 involucra a la MAPK p38¹⁵². También se ha observado que la estimulación a través de CCR7 induce la maduración de CDs caracterizada por el aumento de CD86 y CD40. Además CCL19 aumenta la secreción de IL12, IL1 β y TNF α ¹⁵¹. Las quimiocinas CCL19 y CCL21 inducen fosforilación de Jak3 en timocitos y linfocitos T¹⁰¹. Como evidenciamos por medio de experimentos de migración *in vitro* en los cuales la falta de Jak3 inhibe la migración hacia CCL19 y CCL21 en CDs, esta cinasa parece estar involucrada en la señalización de CCR7 en CDs. De esta manera, uno de los mecanismos por los cuales la carencia de Jak3 podría afectar negativamente la maduración sería a través de la falla en la vía de señalización del receptor CCR7. No obstante los defectos de maduración *in vitro* este proceso no se afecta negativamente *in vivo* lo cual queda evidenciado al observar los mismos niveles de moléculas coestimuladoras en las CDs provenientes de bazo y ganglios mesentéricos de ambos ratones Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-}.

Recientemente se ha visto que algunos receptores de quimiocinas actúan a través de la vía JAK/STAT. Entre estos están CCR2⁹⁷, CCR5⁹⁸, CXCR4^{99 100}, CCR9¹⁰⁰ y CCR7¹⁰¹. Jak3 es expresada principalmente por células de origen hematopoyético^{85 68} y se asocia con receptores de citocinas que poseen la cadena γ c. Esta cinasa se ha visto implicada en la señalización del receptor CCR7 en timocitos y linfocitos T¹⁰¹, y como se mencionó anteriormente, en este trabajo encontramos que las CDs Jak3^{-/-} migran la migración hacia los ligandos de CCR7, CCL19 y CCL21 está drásticamente reducida. La señalización a través de este receptor es importante para orientar a las CDs hacia los ganglios linfáticos, ya que sus ligandos se expresan tanto en estos órganos (CCL19 y CCL21) como en vasos linfáticos (CCL21)³⁶. En nuestros ensayos *in vitro* observamos migración de CDs hacia CCL19 y CCL21 tanto antes de adicionar el LPS como después de adicionarlo. Al evaluar

la expresión de CCR7 en los dos estadios de estas células, inmaduro y maduro, evidenciamos que aunque si está presente en CDs inmaduras, existe un aumento en su expresión 24 horas después de la incubación con LPS. Otros reportes indican que CCR7 se expresa en CDs a pesar de no completar el proceso de maduración ya que este receptor es importante para la llegada de CDs a ganglios linfáticos en estado de reposo con el fin de mantener la homeostasis ¹²¹. Así, el defecto de las CDs Jak3^{-/-} en la migración hacia CCL19 y CCL21 se presentó tanto en CDs inmaduras como maduras y el hecho de que no observáramos diferencias en la expresión de CCR7 entre las CDs Jak3^{-/-} y Jak3^{+/+} indica que la falla en la migración se encuentra en la vía de señalización y no en el receptor.

In vivo el estudio de la migración de las células de Langerhans es uno de los principales modelos para estudiar migración de CDs ¹⁶⁵. Así, se ha logrado determinar que moléculas como CD47 ¹²⁹, leucotrienos ¹²⁶ y prostaglandinas ^{123 166} entre otras, se encuentran implicadas en el proceso de salida de estas células de la piel y su llegada a ganglios linfáticos. CXCR4 es un receptor de quimiocinas que aumenta su expresión con la maduración de las CDs ¹⁶⁷. Congruente con esto se ha determinado que aunque en menor proporción que CCR7, CXCR4 es importante para la llegada de CDs a ganglios linfáticos ¹³¹. La interacción CCR7 y sus ligandos es uno de los factores más importantes para guiar a las CDs hacia los ganglios linfáticos ¹⁶⁸. De esta manera se ha observado que el ratón CCR7^{-/-} tiene del 1-10% del número normal de CDs en éstos órganos linfoides ¹¹⁷ y el *plt/plt*, el cual sólo cuenta con CCL21-leu expresada en vasos linfáticos, también presenta una disminución en la llegada de células de piel a ganglios, aunque el fenotipo es menos severo que el CCR7^{-/-} demostrando que la expresión de CCL19/CCL21 dentro del ganglio

es necesaria para ingresar a éste ¹³². En este trabajo utilizamos un modelo de migración *ex vivo* y otro *in vivo* para evaluar la importancia de Jak3 en la migración de CDs.

Los ensayos *ex vivo* se realizaron por medio del cultivo de piel en los cuales se demostró que las CDs provenientes de ratones Jak3^{-/-} no tienen problemas para salir de la epidermis. En la epidermis las CDs se encuentran unidas a queratinocitos por medio de interacciones de E-Cadherina ¹⁶⁵. Se ha encontrado además que moléculas como JAM-A retienen a las CDs en epidermis ¹²⁰, y que ICAM-1 presente en el endotelio linfático está involucrada en el ingreso de células de Langerhans a vasos linfáticos ¹¹⁹.

