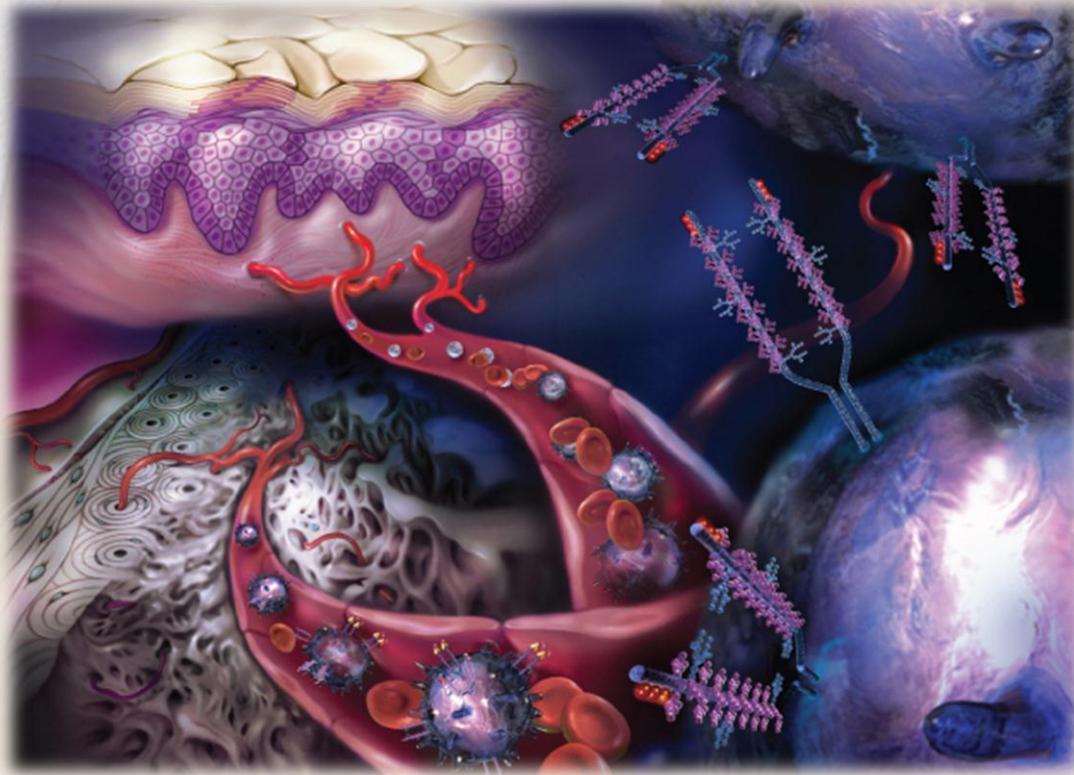


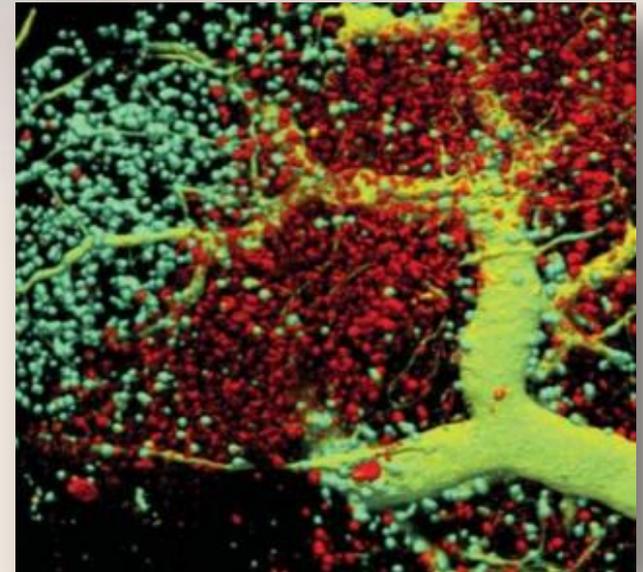
Recirculación y alojamiento



Luisa E. Barboza C.

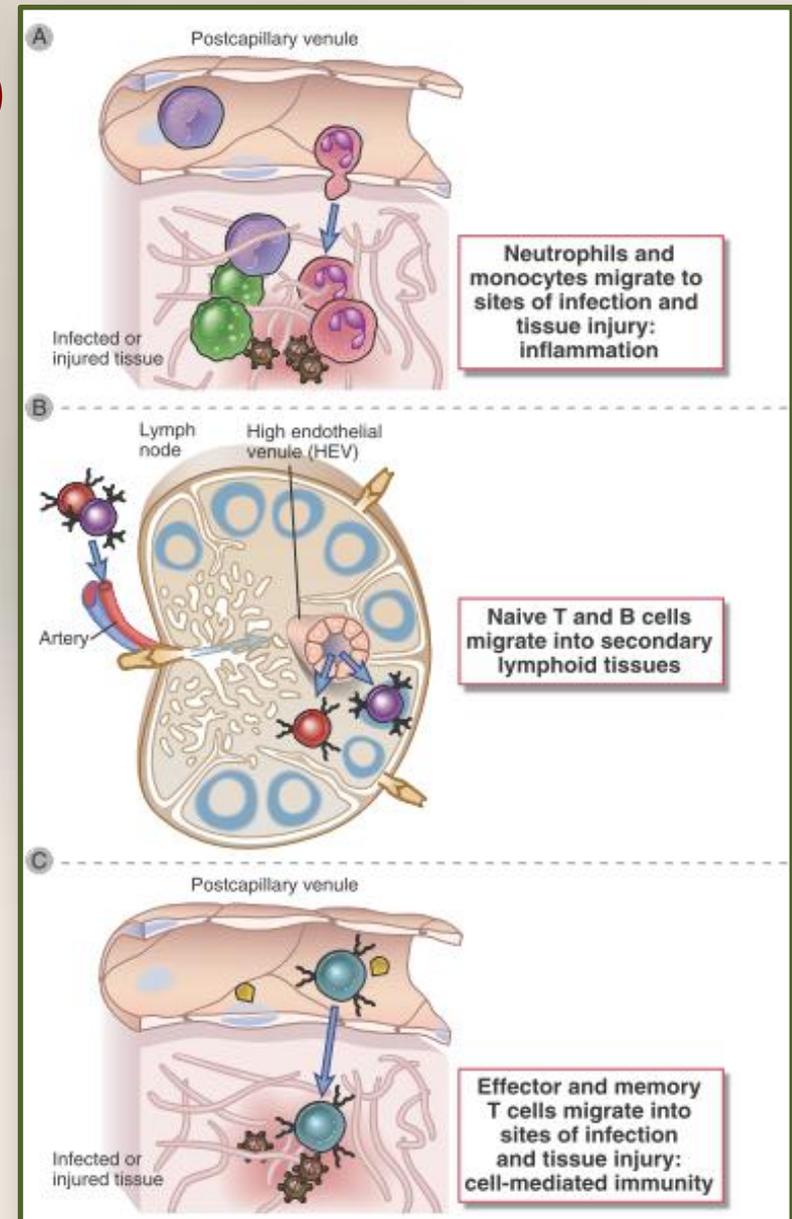
Contenido

- Generalidades
- Interacciones entre los leucocitos y el endotelio
 - Células endoteliales altas
 - Extravasación de los leucocitos
- Moléculas de adhesión:
 - Selectinas y sus ligandos
 - Integrinas y sus ligandos
- Quimiocinas y sus receptores



Tráfico leucocitario

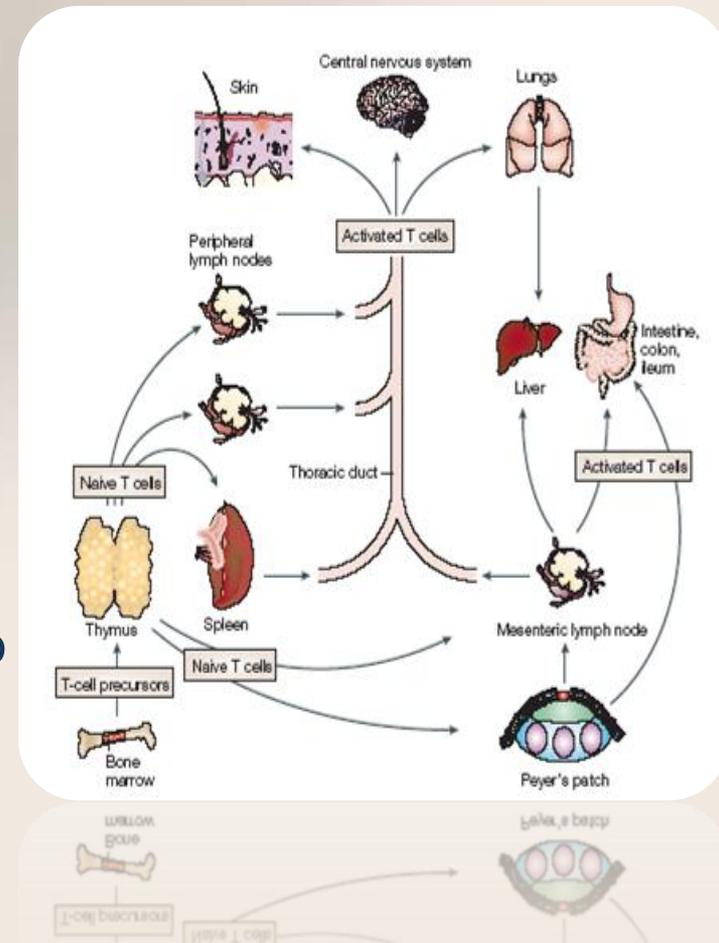
- Proceso altamente regulado:
 - Reclutamiento de neutrófilos y monocitos desde los sitios de generación hacia el sitio de la infección o de daño
 - Transporte los linfocitos desde los sitios de maduración hacia los órganos linfoides secundarios
 - Movilizar a los linfocitos desde los órganos secundarios hacia el sitio de infección



Recirculación y alojamiento de los leucocitos

Objetivos fundamentales de la recirculación y alojamiento:

- Balance en la distribución de linfocitos en los tejidos
- Selección de linfocitos Ag-específicos (órganos linfoides secundarios)
- Renovación continua de los microambientes
- Representantes en todo el cuerpo de linfocitos específicos para un determinado Ag
- Reclutamiento rápido a los sitios de inflamación



Migración leucocitaria

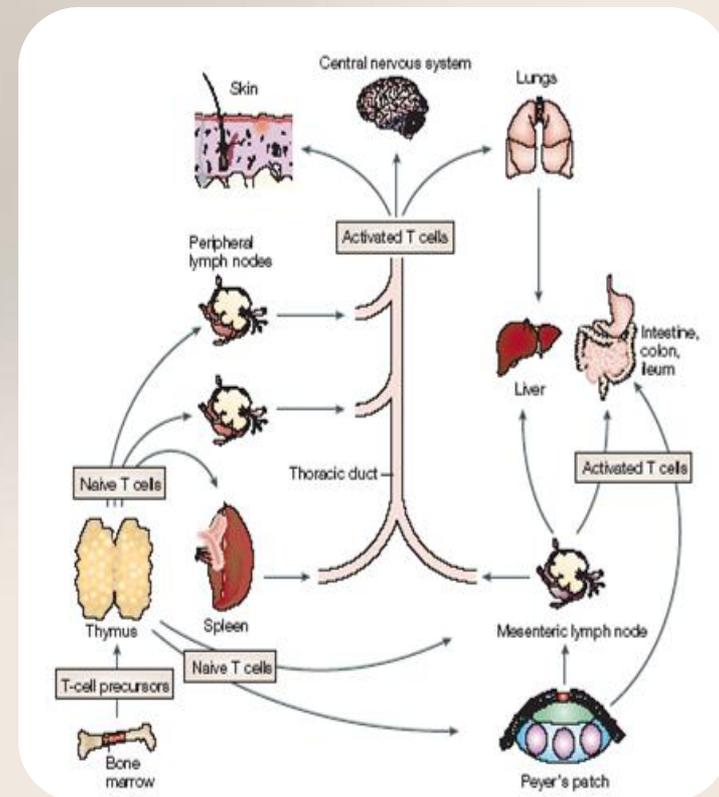
Proceso organizado

- Interacciones secuenciales entre los leucocitos y células endoteliales vasculares
- Qué determina la distribución y tráfico diferencial?
 - ✓ Expresión y activación diferencial de receptores de quimiocinas y de integrinas



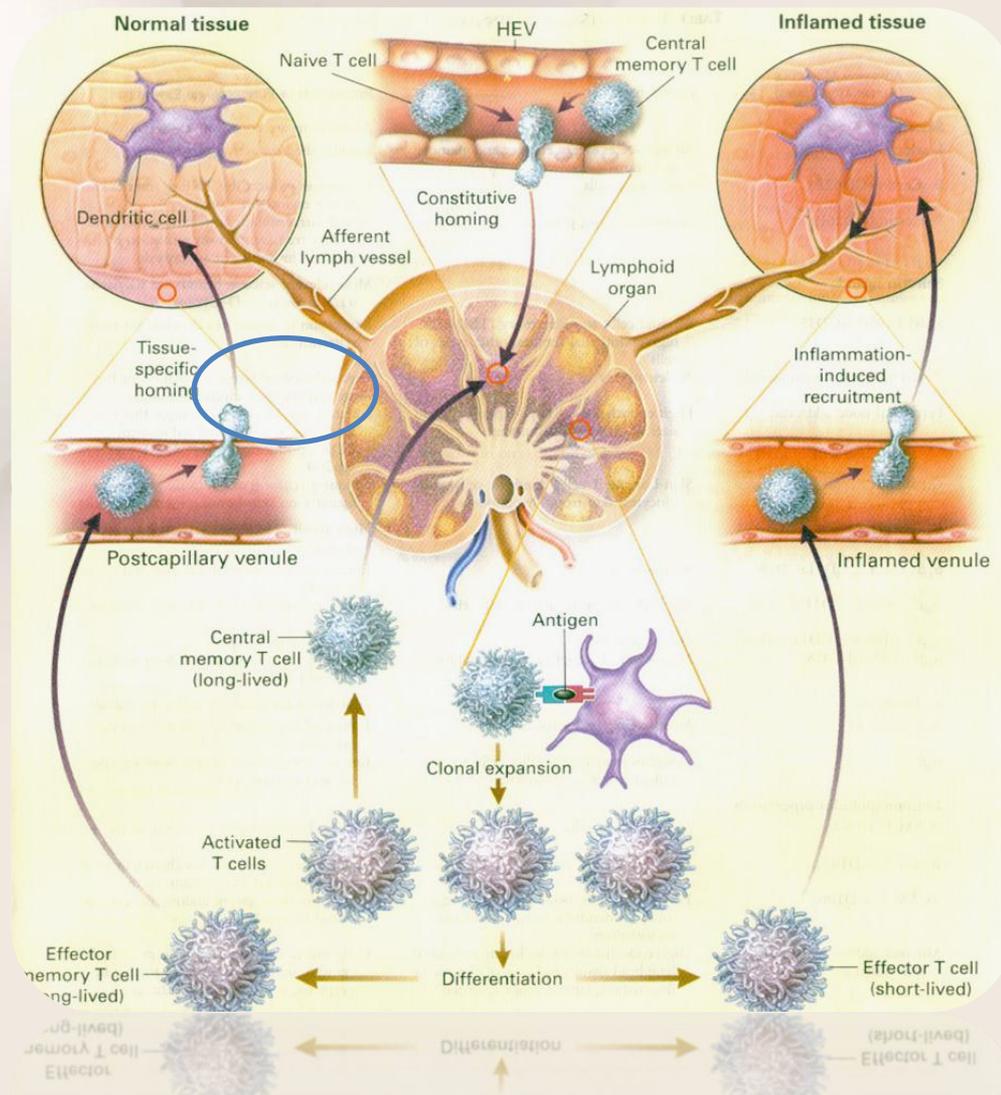
Principios generales de la migración leucocitaria

- Los leucocitos que no han sido activados por estímulos externos normalmente se encuentran en la circulación y en los órganos linfáticos
 - Luego de la activación son rápidamente reclutados a donde se necesitan
- Las células endoteliales en los sitios de infección y daño tisular también se activan, principalmente en respuesta a citoquinas secretada por los macrófagos y otras células del tejido en estos sitios.