En este trabajo nosotros reportamos que, al igual que las células deficientes en CCR7 ¹²¹, las CDs Jak3^{-/-} dejan la epidermis e incluso lo hacen más rápido que las CDs silvestres. Esto podría indicar que Jak3 está involucrado tanto en la migración a través de CCR7, como en algún mecanismo de retención de las células en epidermis. Se ha reportado que para ingresar a los vasos linfáticos es necesaria la presencia CCR7, ya que CDs CCR7^{-/-} no logran alinearse alrededor de estos vasos para formar los “cordones” en la dermis ¹²¹. Similar a esto, no pudimos observar la presencia de cordones en la dermis de ratones deficientes en Jak3. Después de ingresar a los vasos linfáticos, las CDs llegan hasta los ganglios donde tienen un promedio de vida de 14 días ¹¹³. Por medio de los ensayos de transferencia de CDs maduras *in vivo*, determinamos que la llegada de CDs Jak3^{-/-} se encuentra disminuida alrededor del 80%. El conjunto de estos resultados nos permite concluir que Jak3 se encuentra involucrado en la migración de CDs hacia CCR7, y que su ausencia afecta negativamente la llegada de estas células a ganglios linfáticos.

Una de las principales funciones de las CDs es inducir proliferación de LT. La activación de los linfocitos T depende principalmente de dos señales. La primera de ellas consiste en

el reconocimiento por parte del TCR del complejo MHC-Péptido. Sin la segunda señal, la cual consiste en la coestimulación, los linfocitos T pueden morir por apoptosis o volverse tolerantes ⁴. De esta manera, en este trabajo observamos que las CDs $Jak3^{-/-}$ son deficientes en inducir proliferación de linfocitos T alogénicos cuando la relación CD:LT es de 1:20. Esto podría deberse principalmente a la defectuosa expresión de moléculas coestimuladoras que presentan las CDs $Jak3^{-/-}$ en comparación a las CDs $Jak3^{+/+}$. Por otra parte, en nuestros ensayos, las relaciones altas DC:LT de CDs $Jak3^{-/-}$ sí inducen proliferación, lo cual demuestra que la diferencia en los niveles de expresión de moléculas coestimuladoras pueden ser compensados aumentando el número de CDs, lo cual aumentaría el número de complejos MHC-péptido que el linfocito puede contactar, ya que en un ensayo alogénico, los LT reconocen apenas el 10% de los complejos extraños. Así, al aumentar la relación CD:LT, aumenta también este porcentaje de posibles encuentros.

Por otra parte, en ensayos en los cuales se utilizó un sistema TCR específico, las diferencias en la activación de linfocitos T no fueron evidentes. No obstante, el sistema TCR-Ova específico no deja de ser un procedimiento forzado, en el cual la mayoría de TCRs reconocerán los complejos MHC-péptido. Sumado a esto, la expresión de moléculas coestimuladoras por parte de las CDs $Jak3^{-/-}$ no es nula; a pesar de que el incremento de CD80, CD86 y MHCII en la superficie de las $Jak3^{-/-}$ no se realiza con la misma eficiencia que en las CDs $Jak3^{+/+}$; las $Jak3^{-/-}$ sí aumentan la expresión de dichas moléculas con la adición del LPS. Congruente con los resultados de linfoproliferación obtenidos en los ensayos de TCR-OVA específicos, observamos por videomicroscopía que las CDs $Jak3^{-/-}$ sí son capaces de establecer contacto con LT CD4+, aunque el número de LT que pueden contactar es menor que las CDs $Jak3^{+/+}$.

La funcionalidad de las CD4s fue evaluada también mediante ensayos de DTH. En una DTH, un estímulo sensibilizador activa a los linfocitos T vírgenes a proliferar y diferenciarse en células efectoras. Esta activación es llevada a cabo por las CD4s, las cuales realizan la presentación antigénica a los linfocitos T vírgenes en los ganglios linfáticos. Un subsecuente reto con el antígeno conduce a inmunidad celular, en la cual, se induce activación de macrófagos y linfocitos principalmente, lo cual conduce a inflamación. Para llegar a los ganglios a realizar la presentación antigénica, las CD4s deben ingresar a los vasos linfáticos. La evidencia que obtuvimos de que las CD4s $Jak3^{-/-}$ no forman los cordones alrededor de los vasos linfáticos sumado a que éstas células no ingresan a éstos órganos linfoides después de la transferencia adoptiva, es congruente con el hecho de que la inflamación, medida como el grosor de la oreja después de aplicar el reto en el ensayo de DTH, es menor en la piel de ratones $Jak3^{-/-}$ comparada con el grosor de la piel de oreja de ratones $Jak3^{+/+}$. Sin embargo, al hacer el recuento de células infiltradas en el sitio de inflamación encontramos que, en comparación al tejido sensibilizado con vehículo, en el ratón deficiente en $Jak3$, sí existe un incremento del número de células reclutadas al sitio de inflamación, aunque éste no es tan significativo ($Jak3^{-/-}$ $P= 0.05$) en comparación con el aumento del número de células en el ratón $Jak3^{+/+}$ ($P= 0.001$). Esto evidencia que la activación de los LT se está dando en un órgano diferente a los ganglios linfáticos, ya que éstos se encuentran ausentes en el ratón $Jak3^{-/-}$. Se ha reportado que el ratón *plt*, el cual únicamente posee CCL21 en vasos linfáticos, sí genera respuesta en un ensayo de sensibilización por contacto; y aunque lo hace de manera retardada, esta respuesta es exacerbada en comparación con la respuesta del ratón de la cepa silvestre. En ese caso, a pesar de que si se observan LT y CD4s en ganglios linfáticos, se observa también una