Algunas generalidades

- Respuesta durante la activación de la inmunidad innata (fagocitosis) y adaptativa (interacción T-APC)
 - Permite encuentro con APC (célula dendrítica)
- Células T “naïve” recirculan y se alojan en órganos linfoides secundarios
- T efectoras ayudan a los linfocitos B a madurar y migran al tejido inflamado

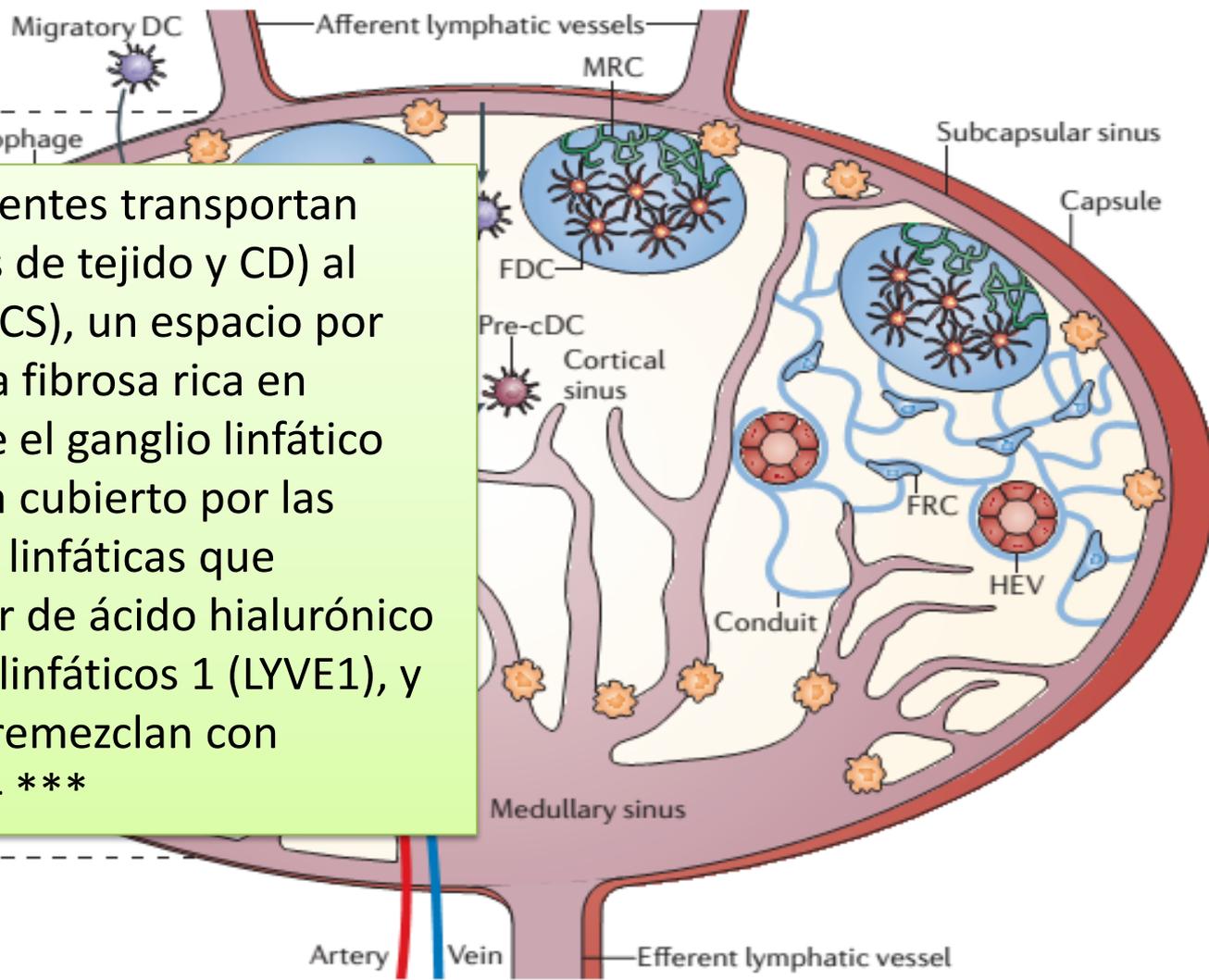


Recirculación y alojamiento: Ganglios linfáticos

≈450 NL

• Estructura:

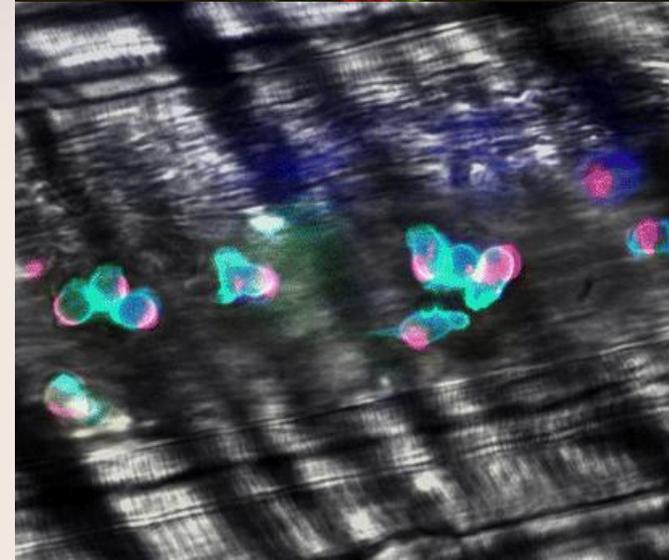
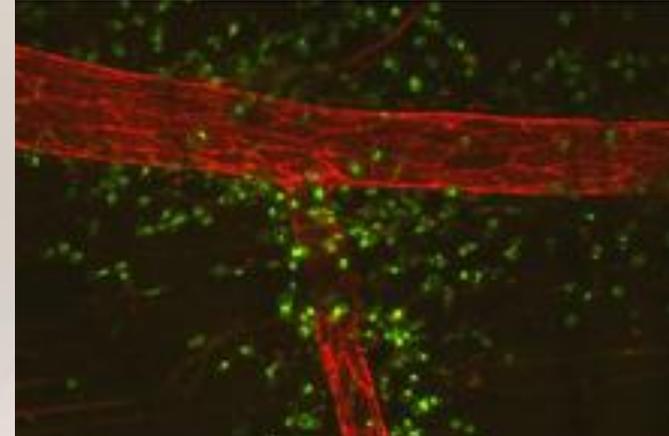
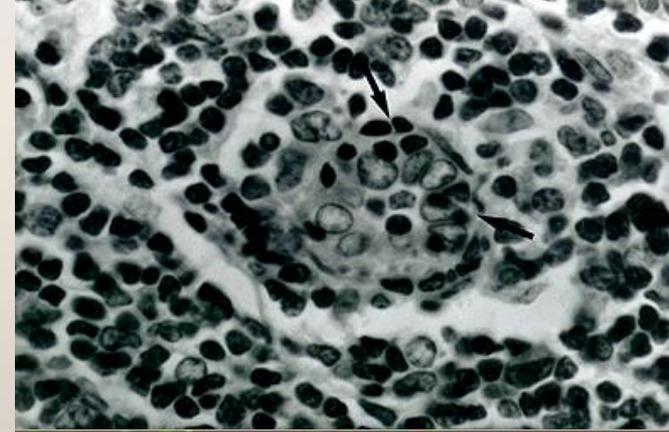
Vasos linfáticos aferentes transportan antígenos derivadas de tejido y CD) al seno subcapsular (SCS), un espacio por debajo de la cápsula fibrosa rica en colágeno que cubre el ganglio linfático. El suelo del SCS está cubierto por las células endoteliales linfáticas que expresan el receptor de ácido hialurónico endotelial de vasos linfáticos 1 (LYVE1), y estas células se entremezclan con macrófagos CD169+ ***



Tráfico Leucocitario

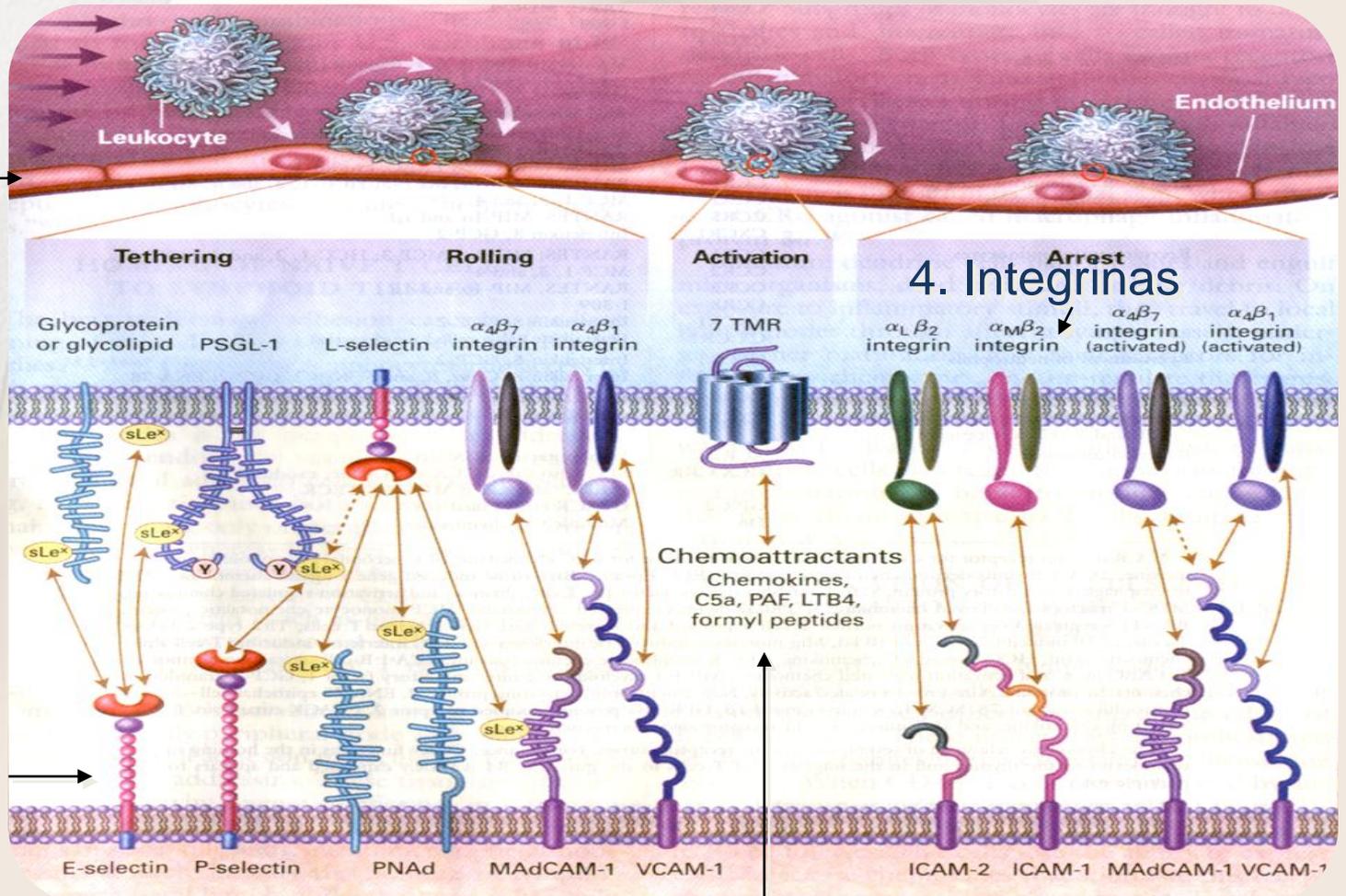
¿Qué elementos participan?

- Vénulas endoteliales altas
- Selectinas y sus ligandos
- Quimiocinas y sus receptores
- Integrinas y su interacción con moléculas de la superfamilia de Ig (moléculas de adhesión)



Reclutamiento leucocitario: Secuencia de eventos

1. HEV

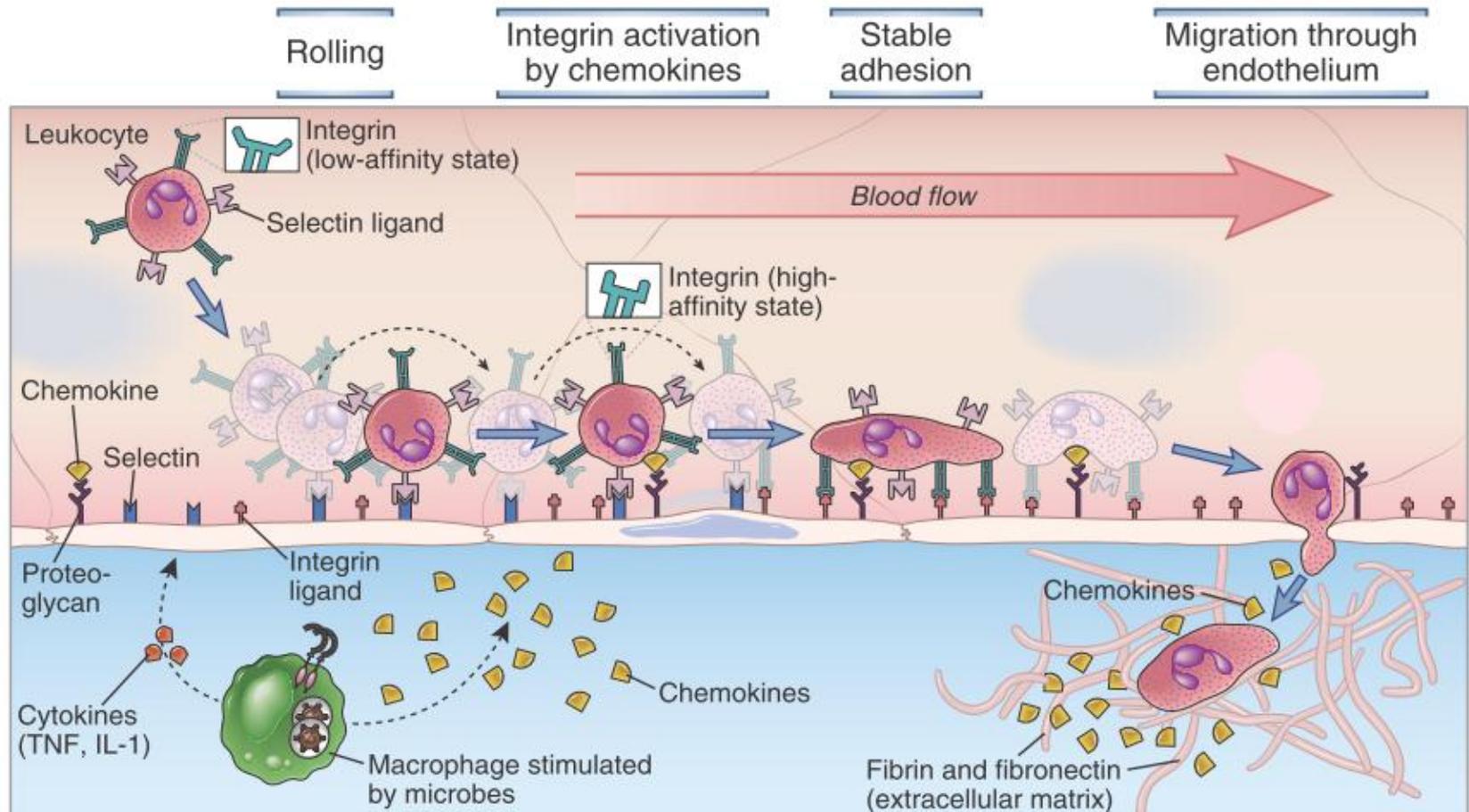


4. Integrinas

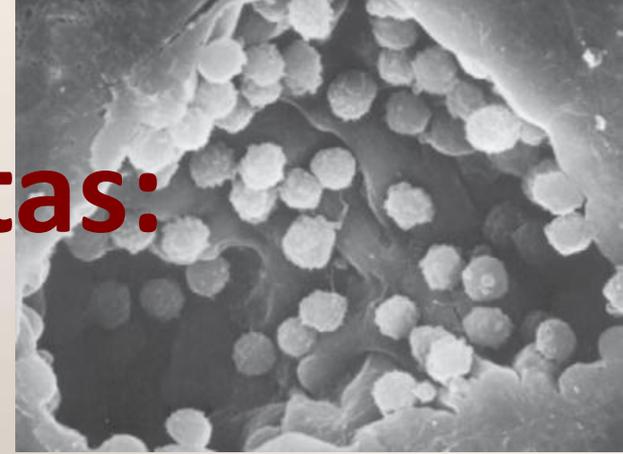
2. Selectinas

3. Quimiocinas

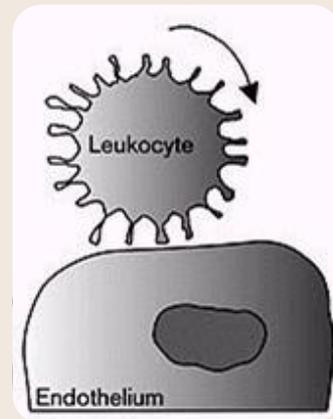
Reclutamiento leucocitario: Secuencia de eventos



Vénulas endoteliales altas: (HEVs)



- Interacción con células endoteliales altas (HEVs), ubicadas en vénulas post-capilares:
 - Son redondeadas, endotelio cuboidal, expresan adhesinas vasculares, características de cada órgano
 - Presentes en todos los órganos linfoides, excepto en el bazo
 - Se forman por influencia de linfocitos T y citocinas (linfotóxica) y quimiocinas liberadas por las células del mesenquima
 - Reconocidas por receptores de “homing” presentes en los linfocitos



Vénulas endoteliales altas: (HEVs)

- HEV sectorización:
 - Zona paracortical, interfolicular de los NL, placas de Peyer
 - HEV NL : PNAD altamente glicosilado y sulfatado (ligando de L-selectina)
 - LP y PP : MADCAM1
 - Las CDs entran por los vasos linfáticos aferentes, (excepto CD4 plasmocitoides (pCDs) luego se ubican en la vecindad de las HEV
 - Con la excepción de las pCDs las HEV no dejan pasar a los leucocitos a los NL

	Normal venule	Peripheral lymph-node HEV	Peyer's-patch HEV
			
Endothelium	Flat	Tall and plump	Tall and plump
Basal lamina	Thin	Thick	Thick
Perivascular sheath	Scanty	Prominent	Prominent
CD31	+	+	+
ICAM2	+	+	+
ICAM1	-/+	++	++
VE-cadherin	+	+	+
Sialomucins			
Core protein	+	++	+
PNAD epitope	-	++	+
Sulphation	-	+	+
MADCAM1	-	-	+
Chemokines (CCL19, CCL21, CXCL12 and CXCL13)	-	+	+

CCL, CC-chemokine ligand; CXCL, CXC-chemokine ligand; VE, vascular endothelial.