acumulación de CD^s y LT en el bazo ¹³². De esta manera, en nuestro caso podría estarse dando la activación de LT por parte de CD^s en este órgano linfoide.

En los ensayos de DTH determinamos además el número de células de Langerhans presentes en el sitio de inflamación después del reto. En estado de reposo, las células salen de la epidermis a una frecuencia baja pero constante ^{114 121 115}. En este caso la reconstitución de la población está a cargo de precursores presentes en la misma piel ¹¹⁴. Por el contrario, al inducir inflamación, las células de Langerhans extienden y recogen sus dendritas y salen de la piel en cuestión de horas ¹¹⁵. En este caso la población de células de Langerhans se restablece a partir de precursores provenientes de sangre ^{114 118}. Estos precursores son monocitos GR1⁺ que se incorporan a la epidermis; se tornan Langerina positivos y adquieren la morfología característica de célula de Langerhans extendiendo sus dendritas ¹¹⁸. En nuestros ensayos encontramos que después del reto, las células de Langerhans del ratón Jak3^{-/-} no retornan a la epidermis con la misma eficiencia que las células de Langerhans del ratón Jak3^{+/+}, demostrando que la cinasa Jak3 se encuentra involucrada en este proceso.

En Linfocitos T, timocitos y células de ganglios linfáticos, la tirosina cinasa Jak3 se ha visto involucrada en la vía de señalización de receptores de quimiocinas como CCR9 ¹⁰⁰, CXCR4^{99 100}, CCR9 y CCR7¹⁰¹. En este trabajo reportamos que Jak3 también es importante en la activación inducida por los ligandos de CCR7, CCL19 y CCL21 en CD^s. Debido a la importancia de este receptor en la migración de CD^s hacia los ganglios linfáticos, el ratón deficiente en la cinasa Jak3 presenta una llegada disminuida de CD^s a ganglios linfáticos. Congruente con esta deficiencia, la respuesta de DTH se encuentra

disminuida en el ratón $Jak3^{-/-}$. Asimismo, la maduración de las CD s $Jak3^{-/-}$ se encuentra afectada negativamente, lo cual se ve reflejado en la funcionalidad de éstas células, las cuales son incapaces de inducir linfoproliferación alogénica a los mismos niveles de las CD s $Jak3^{+/+}$.

Así, las fallas en maduración y migración de CD s $Jak3^{-/-}$ inducida a través de CCR7 nos permiten concluir que esta cinasa se encuentra involucrada en ambos procesos; por lo tanto, su ausencia afecta de manera negativa tanto la migración como la funcionalidad de las CD s .

XI. CONCLUSIONES

- El porcentaje de CD45 de bazo no presenta diferencias entre ratones $Jak3^{-/-}$ y $Jak3^{+/+}$.
- El número total de células que expresan CD11c está aumentado en los cultivos de médula ósea de ratones $Jak3^{-/-}$ comparado con los cultivos provenientes de ratones de la cepa silvestre.
- La ausencia de $Jak3$ afecta negativamente el proceso de maduración de células dendríticas.
- La quimiotaxis de CD45 inducida por las quimiocinas CCL19 y CCL21 *in vitro*, se reduce en ausencia de $Jak3$.
- $Jak3$ no se necesita para el paso de células de Langerhans de epidermis a dermis.
- La ausencia de $Jak3$ afecta negativamente la migración de CD45 a ganglios linfáticos.
- La linfoproliferación inducida por CD45 $Jak3^{-/-}$ en MLR se ve disminuida cuando la relación CD45:LT es mayor que 1:10.
- En ensayos de DTH, el proceso inflamatorio es menor en ratones deficientes en $Jak3$.
- $Jak3$ es necesario para el reclutamiento de células de Langerhans en procesos inflamatorios.