Vénulas endoteliales altas: (HEVs)

Table 1. High endothelial venules (HEV)-associated molecules and their possible functions

Molecule	Classification	Possible functions in lymphocyte trafficking
MAdCAM-1	Adhesion molecule (expressed in mucosal and immature HEV)	Integrin $\alpha_4\beta_7$ ligand, control of lymphocyte rolling and adhesion to HEV
PNAd (sulfated and glycosylated molecules, i.e. GlyCAM-1, CD34, endomucin, nepmucin)	Adhesion molecules	L-selectin ligands, control of lymphocyte tethering and rolling on HEV
ICAM-1, ICAM-2	Adhesion molecules	Integrin ligands, control of lymphocyte firm adhesion to HEV
Fuc-TVII, β 3GlcNAcT-3, GlcNAc6ST2	Enzyme	Synthesis of functional L-selectin ligand
CCL21, CCL19, CXCL13, CXCL12	Chemokines	Activation of integrins, induction of cell adhesion and migration
Autotaxin	Enzyme	Activation of lysophosphatidic acid signaling
DARC	Chemokine receptor	Chemokine immobilization, scavenging?
Mac25/angiomodulin	Growth factor binding protein	Regulation of the local concentration of growth factors/chemokines?
LRHG	ECM and growth factor binding protein	Regulation of the local concentration of growth factors?

DARC, Duffy antigen receptor for chemokines; ECM, extracellular matrix; LRHG, leucine-rich HEV glycoprotein.

HEV:

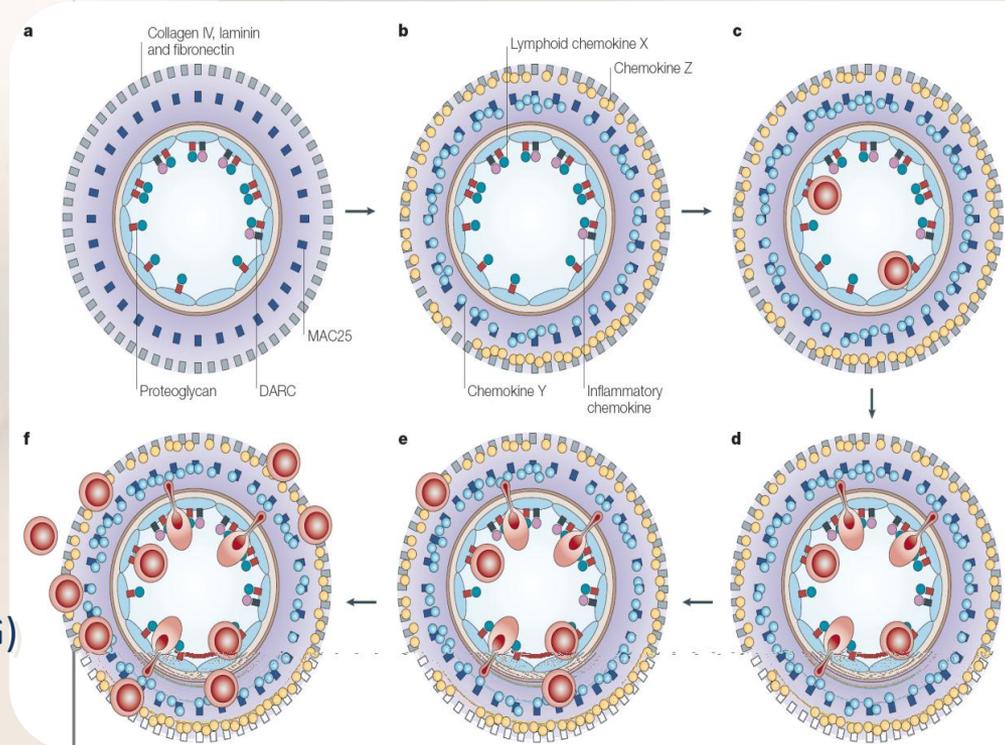
- Expresión de selectinas e integrinas no es suficiente (estas requieren de su activación por quimiocinas)
- Expresan constitutivamente quimiocinas
 - Ej. CCL9, CXCL12 y CXCL13 son transportadas por las HEV hacia la luz del vaso (es sectorizado (HEV foliculares y HEV interfolicular?))

	Normal venule	Peripheral lymph-node HEV	Peyer's-patch HEV
			
Endothelium	Flat	Tall and plump	Tall and plump
Basal lamina	Thin	Thick	Thick
Perivascular sheath	Scanty	Prominent	Prominent
CD31	+	+	+
ICAM2	+	+	+
ICAM1	-/+	++	++
VE-cadherin	+	+	+
Sialomucins			
Core protein	+	++	+
PNAD epitope	-	++	+
Sulphation	-	+	+
MADCAM1	-	-	+
Chemokines (CCL19, CCL21, CXCL12 and CXCL13)	-	+	+

CCL, CC-chemokine ligand; CXCL, CXC-chemokine ligand; VE, vascular endothelial.

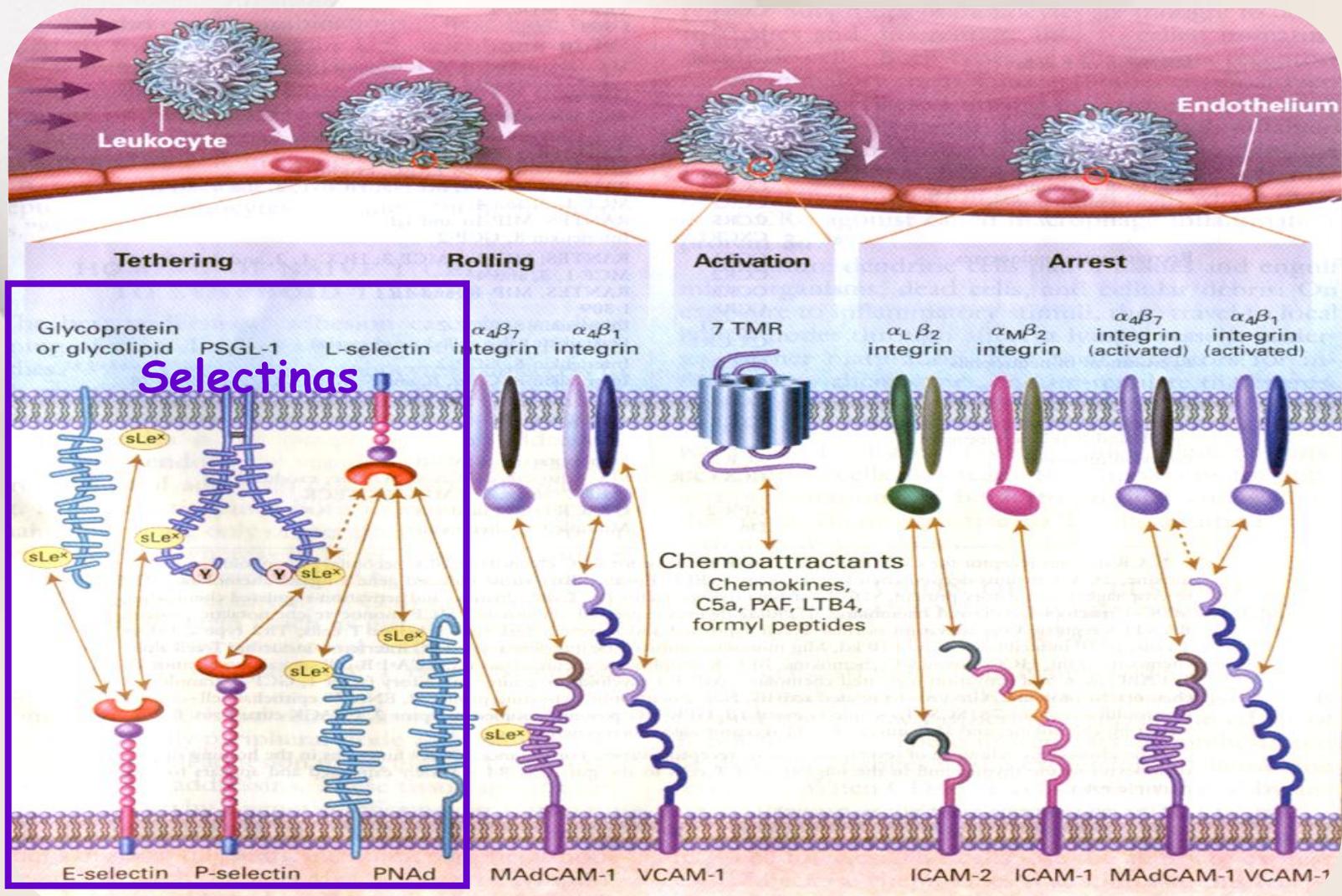
Recirculación y alojamiento de los leucocitos

- Mecanismos de acceso a quimiocinas desde la red de fibroblastos (FRC):
 - Transporte vesicular
 - Presión hidrostática
 - Transcitosis a través de HEV
- Como se mantienen las quimiocinas unidas a las HEV
 - Proteoglicanos
 - Co-receptores de TGF- β (CD105, glicoproteína HEV rica en leucina (LRHG))
 - DARC (receptor de antígeno Duffy para quimiocinas)
 - En la membrana basal MAC25, colágeno IV y laminina



DARC y CCR7 (CCL12), pueden mantener quimiocinas adosadas

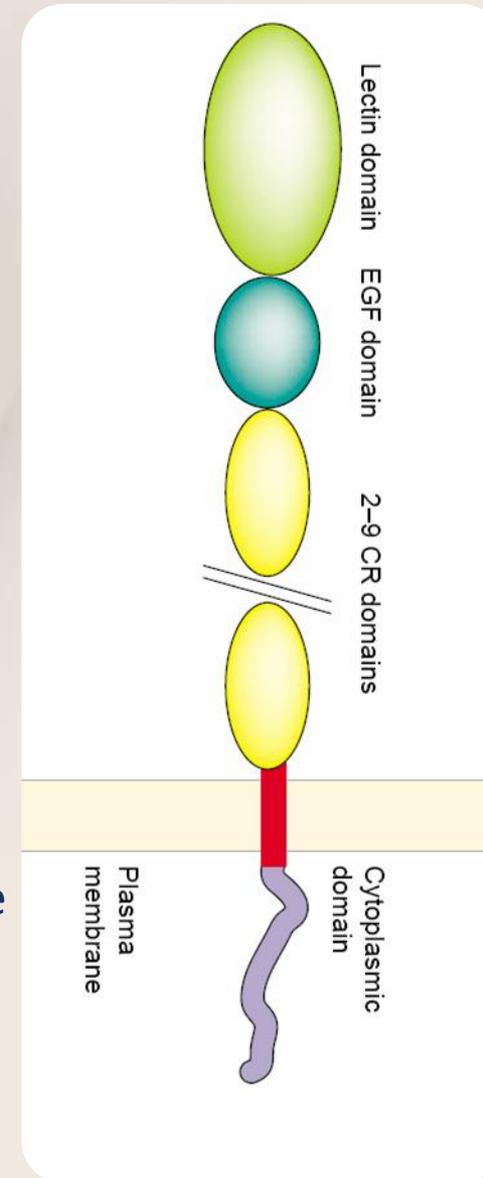
Recirculación de linfocitos



Moléculas de adhesión endotelial

Selectinas

- Dominios de unión a Lectinas o CDR
 - Expresadas exclusivamente en las células derivadas de la médula ósea y células endoteliales
 - Permite la adhesión de leucocitos y plaquetas a la superficie vascular
- Interacción reversible y bajo condiciones de flujo
 - Participan en el “rolling”
- Ligandos glicoconjugados específicos
 - Para la unión de selectina con su ligando se requiere de:
 - Sulfatación por sulfotransferasas (LSST) para activar la unión con su ligando



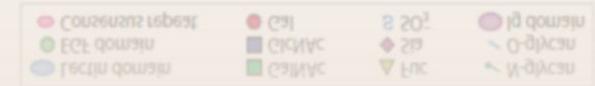
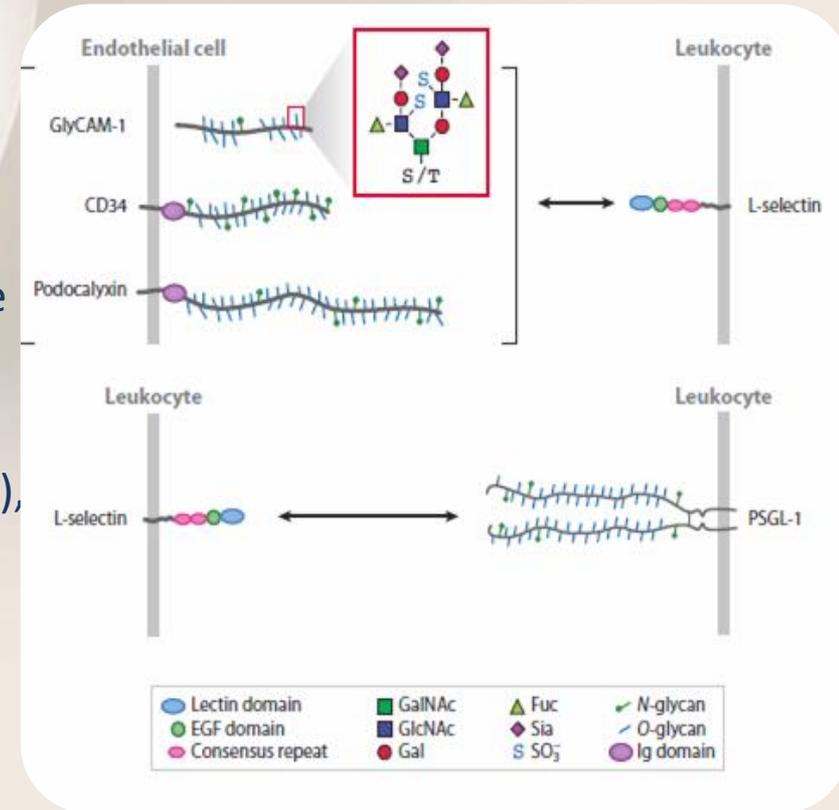
Moléculas de adhesión endotelial

Selectinas

- Tipos:

- Selectina-L (CD62-L):

- Células T “naive”, todas las células mieloides, Treg y algunas poblaciones de T de memoria
- No en células endoteliales
- Ligando: PSGL1 (ligando 1 de P-selectina), adhesinas endotelial de los nódulos linfáticos periféricos (PNADs) o mucinas (CD34 (HEV) , MadCAM-1 y podocalyxin
- Entrecruzamiento induce incremento de ARNm para IL-8, TNF- α y β 2 integrina

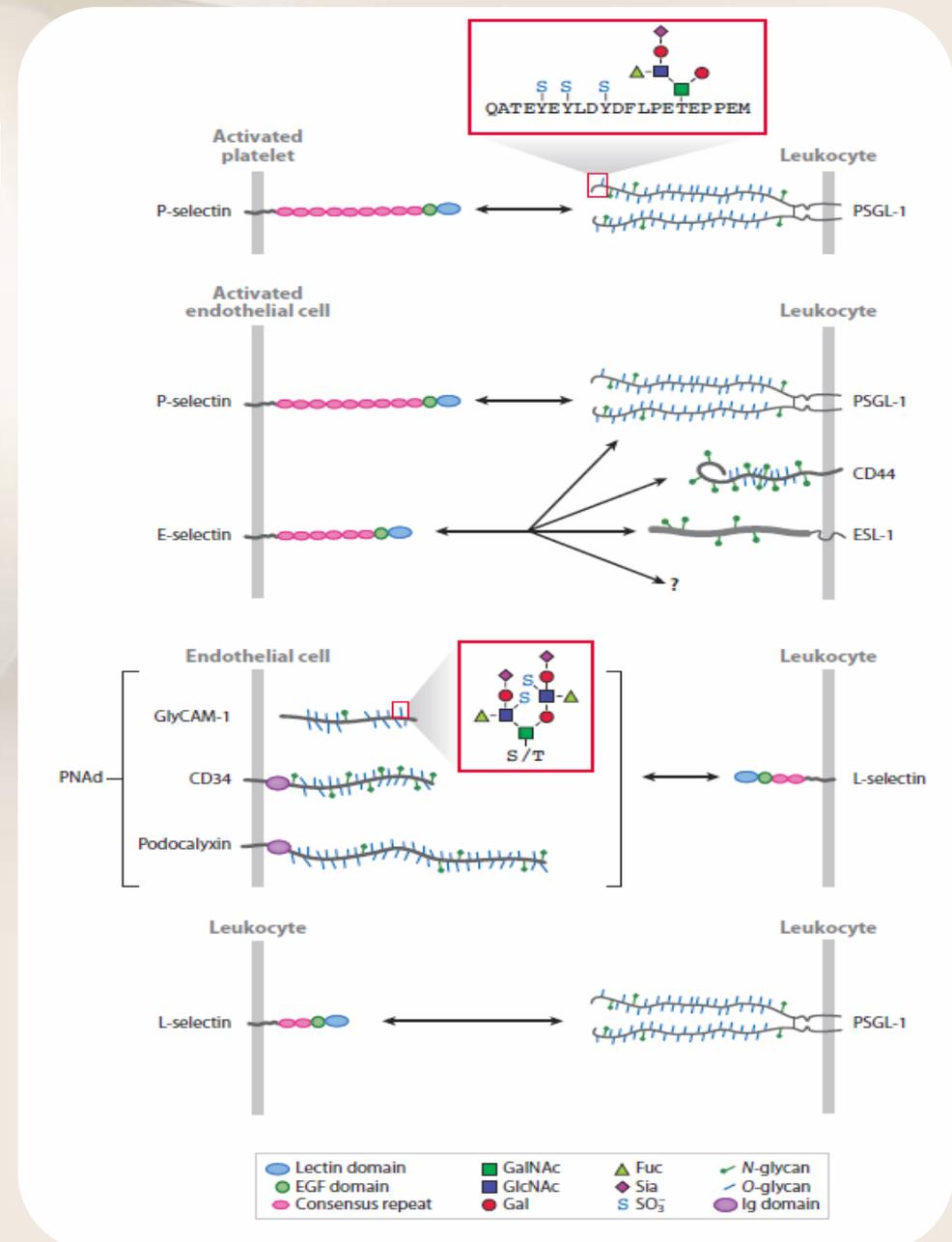


Moléculas de adhesión endotelial

Selectinas

Tipos:

- Selectina-E (CD62-E):
 - Endotelio activado y endotelio de la piel en reposo
 - Ligando Ag LewisX, Ag linfocitos cutáneos (CLA) (T-memoria/efectores), Ligando 1 de e-selectina (ESL-1)
 - Acumulo de células al sitio de la inflamación
- Selectina-P (CD62-P):
 - Gránulos en las plaquetas, endotelio pulmonar y plexos coroideos
 - Ligando Ag LewisX, PSGL (ligando glicoproteico de P-selectina)
 - Recluta PMN y Mo

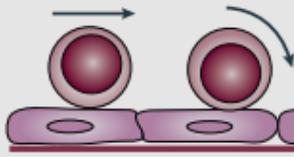
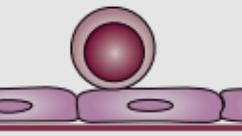
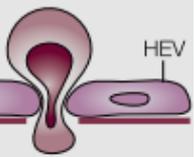


Recirculación y alojamiento

- Las quimiocinas y moléculas de adhesión son los responsables de la migración
- Durante el “rolling”, si no ocurre activación mediada por quimiocinas (receptores acoplados a proteína G), las integrinas ($\beta 2$) no se activan (conformación de alta afinidad) y no ocurre el arresto

“Rolling”: Permite evaluación de señales antes de comisionarse a la entrada a un tejido

Table 1 | **Multi-step adhesion cascades in lymph-node HEVs determine homing specificity**

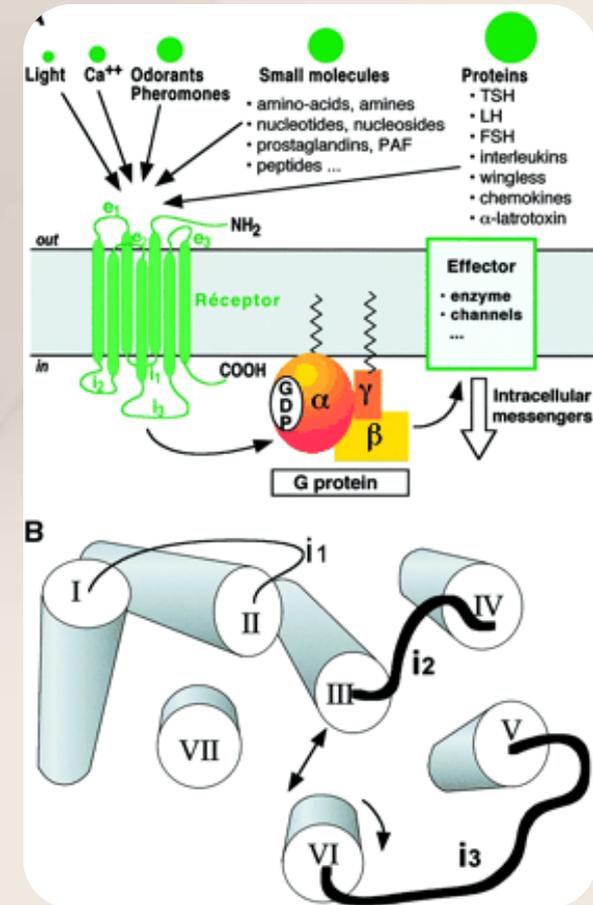
	Step 1 <i>Rolling</i>	Step 2 <i>Activation</i>	Step 3 <i>Adhesion</i>	Step 4 <i>Transmigration</i>
				
	L-selection: PNAD	B cells OCL21: CCR7 CXL12: CXCR4 T cells OCL21: CCR7 (CXC12: CXCR4)	LFA1: ICAM1	HEV
Naive B cells	Yes	Yes	Yes	Yes
Naive or central memory T cells	Yes	Yes	Yes	Yes
Monocytes/Neutrophils	Yes	No	No	No
Effector memory or effector T cells	No	No	No	No

En las células T naive y de memoria las integrinas son activadas por CCL21 (expresado por HEV), ligando de CCR7

Dinámica del proceso de recirculación y alojamiento

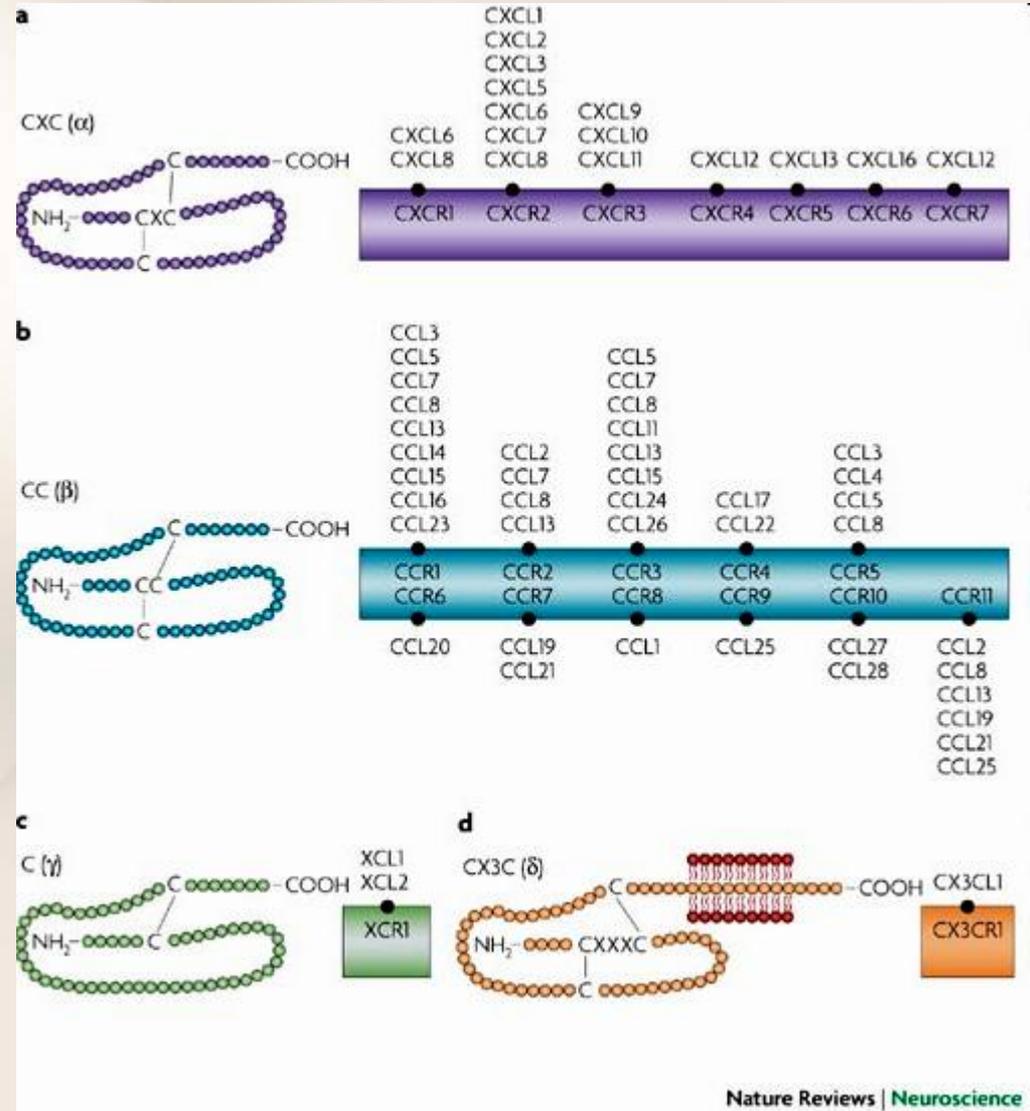
Fases de la migración:

- Fase de activación:
 - Mediada por moléculas producidas por el hospedador o microorganismos: fragmentos de fibrina, colágeno, C5a, fMLP, quimocinas, PAF, LTB4, PGD2
- Quimiocinas
 - Casi todos los receptores pertenecen a flia. que atraviesan 7 veces la membrana
 - Acoplados a proteína G



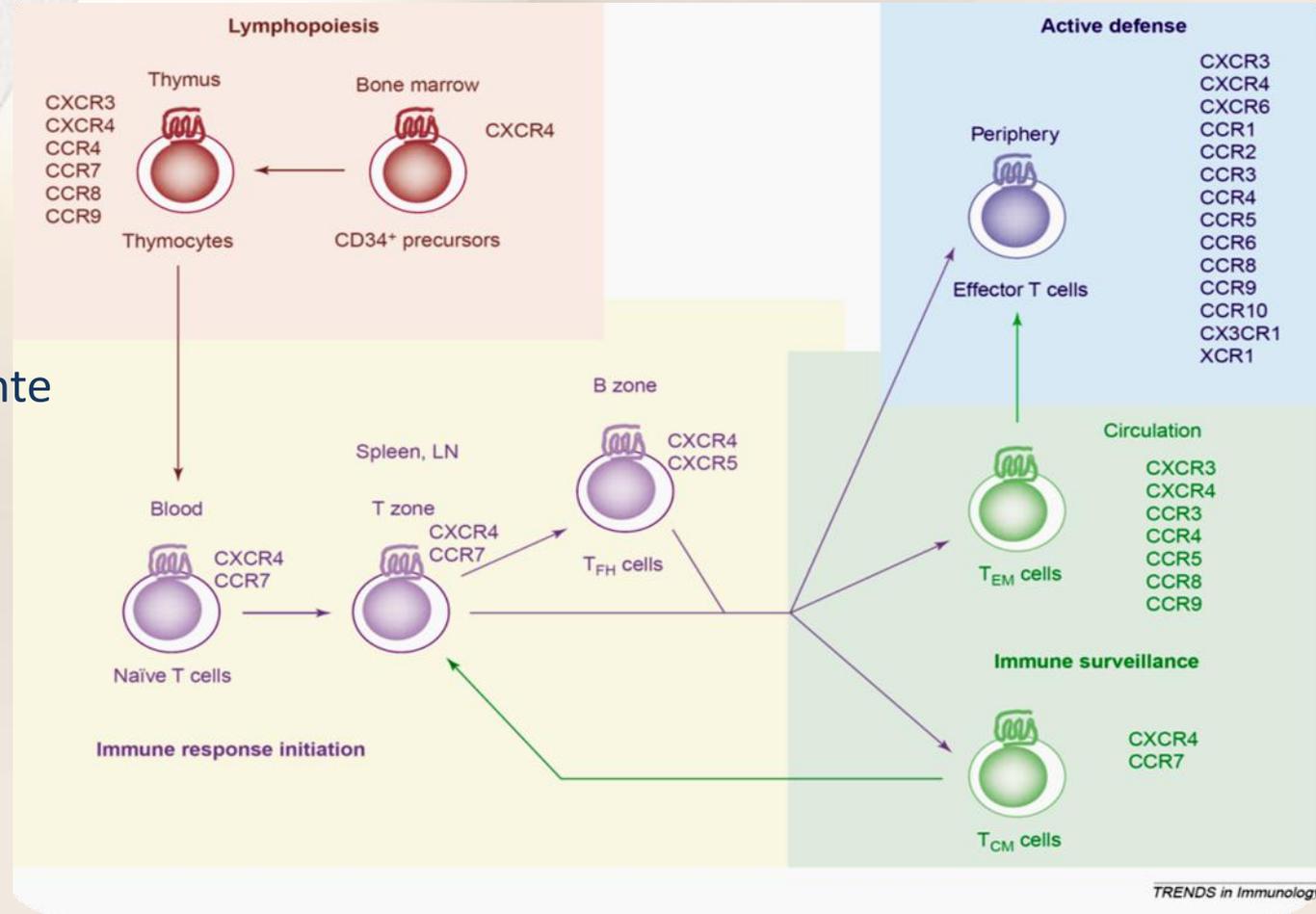
Quimiocinas

- Familia de proteínas de bajo peso molecular (8-14 KDa)
- Alto grado de homología
- Capacidad quimioatrayente y proinflamatoria
- Unión ligando-receptor
 - Alto grado de promiscuidad
 - Sin embargo, también hay parejas específicas de quimiocina-receptor
 - CXCL13-CXCR5



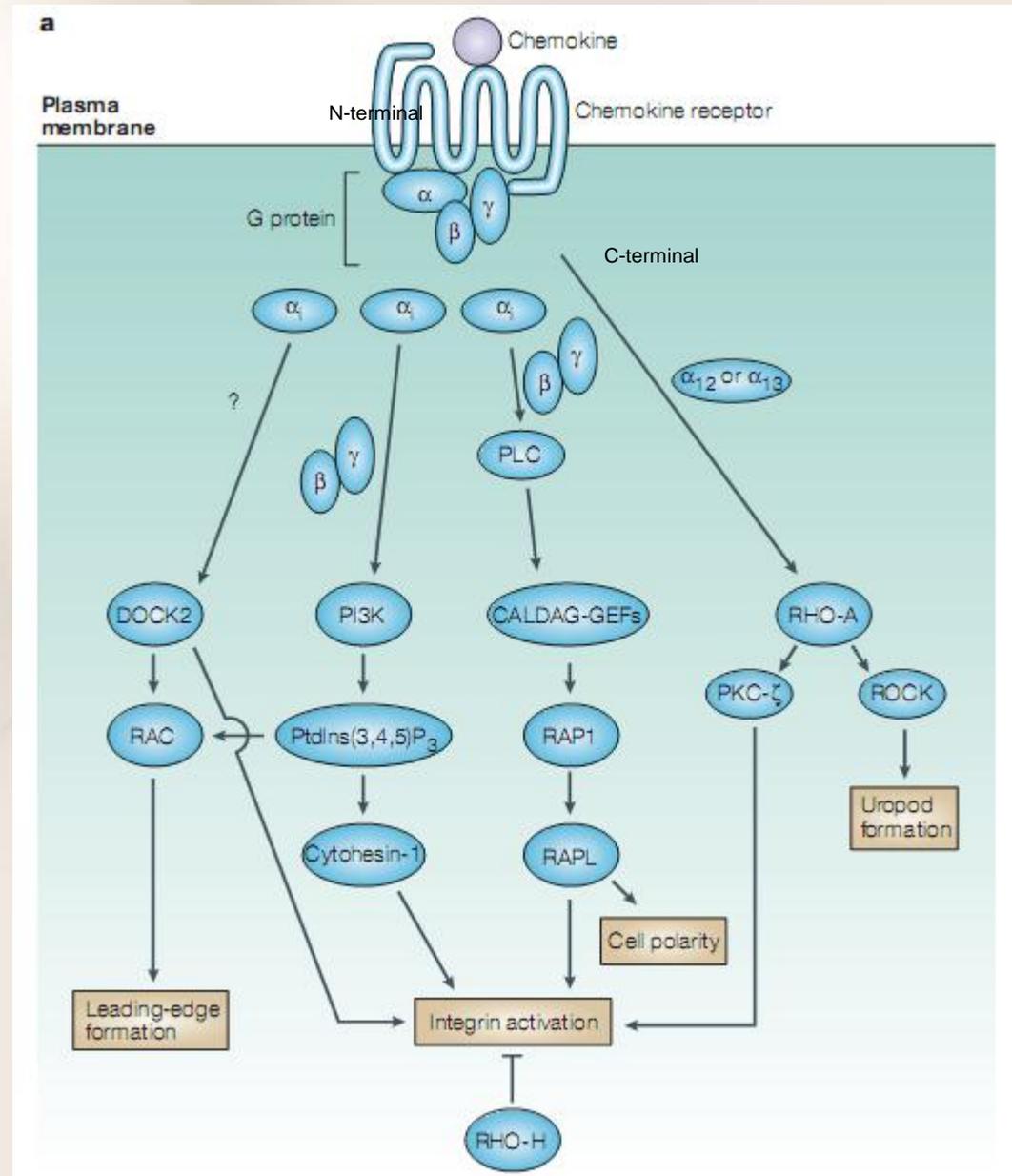
Quimiocinas

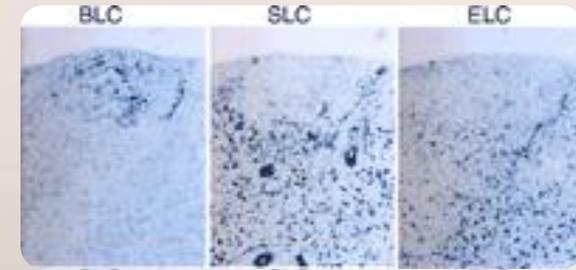
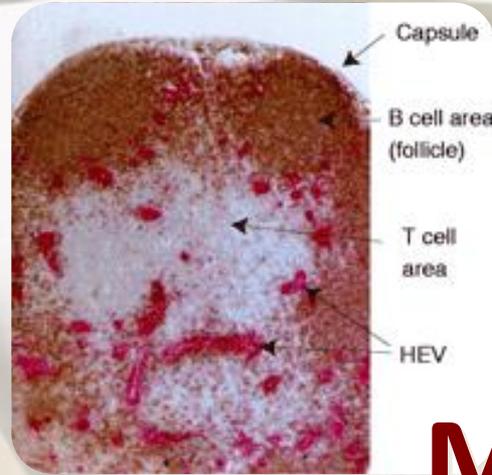
- Quimiocinas homeostáticas
 - Expresadas constitutivamente por subpoblaciones celulares
- Quimiocinas inflamatorias