VII. PERSPECTIVAS

- Evaluar la fosforilación de Jak3 inducida por los ligandos de CCR7, CCL19 y CCL21.
- Los experimentos de proliferación haciendo uso del modelo TCR específico para OVA sugieren a que la apoptosis de linfocitos T cultivados con CDs Jak3^{-/-} a una relación de CDs:LT de 1:2 es similar a la apoptosis de linfocitos T cultivados con CDs Jak3^{+/+} a una relación de 1:20. No obstante, La n de estos experimentos no es suficiente para concluir que las CDs deficientes en Jak3 inducen apoptosis de LT, por lo cual aumentar tanto la n de este tipo de experimentos es necesario.
- Los ensayos que indican que la duración de los contactos entre CDJak3^{-/-} y LT es similar a la duración de los contactos entre CD Jak3^{+/+} y LT, así como los datos que señalan que el número de contactos es menor al utilizar CDs Jak3^{-/-} también requieren aumentar la n para que sean concluyentes.
- Debido a que en los experimentos de cultivo de piel y en las DTH se observó que las CDs provenientes del ratón Jak3^{-/-} migran de la epidermis más rápido que las CDs provenientes del ratón Jak3^{+/+}, es necesario analizar el papel de Jak3 en la retención de CDs en la epidermis

VIII. GLOSARIO

CDs: Células dendríticas

CL: Células de Langerhans

PRR: Receptores de Reconocimiento de Patrón

TLRs: Receptores Tipo Toll

LPS: Lipopolisacárido

dsRNA: RNA de doble cadena

CpG: Secuencia plasmídica de DNA común en bacterias

PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

TCR: Receptor de células T

BCR: Receptor de células B

APCs: Presentadoras de antígeno profesionales

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

GPCRs: Receptores de siete hélices transmembranales acoplados a proteína G heterotrimérica

Jak: Cinasas de Janus

STAT: Transductores de la señal y activadores de la transcripción

MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógenos

MMPs: Metaloproteasas de matriz extracelular

LN: Ganglios linfáticos

HEVs: Vénulas de endotelio alto

fMLP: Péptidos N-formilmetionilados

GM-CSF: Factor estimulador de Colonias de Granulocitos y Monocitos

XIV. BIBLIOGRAFIA

1. Visintin A, Mazzone A, Spitzer JH *et al.* Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166: 249-55.
2. Delneste Y, Beauvillain C, Jeannin P. [Innate immunity: structure and function of TLRs]. *Med Sci (Paris)* 2007; 23: 67-73.
3. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 19-30.
4. Banchereau J, Briere F, Caux C *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
5. Fernandez EJ, Lolis E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 42: 469-99.
6. Viola A, Luster AD. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008; 48: 171-97.
7. Soriano SF, Serrano A, Hernanz-Falcon P *et al.* Chemokines integrate JAK/STAT and G-protein pathways during chemotaxis and calcium flux responses. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1328-33.
8. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M *et al.* The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol* 2004; 5: 253.
9. Miyasaka M, Tanaka T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 360-70.
10. Sanchez-Sanchez N, Riol-Blanco L, Rodriguez-Fernandez JL. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol* 2006; 176: 5153-9.
11. Musso T, Johnston JA, Linnekin D *et al.* Regulation of JAK3 expression in human monocytes: phosphorylation in response to interleukins 2, 4, and 7. *J Exp Med* 1995; 181: 1425-31.
12. Saemann MD, Kelemen P, Zeyda M *et al.* CD40 triggered human monocyte-derived dendritic cells convert to tolerogenic dendritic cells when JAK3 activity is inhibited. *Transplant Proc* 2002; 34: 1407-8.
13. Moser B, Wolf M, Walz A *et al.* Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 2004; 25: 75-84.
14. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 593-620.
15. Mehrad B, Keane MP, Strieter RM. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb Haemost* 2007; 97: 755-62.
16. Bachmann MF, Kopf M, Marsland BJ. Chemokines: more than just road signs. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 159-64.

17. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001; 2: 108-15.
18. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI *et al.* Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 678-89.
19. Thelen M, Peveri P, Kernen P *et al.* Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. *FASEB J* 1988; 2: 2702-6.
20. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2001; 2: 129-34.
21. Holmes WE, Lee J, Kuang WJ *et al.* Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 1991; 253: 1278-80.
22. Murphy PM, Tiffany HL. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 1991; 253: 1280-3.
23. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A *et al.* Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 1998; 279: 381-4.
24. Clore GM, Gronenborn AM. Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines. *FASEB J* 1995; 9: 57-62.
25. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB *et al.* Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 1994; 266: 1395-9.
26. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G *et al.* A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997; 385: 640-4.
27. Imai T, Hieshima K, Haskell C *et al.* Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997; 91: 521-30.
28. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 121-7.
29. Liu Z, Christensson M, Forslow A *et al.* A CD26-controlled cell surface cascade for regulation of T cell motility and chemokine signals. *J Immunol* 2009; 183: 3616-24.
30. Dean RA, Overall CM. Proteomics discovery of metalloproteinase substrates in the cellular context by iTRAQ labeling reveals a diverse MMP-2 substrate degradome. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6: 611-23.
31. Pertuz BS, Ostoa SP, Benitez I *et al.* Entamoeba histolytica cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leucocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines. *Parasite Immunol* 2004; 26: 237-41.
32. Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z *et al.* Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1885-90.
33. Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K *et al.* Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 703-11.
34. L'Heureux GP, Bourgoin S, Jean N *et al.* Diverging signal transduction pathways activated by interleukin-8 and related chemokines in human

neutrophils: interleukin-8, but not NAP-2 or GRO alpha, stimulates phospholipase D activity. *Blood* 1995; 85: 522-31.