Quimiocinas

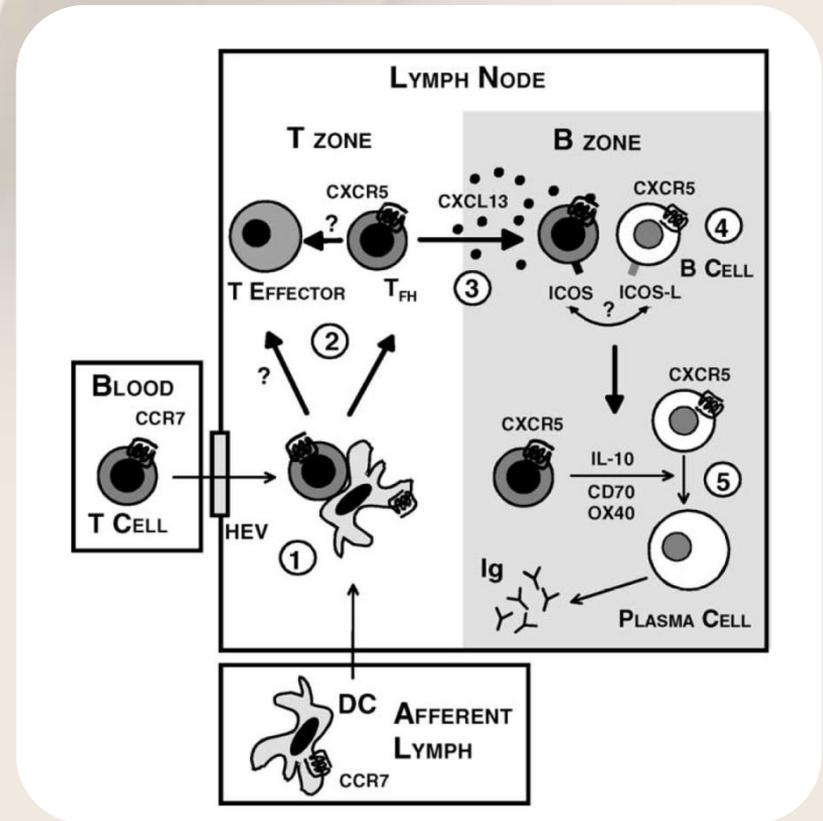
- Receptores
 - Pertenecen a la familia de receptores de 7 dominios transmembrana
 - Acoplados a proteínas G

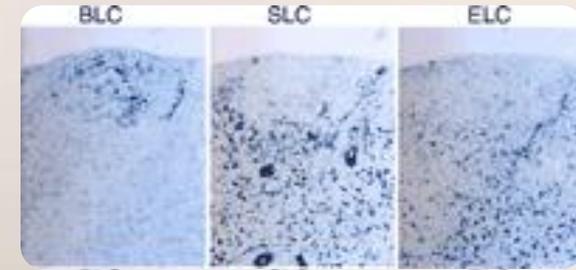
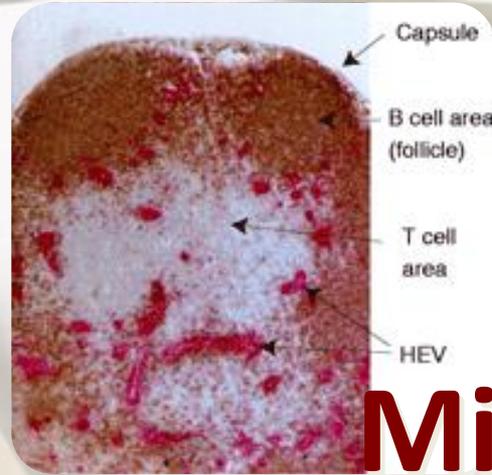




Migración celular: Quimiocinas

- CXCR5 es expresado por poblaciones de células T efectoras (T_{FH}) activadas y permite su interacción con linfocitos B
 - Expresado además en linfocitos B de PP y NL y es crítico para su migración a estos microambientes
- CCR9 y CCR10 reclutamiento a la mucosas (Linfocitos B productores de IgA y linfocitos T al intestino delgado)
- La regulación de la acción de las quimiocinas : proteasas (CD26), metaloproteasas, catepsin D, D6

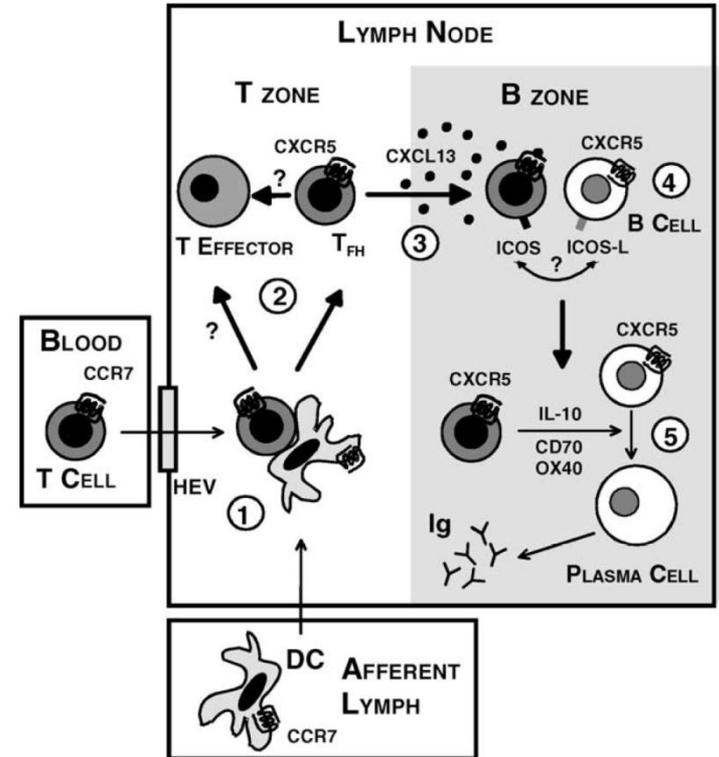




Migración celular: Quimiocinas

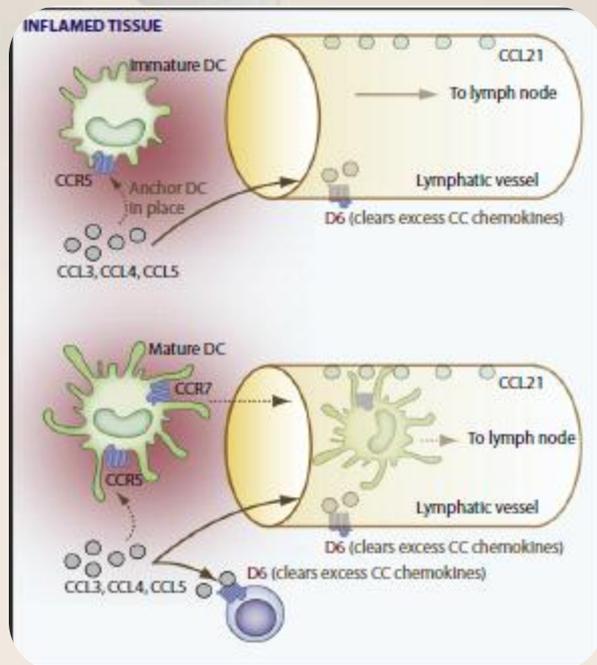
• CCR7

- Sus ligandos CCL21 y CCL19 activan a las integrinas en las células T naïve y células T de memoria central
- CCL21 y CCL19 son constitutivamente mantenido en la superficie de HEV, por proteoglicanos
- Crítico para la entrada de linfocitos T naïve a los NL
- CCL19 permite la atracción de T-APC en NL



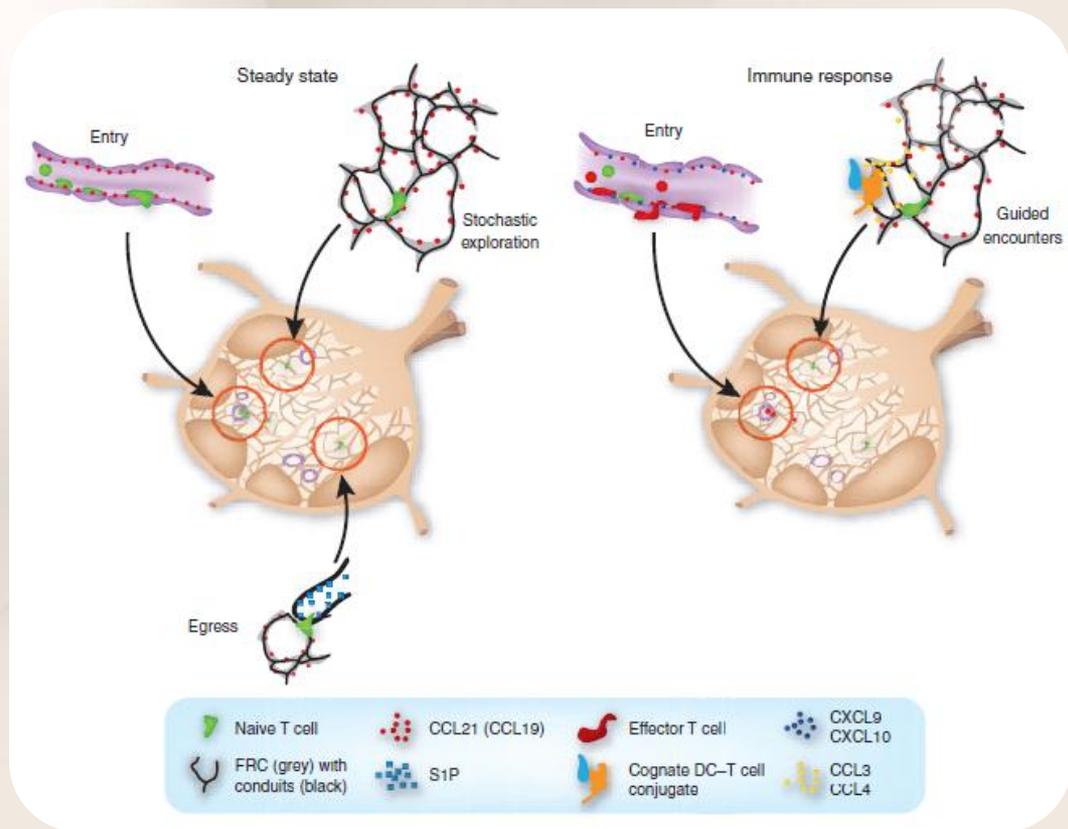
Migración celular: Quimiocinas

- Las quimiocinas coordinan la entrada a los nódulos linfáticos, mientras que agonistas de esfingosina (receptores de lípidos acoplados a proteína G), coordinan el egreso



LT, promueve la liberación de quimiocinas (CCR7 ligando) por FRC y VEH (no inflamación)

IFN- γ media CXCL3 durante inflamación



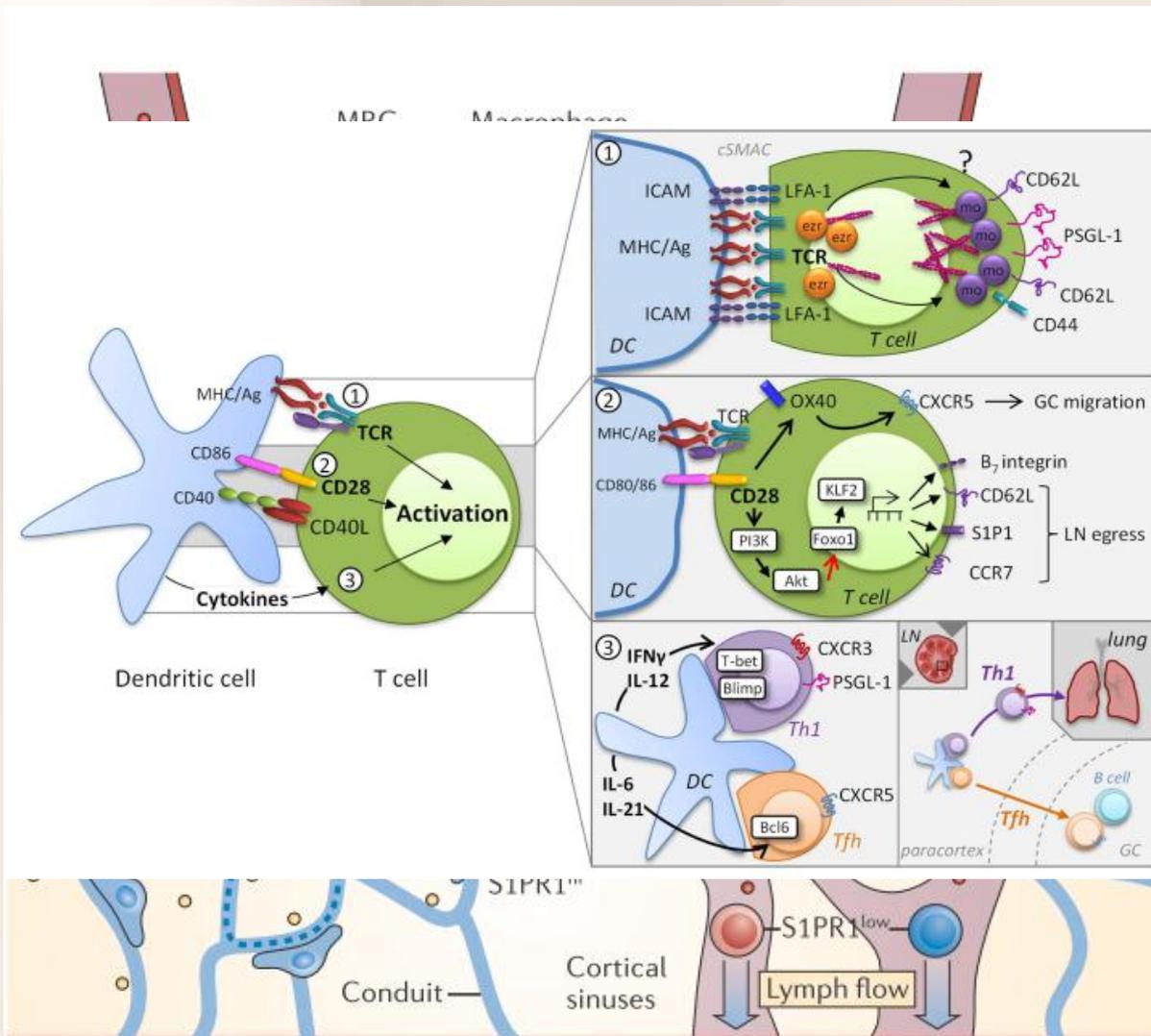
D6: scavenger de quimiocinas soluble, considerada receptor de quimiocina no funcional

Migración celular: Quimiocinas

- Dentro de los NL:

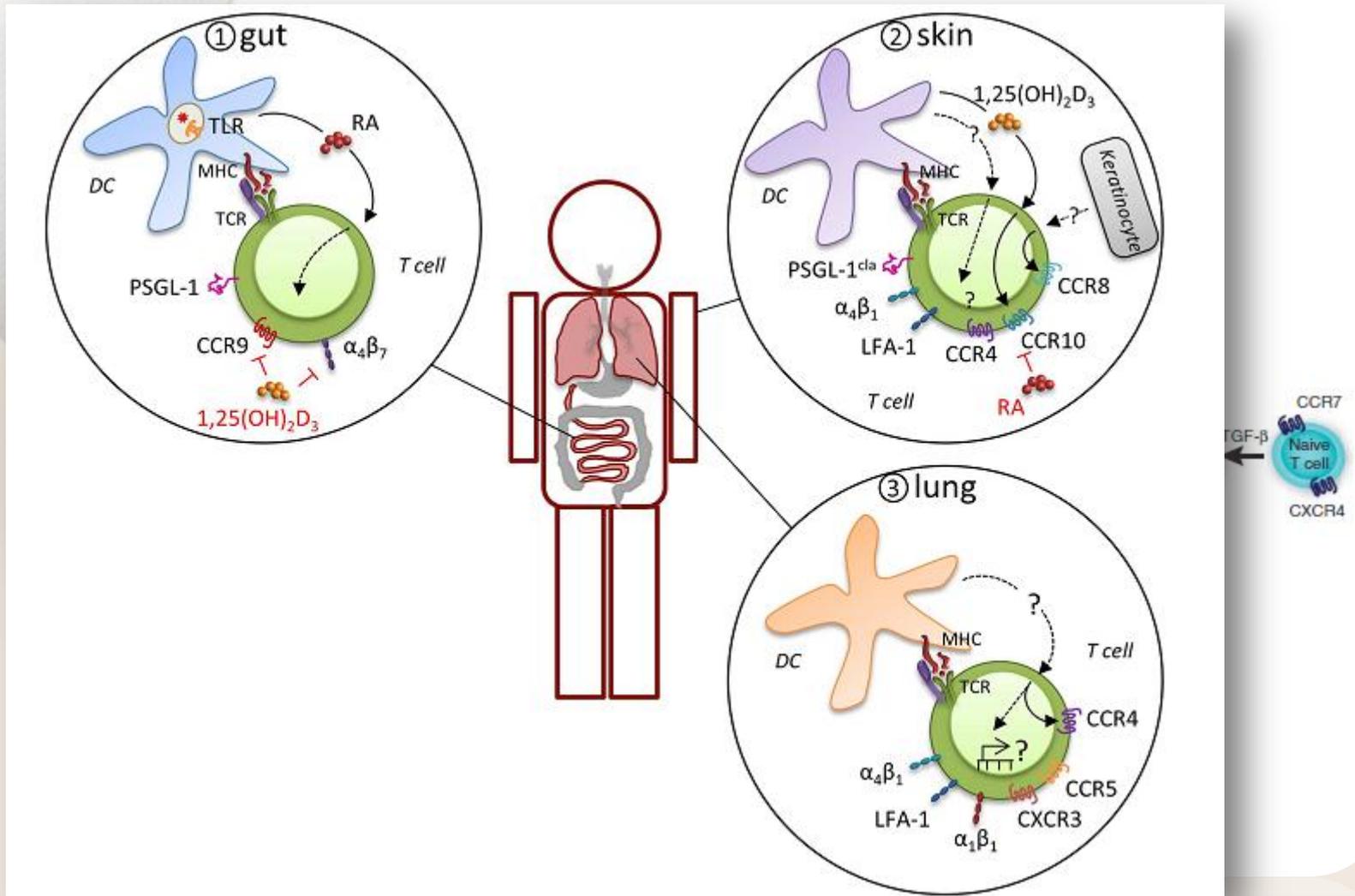
- Posicionamiento
- CCL19, CCL21 (FRC)
- CXCL13 (FDC)