35. Jones SA, Wolf M, Qin S *et al.* Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 6682-6.
36. von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 867-78.
37. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991; 65: 859-73.
38. Mempel TR, Scimone ML, Mora JR *et al.* In vivo imaging of leukocyte trafficking in blood vessels and tissues. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 406-17.
39. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-14.
40. Oynebraten I, Bakke O, Brandtzaeg P *et al.* Rapid chemokine secretion from endothelial cells originates from 2 distinct compartments. *Blood* 2004; 104: 314-20.
41. Salas A, Shimaoka M, Kogan AN *et al.* Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction. *Immunity* 2004; 20: 393-406.
42. Arnaout MA, Mahalingam B, Xiong JP. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 381-410.
43. Forster R, Schubel A, Breitfeld D *et al.* CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999; 99: 23-33.
44. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283: R7-28.
45. Carrigan SO, Pink DB, Stadnyk AW. Neutrophil transepithelial migration in response to the chemoattractant fMLP but not C5a is phospholipase D-dependent and related to the use of CD11b/CD18. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 1575-84.
46. Ruchaud-Sparagano MH, Walker TR, Rossi AG *et al.* Soluble E-selectin acts in synergy with platelet-activating factor to activate neutrophil beta 2-integrins. Role of tyrosine kinases and Ca²⁺ mobilization. *J Biol Chem* 2000; 275: 15758-64.
47. Khreiss T, Jozsef L, Chan JS *et al.* Activation of extracellular signal-regulated kinase couples platelet-activating factor-induced adhesion and delayed apoptosis of human neutrophils. *Cell Signal* 2004; 16: 801-10.
48. Henderson R, Baldwin JM, Ceska TA *et al.* Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol* 1990; 213: 899-929.

49. Pebay-Peyroula E, Rummel G, Rosenbusch JP *et al.* X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* 1997; 277: 1676-81.
50. Maghazachi AA. Intracellular signaling events at the leading edge of migrating cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 931-43.
51. Clark-Lewis I, Schumacher C, Baggiolini M *et al.* Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH₂-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. *J Biol Chem* 1991; 266: 23128-34.
52. Miller AF, Falke JJ. Chemotaxis receptors and signaling. *Adv Protein Chem* 2004; 68: 393-444.
53. Yen H, Zhang Y, Penfold S *et al.* MCP-1-mediated chemotaxis requires activation of non-overlapping signal transduction pathways. *J Leukoc Biol* 1997; 61: 529-32.
54. Wain JH, Kirby JA, Ali S. Leucocyte chemotaxis: Examination of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase activation by Monocyte Chemoattractant Proteins-1, -2, -3 and -4. *Clin Exp Immunol* 2002; 127: 436-44.
55. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2001; 2: 129-34.
56. Timpson P, Jones GE, Frame MC *et al.* Coordination of cell polarization and migration by the Rho family GTPases requires Src tyrosine kinase activity. *Curr Biol* 2001; 11: 1836-46.
57. Pestonjamas KN, Forster C, Sun C *et al.* Rac1 links leading edge and uropod events through Rho and myosin activation during chemotaxis. *Blood* 2006; 108: 2814-20.
58. Gismondi A, Jacobelli J, Strippoli R *et al.* Proline-rich tyrosine kinase 2 and Rac activation by chemokine and integrin receptors controls NK cell transendothelial migration. *J Immunol* 2003; 170: 3065-73.
59. Cohen-Hillel E, Yron I, Meshel T *et al.* CXCL8-induced FAK phosphorylation via CXCR1 and CXCR2: cytoskeleton- and integrin-related mechanisms converge with FAK regulatory pathways in a receptor-specific manner. *Cytokine* 2006; 33: 1-16.
60. van Buul JD, Voermans C, van Gelderen J *et al.* Leukocyte-endothelium interaction promotes SDF-1-dependent polarization of CXCR4. *J Biol Chem* 2003; 278: 30302-10.
61. Gomez-Mouton C, Lacalle RA, Mira E *et al.* Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *J Cell Biol* 2004; 164: 759-68.
62. Watson N, Linder ME, Druey KM *et al.* RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein alpha-subunits. *Nature* 1996; 383: 172-5.