Si los linfocitos no reconocen el antígeno en el ganglio linfático 'visitado', lo dejan a través del vaso linfático eferente utilizando el receptor de la esfingosina-1-fosfato (S1P)-S1P de tipo 1 (S1PR1);



Migración celular: Quimiocinas

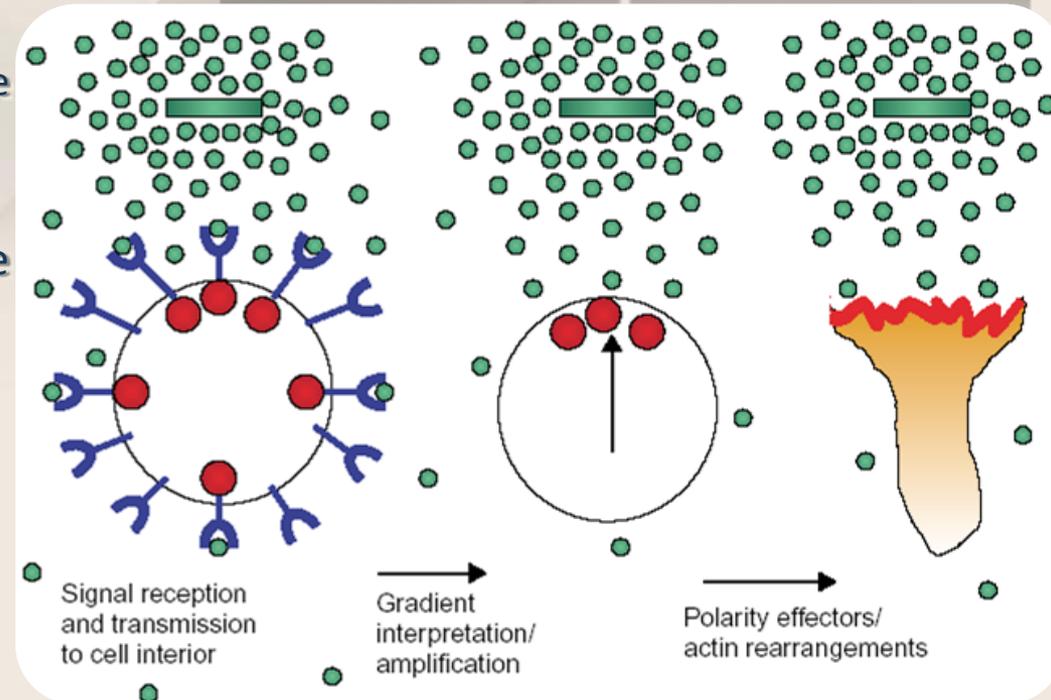
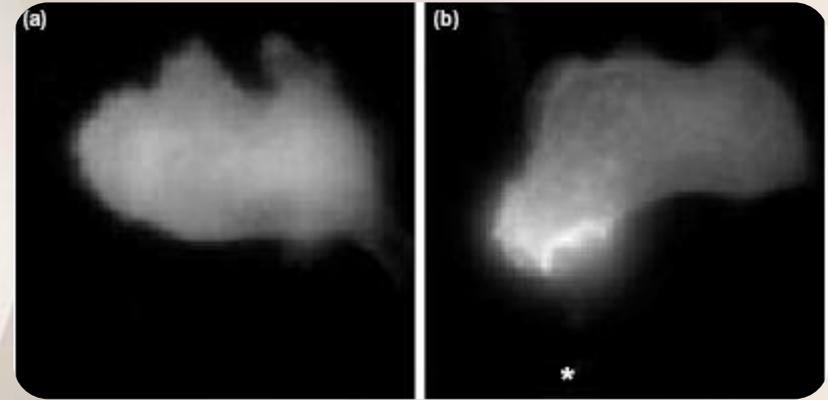
- Expresión dependiente de las poblaciones efectoras



Migración de leucocitos: Quimiocinas

Responsables del cambio de forma de la célula y arresto

- Polarización
 - Frente de migración
 - Polimerización de actina
 - Concentran receptores que intervienen en la adhesión firme
 - Uropodo
 - Retracción del citoesqueleto
- Uno de los efectos mas importante de las quimiocinas es la activación de integrinas



Moléculas de adhesión endotelial

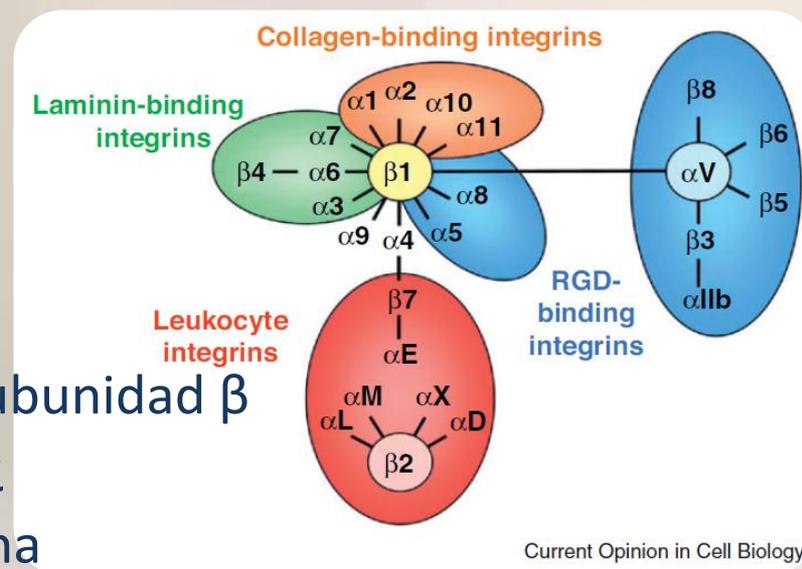
Integrinas

- Terminología usada desde 1987
- Grupo de receptores heterodiméricos cuya función específica es integrar la matriz extracelular con el citoesqueleto intracelular, para mediar funciones: **de adhesión, migración, crecimiento, sobrevivencia, diferenciación.**
- Median adhesión de las células a la matriz extracelular y organización de los tejidos y representan la interface entre el exterior e interior celular.

Moléculas de adhesión endotelial

Integrinas

- Más de 30 tipos de integrinas
- Todas poseen una estructura básica
 - Compuestos por 1 subunidad α y 1 subunidad β
- Descritos 8 tipos de cadena β y 19 α
 - $\beta 1$, αV y $\alpha 5$ receptores de fibronectina
 - $\alpha 1-7$ unión laminina
 - $\alpha 1-3$ unión al colágeno
 - $\alpha 9\beta 1$ unión Tenascin C
- Más importantes en RI:
 - $\alpha L\beta 2$: unión a ICAM1 e ICAM2: tráfico de linfocitos y formación de la sinapsis
 - $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$: VCAM y MadCAM: migración a mucosas y tejido inflamado



Current Opinion in Cell Biology

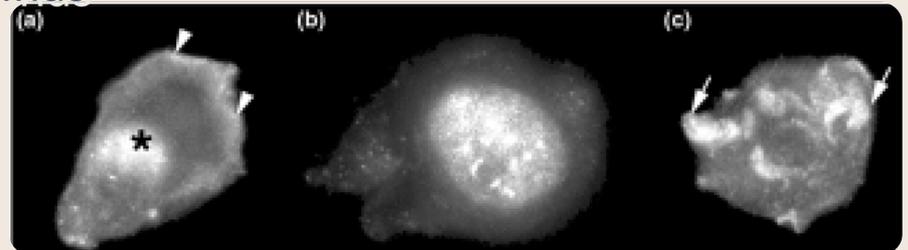
Current Opinion in Cell Biology

Moléculas de adhesión endotelial

Integrinas

- Funciones:
 - Durante la recirculación estabilizan las uniones con las células endoteliales y favorecen la transmigración
 - Mediar la sinapsis inmunológica
 - Durante el alojamiento interactúan con la matriz extracelular
 - Reclutan receptores factores de crecimiento (GFR)
 - GFR recluta kinasa de adhesión focal y actúa sinérgicamente con integrinas

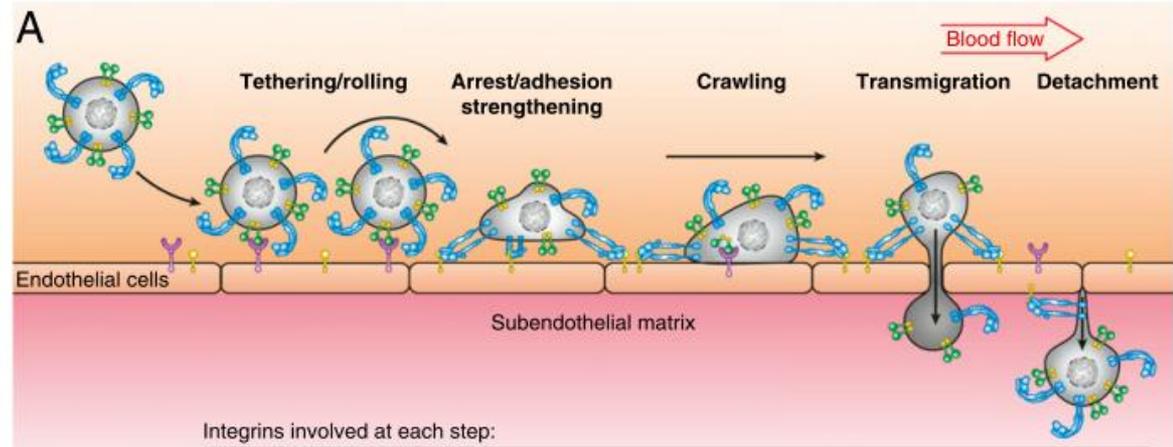
Mutantes de FAK, afecta formación de lamelopodia y la dirección de la migración



Distribución de FAK

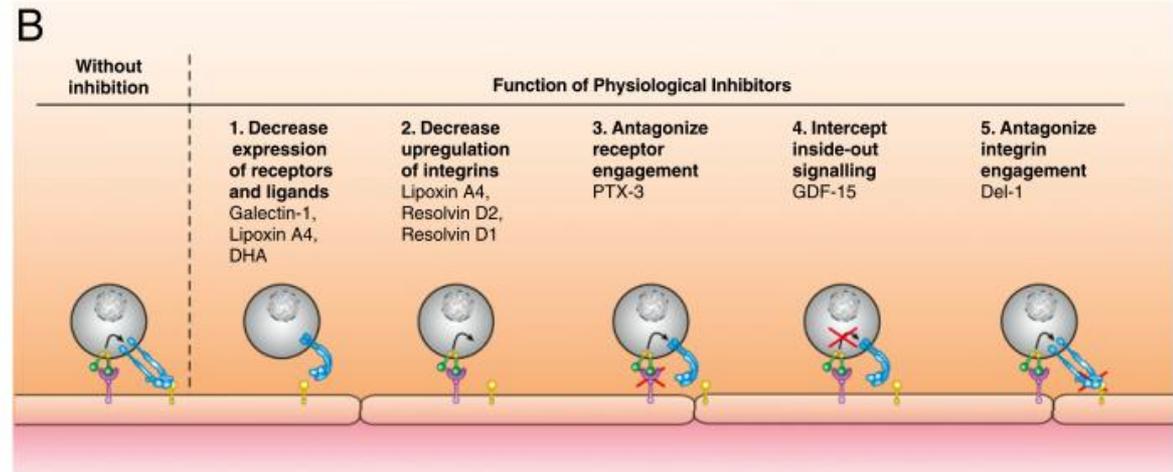
Moléculas de adhesión endotelial

Integrinas



Integrins involved at each step:

Neutrophils:	LFA-1	LFA-1	Mac-1	LFA-1	LFA-1
					VLA-3
Monocytes:	VLA-4	VLA-4	LFA-1	LFA-1	LFA-1
		β_2	Mac-1		VLA-3
T-cells:	VLA-4	VLA-4	LFA-1	LFA-1	LFA-1
		LFA-1			VLA-3



Leukocyte



Selectin counter-receptor



Integrin counter-receptor



Selectin



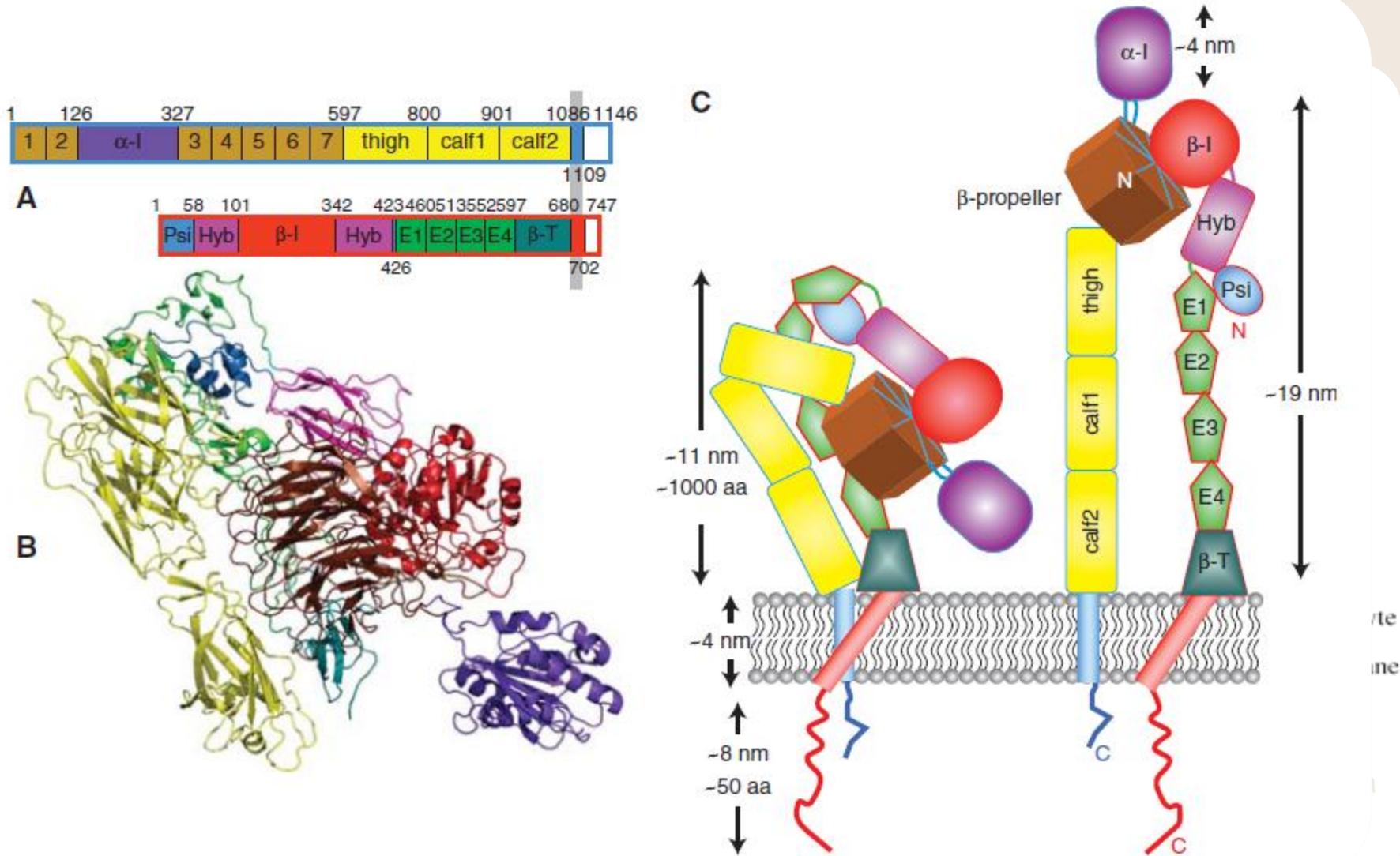
Integrin



Inhibition

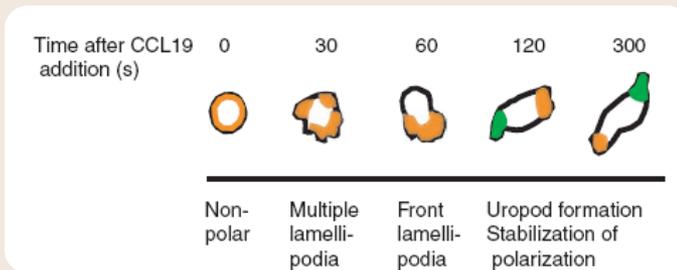
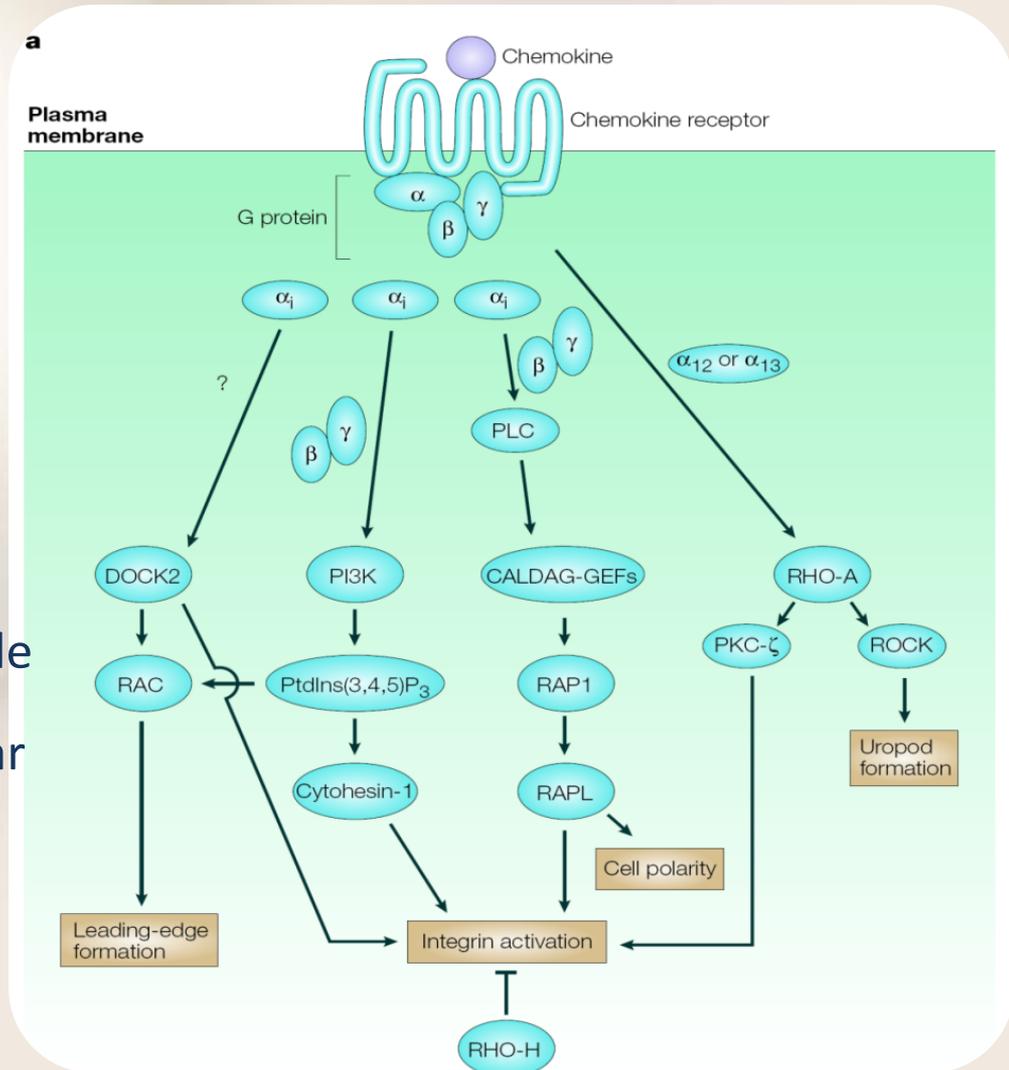


Moléculas de adhesión celular:



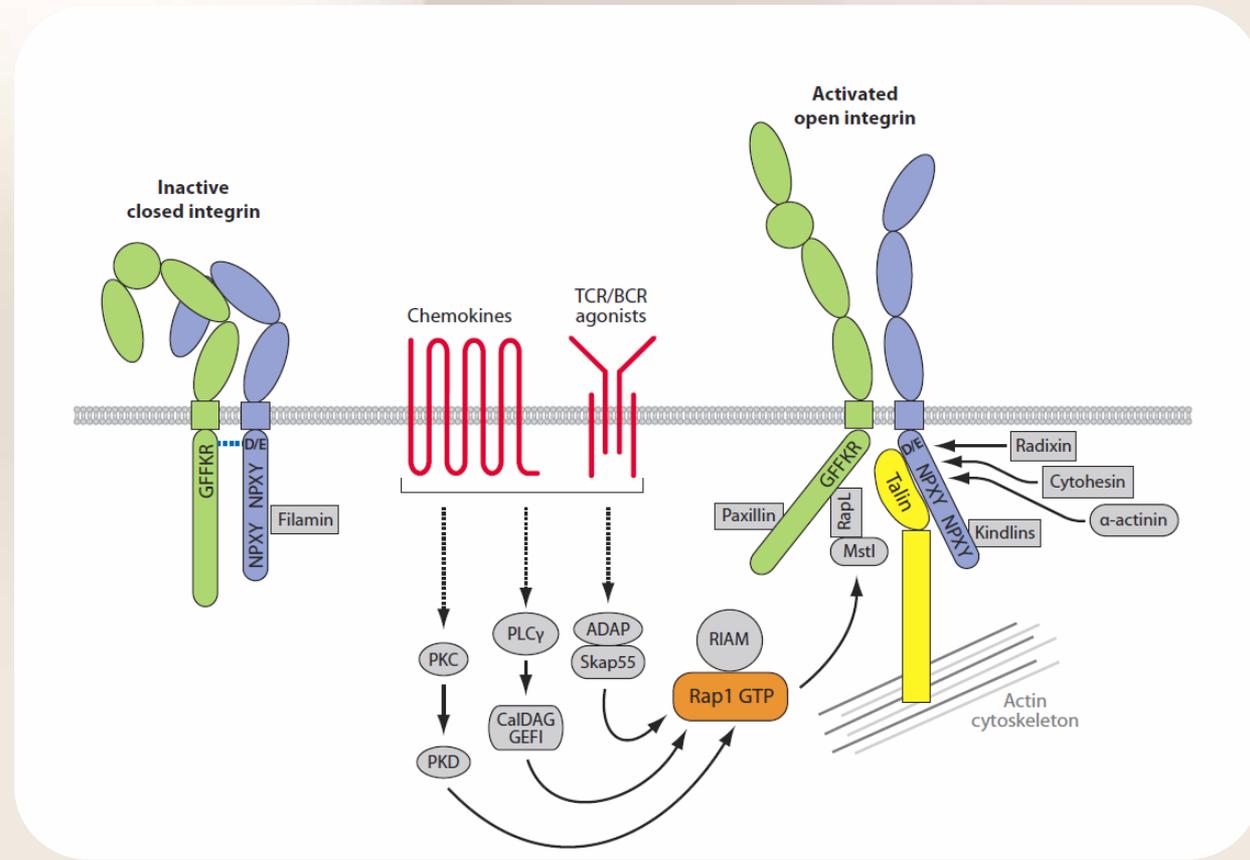
Migración de leucocitos: Señales activadas por las quimiocinas

- Activación de las Integrinas
- Polaridad celular
- Formación del frente de migración (lamelopodia/filopodia)
 - Relocalización y polarización de integrinas en el frente de migración (transporte vesicular mediado por RAP1 y RAPL)
- Formación del urópodo



Moléculas de adhesión celular: Activación de Integrinas

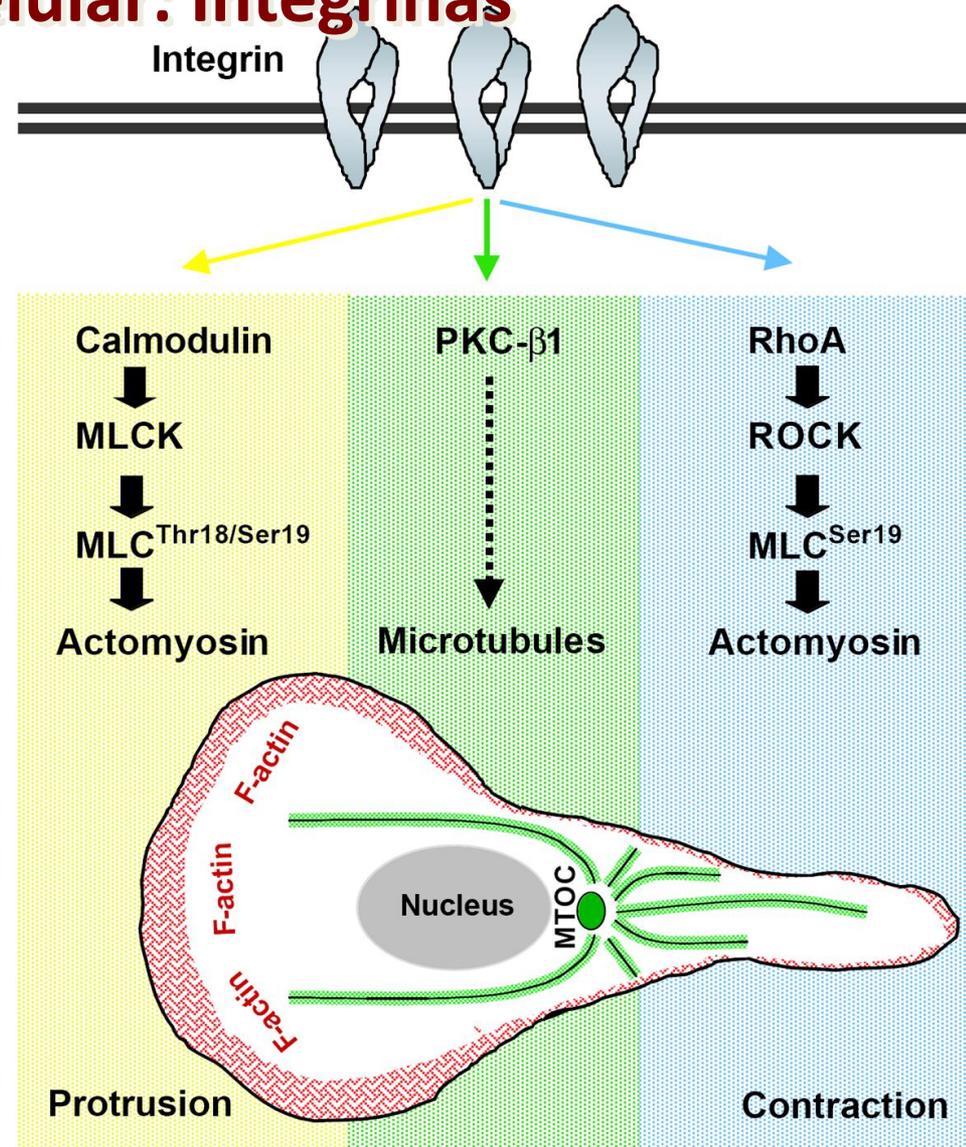
- La combinación de proteínas asociadas a las integrinas incrementa la afinidad
 - Rap1-RapL incrementan la movilidad lateral
 - Talin y kindlin favorecen la asociación con el citoesqueleto



Liberación de Jab-1 y activación de señal outside-in a nivel génico

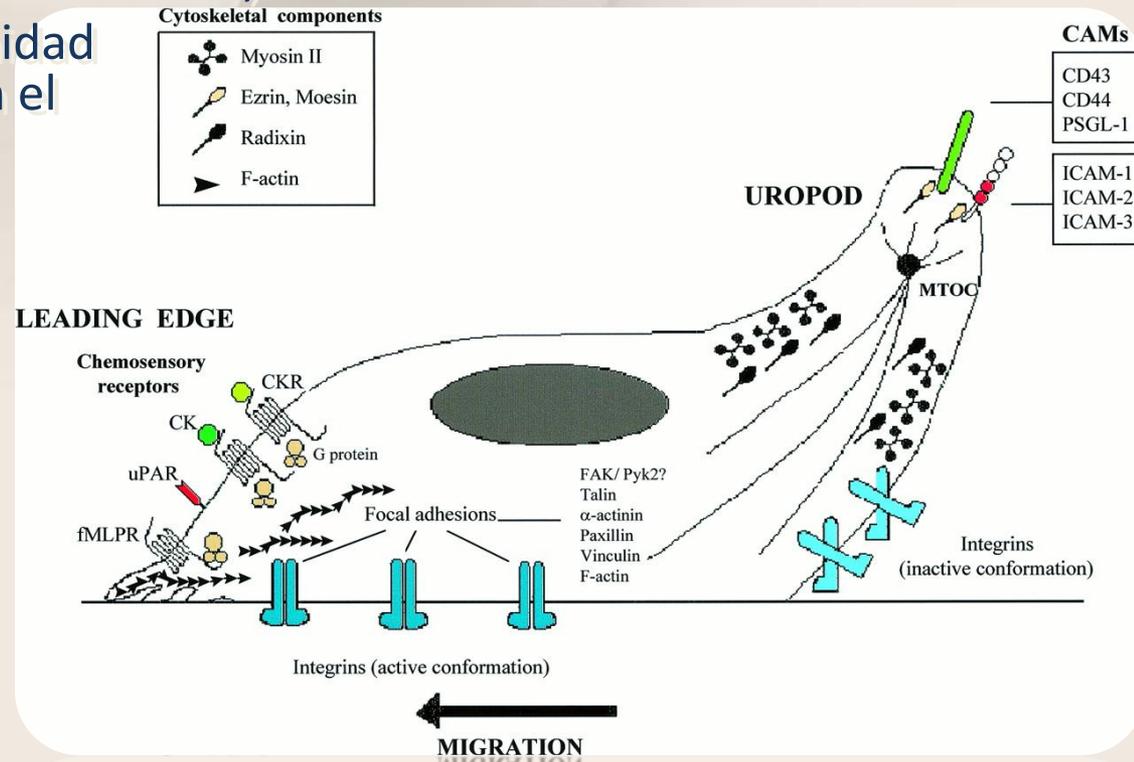
Moléculas de adhesión celular: Integrinas

- Señales outside-in (media señales de supervivencia, proliferación y crecimiento)
 - Mediada por Rac, CDC42 y Kinasa de la cadena liviana de miosina (MLCK)
 - Regula lamelopodia y filopodia
 - Polimerización de actina
- Mediada por Rho y la kinasa de Rho (ROCK)
 - Regula la contracción
 - Separación de las uniones en el urópodo
- Contractilidad y transmisión de tensión



Migración de leucocitos: POLARIDAD CELULAR

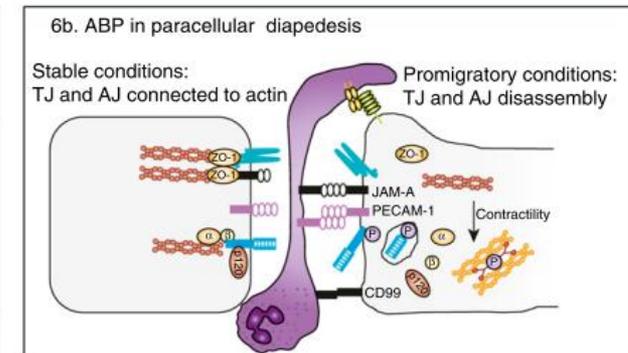
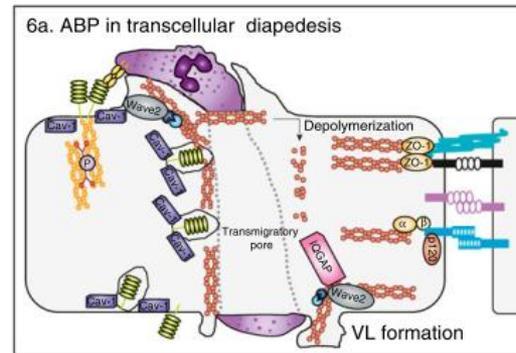
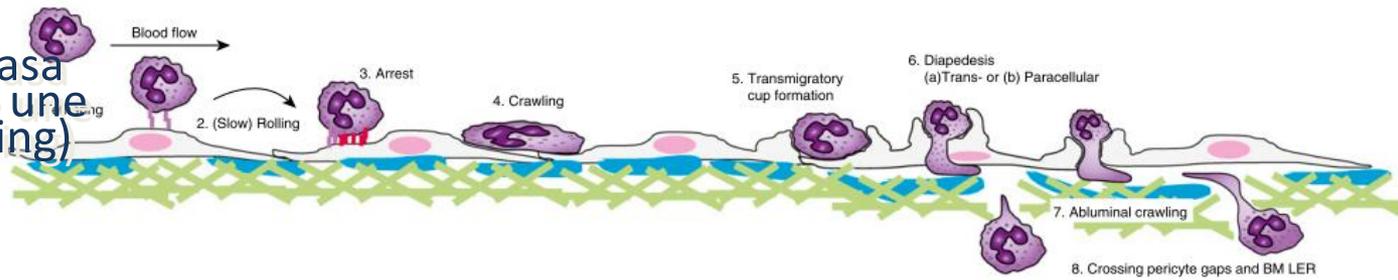
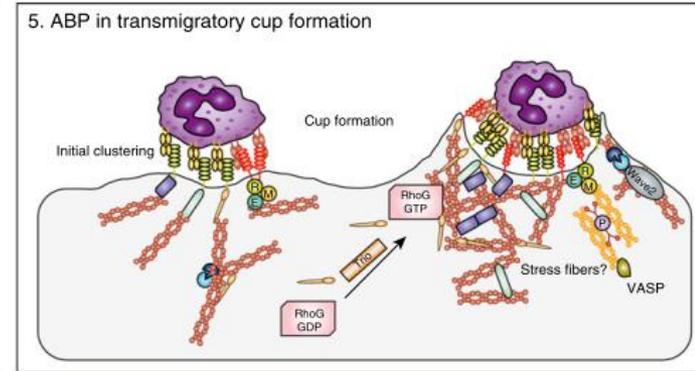
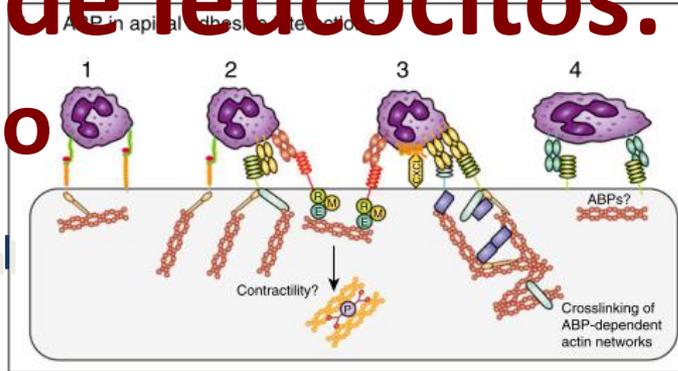
- Regulación del citoesqueleto celular
 - Microfilamentos (actina) controla plasticidad de la membrana y motilidad
 - Adhesión firme: enriquecimiento de ICAM-1 en el sitio de contacto
- Reorganización de la membrana y relocalización de receptores
- Quimiocinas adheridas al endotelio,
 - Incrementan la avidéz/afinidad de las integrinas, resulta en el arresto de linfocitos