63. Han JI, Huang NN, Kim DU *et al.* RGS1 and RGS13 mRNA silencing in a human B lymphoma line enhances responsiveness to chemoattractants and impairs desensitization. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 1357-68.
64. Vroon A, Heijnen CJ, Kavelaars A. GRKs and arrestins: regulators of migration and inflammation. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 1214-21.
65. Soriano SF, Hernanz-Falcon P, Rodriguez-Frade JM *et al.* Functional inactivation of CXC chemokine receptor 4-mediated responses through SOCS3 up-regulation. *J Exp Med* 2002; 196: 311-21.
66. Wilks AF, Harpur AG, Kurban RR *et al.* Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 2057-65.
67. Harpur AG, Andres AC, Ziemiecki A *et al.* JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene* 1992; 7: 1347-53.
68. Kawamura M, McVicar DW, Johnston JA *et al.* Molecular cloning of L-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 6374-8.
69. Rane SG, Reddy EP. JAK3: a novel JAK kinase associated with terminal differentiation of hematopoietic cells. *Oncogene* 1994; 9: 2415-23.
70. Takahashi T, Shirasawa T. Molecular cloning of rat JAK3, a novel member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *FEBS Lett* 1994; 342: 124-8.
71. Firmbach-Kraft I, Byers M, Shows T *et al.* tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes. *Oncogene* 1990; 5: 1329-36.
72. Boggon TJ, Li Y, Manley PW *et al.* Crystal structure of the Jak3 kinase domain in complex with a staurosporine analog. *Blood* 2005; 106: 996-1002.
73. Saharinen P, Silvennoinen O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J Biol Chem* 2002; 277: 47954-63.
74. Frank SJ, Gilliland G, Kraft AS *et al.* Interaction of the growth hormone receptor cytoplasmic domain with the JAK2 tyrosine kinase. *Endocrinology* 1994; 135: 2228-39.
75. Zhou YJ, Chen M, Cusack NA *et al.* Unexpected effects of FERM domain mutations on catalytic activity of Jak3: structural implication for Janus kinases. *Mol Cell* 2001; 8: 959-69.
76. Barbieri G, Velazquez L, Scrobogna M *et al.* Activation of the protein tyrosine kinase tyk2 by interferon alpha/beta. *Eur J Biochem* 1994; 223: 427-35.
77. Velazquez L, Fellous M, Stark GR *et al.* A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* 1992; 70: 313-22.
78. Shimoda K, Kato K, Aoki K *et al.* Tyk2 plays a restricted role in IFN alpha signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. *Immunity* 2000; 13: 561-71.

79. Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* 2007; 282: 20059-63.
80. Riedy MC, Dutra AS, Blake TB *et al.* Genomic sequence, organization, and chromosomal localization of human JAK3. *Genomics* 1996; 37: 57-61.
81. Witthuhn BA, Silvennoinen O, Miura O *et al.* Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature* 1994; 370: 153-7.
82. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 293-322.
83. Suzuki K, Nakajima H, Saito Y *et al.* Janus kinase 3 (Jak3) is essential for common cytokine receptor gamma chain (gamma(c))-dependent signaling: comparative analysis of gamma(c), Jak3, and gamma(c) and Jak3 double-deficient mice. *Int Immunol* 2000; 12: 123-32.
84. O'Shea JJ, Husa M, Li D *et al.* Jak3 and the pathogenesis of severe combined immunodeficiency. *Mol Immunol* 2004; 41: 727-37.
85. Thomis DC, Gurniak CB, Tivol E *et al.* Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3. *Science* 1995; 270: 794-7.
86. Nosaka T, van Deursen JM, Tripp RA *et al.* Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science* 1995; 270: 800-2.
87. Thomis DC, Berg LJ. The role of Jak3 in lymphoid development, activation, and signaling. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 541-7.
88. Yamaoka K, Min B, Zhou YJ *et al.* Jak3 negatively regulates dendritic-cell cytokine production and survival. *Blood* 2005; 106: 3227-33.
89. Rane SG, Mangan JK, Amanullah A *et al.* Activation of the Jak3 pathway is associated with granulocytic differentiation of myeloid precursor cells. *Blood* 2002; 100: 2753-62.
90. Thomis DC, Berg LJ. Peripheral expression of Jak3 is required to maintain T lymphocyte function. *J Exp Med* 1997; 185: 197-206.
91. Grossman WJ, Verbsky JW, Yang L *et al.* Dysregulated myelopoiesis in mice lacking Jak3. *Blood* 1999; 94: 932-9.
92. Suzuki K, Nakajima H, Watanabe N *et al.* Role of common cytokine receptor gamma chain (gamma(c))- and Jak3-dependent signaling in the proliferation and survival of murine mast cells. *Blood* 2000; 96: 2172-80.
93. Lutz MB, Schnare M, Menges M *et al.* Differential functions of IL-4 receptor types I and II for dendritic cell maturation and IL-12 production and their dependency on GM-CSF. *J Immunol* 2002; 169: 3574-80.
94. Behrmann I, Smyczek T, Heinrich PC *et al.* Janus kinase (Jak) subcellular localization revisited: the exclusive membrane localization of endogenous Janus kinase 1 by cytokine receptor interaction uncovers the Jak.receptor complex to be equivalent to a receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2004; 279: 35486-93.

95. Rane SG, Reddy EP. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene* 2002; 21: 3334-58.
96. Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 211-7.
97. Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Aragay A *et al.* The chemokine monocyte chemoattractant protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *J Immunol* 1998; 161: 805-13.
98. Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Martin A *et al.* Similarities and differences in RA. *J Cell Biol* 1999; 144: 755-65.
99. Vila-Coro AJ, Rodriguez-Frade JM, Martin dA *et al.* The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J* 1999; 13: 1699-710.
100. Soldevila G, Licona I, Salgado A *et al.* Impaired chemokine-induced migration during T-cell development in the absence of Jak 3. *Immunology* 2004; 112: 191-200.
101. Garcia-Zepeda EA, Licona-Limon I, Jimenez-Solomon MF *et al.* Janus kinase 3-deficient T lymphocytes have an intrinsic defect in CCR7-mediated homing to peripheral lymphoid organs. *Immunology* 2007; 122: 247-60.
102. Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, De Ana AM *et al.* The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 3628-33.
103. Trettel F, Di Bartolomeo S, Lauro C *et al.* Ligand-independent CXCR2 dimerization. *J Biol Chem* 2003; 278: 40980-8.
104. Wilson S, Wilkinson G, Milligan G. The CXCR1 and CXCR2 receptors form constitutive homo- and heterodimers selectively and with equal apparent affinities. *J Biol Chem* 2005; 280: 28663-74.
105. Wong M, Uddin S, Majchrzak B *et al.* Rantes activates Jak2 and Jak3 to regulate engagement of multiple signaling pathways in T cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 11427-31.
106. Zhang XF, Wang JF, Matczak E *et al.* Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1alpha-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2001; 97: 3342-8.
107. Stein JV, Soriano SF, M'rini C *et al.* CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway. *Blood* 2003; 101: 38-44.
108. Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol* 2005; 17: 273-83.
109. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137: 1142-62.

110. Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 2002; 82: 97-130.
111. Manz MG, Traver D, Miyamoto T *et al.* Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 2001; 97: 3333-41.
112. Traver D, Akashi K, Manz M *et al.* Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 2000; 290: 2152-4.
113. Liu K, Waskow C, Liu X *et al.* Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat Immunol* 2007; 8: 578-83.
114. Merad M, Manz MG, Karsunky H *et al.* Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 2002; 3: 1135-41.
115. Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B *et al.* Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 2005; 22: 643-54.
116. Cavanagh LL, von Andrian UH. Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 448-62.
117. MartIn-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken UE *et al.* Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 2003; 198: 615-21.
118. Ginhoux F, Tacke F, Angeli V *et al.* Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 2006; 7: 265-73.
119. Xu H, Guan H, Zu G *et al.* The role of ICAM-1 molecule in the migration of Langerhans cells in the skin and regional lymph node. *Eur J Immunol* 2001; 31: 3085-93.
120. Cera MR, Del Prete A, Vecchi A *et al.* Increased DC trafficking to lymph nodes and contact hypersensitivity in junctional adhesion molecule-A-deficient mice. *J Clin Invest* 2004; 114: 729-38.
121. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N *et al.* CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 2004; 21: 279-88.
122. Verbovetski I, Bychkov H, Trahtemberg U *et al.* Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *J Exp Med* 2002; 196: 1553-61.
123. Scandella E, Men Y, Gillessen S *et al.* Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2002; 100: 1354-61.
124. Kabashima K, Sakata D, Nagamachi M *et al.* Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nat Med* 2003; 9: 744-9.

125. Luft T, Jefford M, Luetjens P *et al.* Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood* 2002; 100: 1362-72.
126. Robbiani DF, Finch RA, Jager D *et al.* The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell* 2000; 103: 757-68.
127. Yanagawa Y, Onoe K. CCL19 induces rapid dendritic extension of murine dendritic cells. *Blood* 2002; 100: 1948-56.
128. Ratzinger G, Stoitzner P, Ebner S *et al.* Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *J Immunol* 2002; 168: 4361-71.
129. Van VQ, Lesage S, Bouguermouh S *et al.* Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs. *EMBO J* 2006; 25: 5560-8.
130. Qu C, Edwards EW, Tacke F *et al.* Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. *J Exp Med* 2004; 200: 1231-41.
131. Kabashima K, Shiraishi N, Sugita K *et al.* CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells. *Am J Pathol* 2007; 171: 1249-57.
132. Mori S, Nakano H, Aritomi K *et al.* Mice lacking expression of the chemokines CCL21-ser and CCL19 (plt mice) demonstrate delayed but enhanced T cell immune responses. *J Exp Med* 2001; 193: 207-18.
133. Lindquist RL, Shakhar G, Dudziak D *et al.* Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat Immunol* 2004; 5: 1243-50.
134. Kaiser A, Donnadieu E, Abastado JP *et al.* CC chemokine ligand 19 secreted by mature dendritic cells increases naive T cell scanning behavior and their response to rare cognate antigen. *J Immunol* 2005; 175: 2349-56.
135. Real E, Kaiser A, Raposo G *et al.* Immature dendritic cells (DCs) use chemokines and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin, to stimulate CD4+ T cells in the absence of exogenous antigen. *J Immunol* 2004; 173: 50-60.
136. Rimoldi M, Rescigno M. Uptake and presentation of orally administered antigens. *Vaccine* 2005; 23: 1793-6.
137. Sixt M, Kanazawa N, Selg M *et al.* The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* 2005; 22: 19-29.
138. Linsley PS, Greene JL, Tan P *et al.* Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 1992; 176: 1595-604.
139. Blander JM, Medzhitov R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 2006; 440: 808-12.

140. Degli-Esposti MA, Smyth MJ. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 112-24.
141. Thery C, Duban L, Segura E *et al.* Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* 2002; 3: 1156-62.
142. Segura E, Guerin C, Hogg N *et al.* CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J Immunol* 2007; 179: 1489-96.
143. Segura E, Nicco C, Lombard B *et al.* ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* 2005; 106: 216-23.
144. Rock KL, Shen L. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* 2005; 207: 166-83.
145. den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 2000; 192: 1685-96.
146. Kabashima K, Sugita K, Shiraishi N *et al.* CXCR4 engagement promotes dendritic cell survival and maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361: 1012-6.
147. Grayson MH, Ramos MS, Rohlfs MM *et al.* Controls for lung dendritic cell maturation and migration during respiratory viral infection. *J Immunol* 2007; 179: 1438-48.
148. Aliberti J, Reis e Sousa, Schito M *et al.* CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat Immunol* 2000; 1: 83-7.
149. Aliberti J, Valenzuela JG, Carruthers VB *et al.* Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 485-90.
150. Cappello P, Fraone T, Barberis L *et al.* CC-chemokine ligand 16 induces a novel maturation program in human immature monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2006; 177: 6143-51.
151. Marsland BJ, Battig P, Bauer M *et al.* CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity* 2005; 22: 493-505.
152. Riol-Blanco L, Sanchez-Sanchez N, Torres A *et al.* The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *J Immunol* 2005; 174: 4070-80.
153. Yanagawa Y, Onoe K. CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant up-regulation of Cdc42 and Rac activities. *Blood* 2003; 101: 4923-9.
154. Sanchez-Sanchez N, Riol-Blanco L, de la RG *et al.* Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells. *Blood* 2004; 104: 619-25.

155. Saemann MD, Diakos C, Kelemen P *et al.* Prevention of CD40-triggered dendritic cell maturation and induction of T-cell hyporeactivity by targeting of Janus kinase 3. *Am J Transplant* 2003; 3: 1341-9.
156. Reis e Sousa. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol* 2004; 16: 27-34.
157. Cella M, Engering A, Pinet V *et al.* Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997; 388: 782-7.
158. Kellermann SA, Hudak S, Oldham ER *et al.* The CC chemokine receptor-7 ligands 6CKine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells. *J Immunol* 1999; 162: 3859-64.
159. Al Shami A, Mahanna W, Naccache PH. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Selective activation of Jak2, Stat3, and Stat5b. *J Biol Chem* 1998; 273: 1058-63.
160. Malabarba MG, Kirken RA, Rui H *et al.* Activation of JAK3, but not JAK1, is critical to interleukin-4 (IL4) stimulated proliferation and requires a membrane-proximal region of IL4 receptor alpha. *J Biol Chem* 1995; 270: 9630-7.
161. Sharfe N, Dadi HK, Roifman CM. JAK3 protein tyrosine kinase mediates interleukin-7-induced activation of phosphatidylinositol-3' kinase. *Blood* 1995; 86: 2077-85.
162. Zeng YX, Takahashi H, Shibata M *et al.* JAK3 Janus kinase is involved in interleukin 7 signal pathway. *FEBS Lett* 1994; 353: 289-93.
163. Li L, Masucci MG, Levitsky V. Effect of interleukin-7 on the in vitro development and maturation of monocyte derived human dendritic cells. *Scand J Immunol* 2000; 51: 361-71.
164. Ardeshtna KM, Pizzey AR, Devereux S *et al.* The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2000; 96: 1039-46.
165. Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 617-28.
166. Scandella E, Men Y, Legler DF *et al.* CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood* 2004; 103: 1595-601.
167. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P *et al.* Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2760-9.
168. Saeki H, Moore AM, Brown MJ *et al.* Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 1999; 162: 2472-5.