Migración de leucocitos: Citoesqueleto

Proteínas que se unen al citoesqueleto de actina (ABPs) presentes en las células endoteliales:

- α -actinin, filamin, vinculin, paxillin, kinasa de adhesión focal se une a E-selectina (tethering)
- Cortactin controla rolling, adhesión y trans migración
- Cortactin, filamin B, α -actinin, y ERM unen a ligandos de ICAM-1 and VCAM-1 (Rolling y adhesión firme)
- Cortactin, filamin B, α -actinin, y ERM: clustering de ICAM-1/VCAM-1 (trans migración)



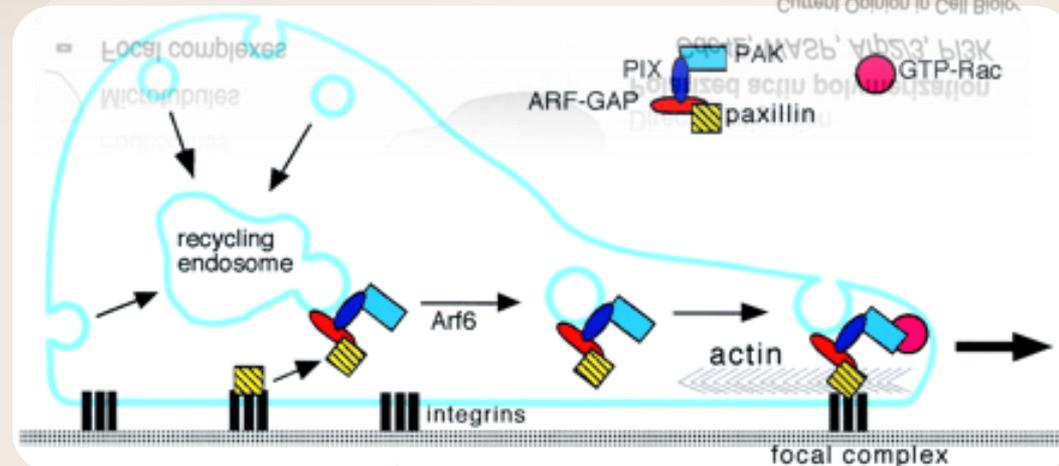
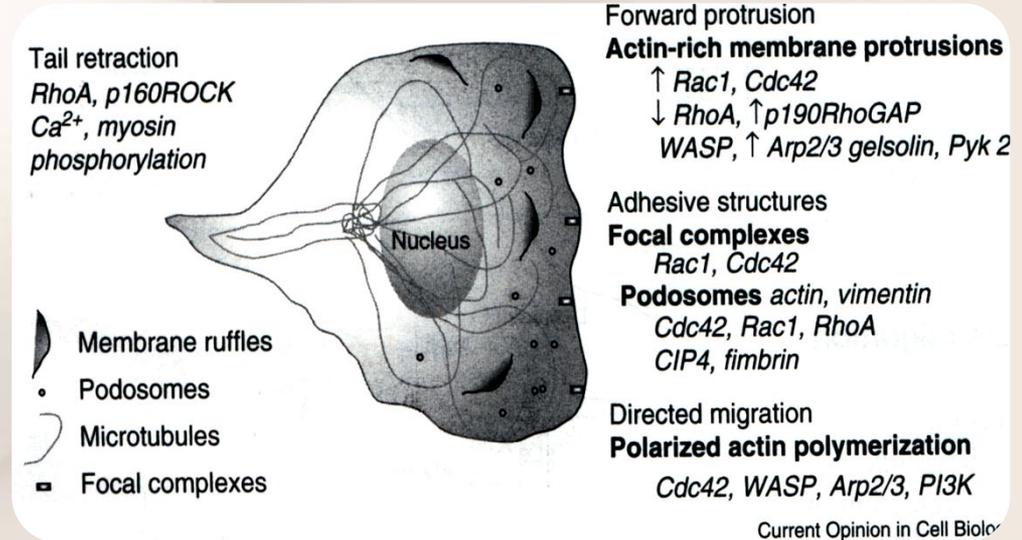
Key:

- Pericyte
- Endothelial cell
- Neutrophil/Leukocyte
- Basement membrane
- F-Actin
- Claudins/TJ
- PSGL-1
- VE-Cadherin/AJ
- E- and P- selectins
- ICAM-1
- VLA-4
- VCAM-1
- LFA-1
- Mac1
- GPCR
- Cortactin
- Arp2/3
- ICAM-2
- Stress fibers
- Myosin2
- α -actinin
- Filamin-B

Dinámica del proceso de recirculación y alojamiento

Dirección del movimiento

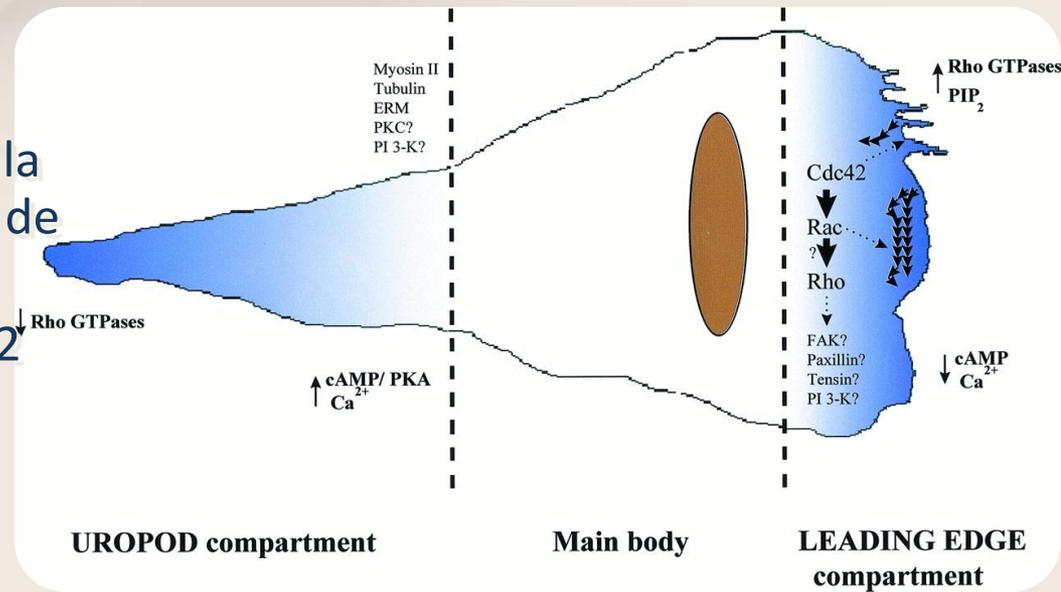
- Quimiocinas, inmovilizadas en la superficie de las células endoteliales
- Formación de la cola de retracción
 - Reciclaje de integrinas
 - Permite la transmigración
 - Requiere protrusión al frente y retracción posterior
 - Reciclaje de membrana en vesículas



Migración de leucocitos: Señalización Intracelular

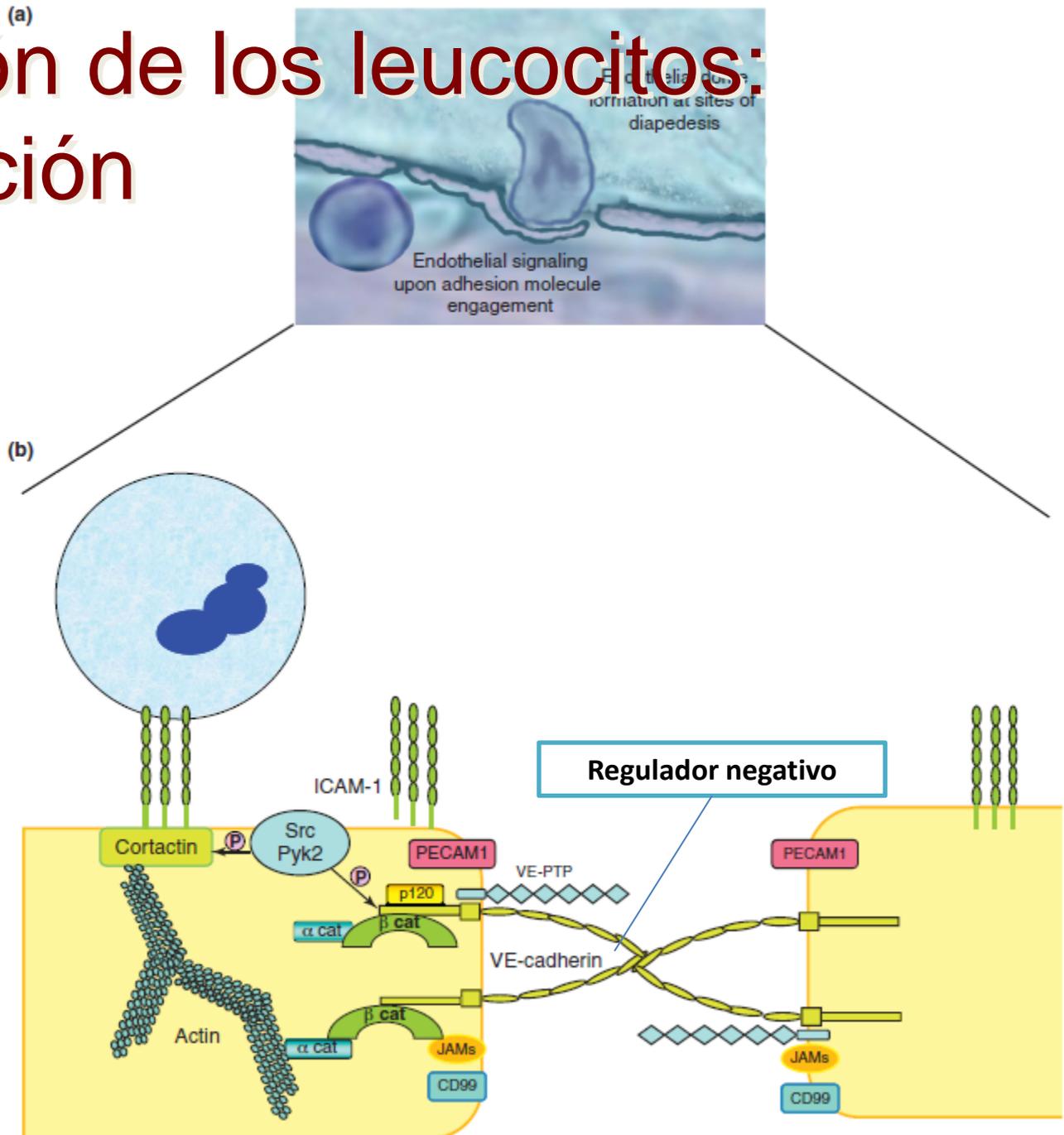
- Calcio:
 - Reabastece de MAC al frente de migración, por transporte de vesículas
- PI-3K:
 - Polarización mediada por quimiocinas
 - Activa Rac
- PTK:
 - Formación y estabilización de la unión y se ubican en el frente de migración.
 - FAK, paxilin, tenascin, Pyk2
- PKA
 - Requerida en la formación de uropodo

- Familia de GTPasa:
 - Regulan la polimerización de actina
 - Organiza las protrusiones y la adhesión focal
 - Filopodia y Lamelopodia (rac media el paso a través de las células endoteliales)
 - Rac, CDC42 (controla la dirección de la migración)
 - Rho-H favorece la separación de la cola



Recirculación de los leucocitos: Transmigración

- Vencer la adhesión entre las células endoteliales
- Caderinas, establecen interacciones homofilicas y mantienen la unión endotelial
- PECAM-1 media la migración transendotelial (interacción homofílica)
- Las integrinas son el ligando de JAM (junctional adhesion molecule 1)

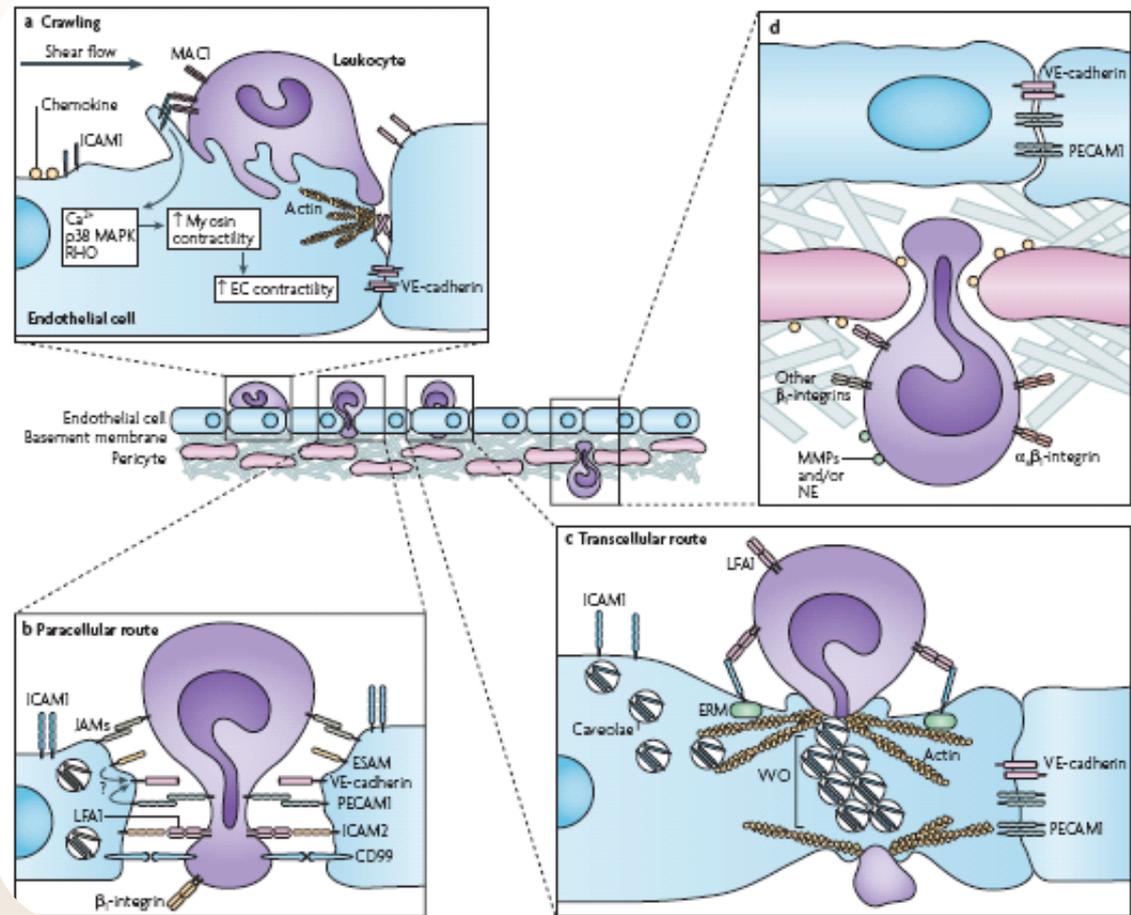


Recirculación de los leucocitos

- JAM-A (junctional adhesion molecule 1):
 - Participan en múltiples procesos fisiológicos, como la migración, proliferación, polaridad celular, permeabilidad paracelular
 - Tallo intracelular contiene dominio PDZ (dominio involucrado en la polaridad celular)

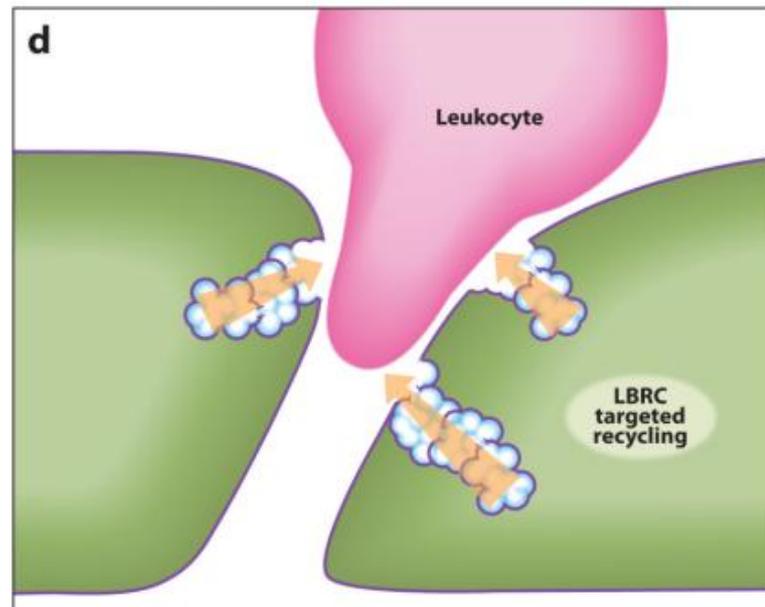
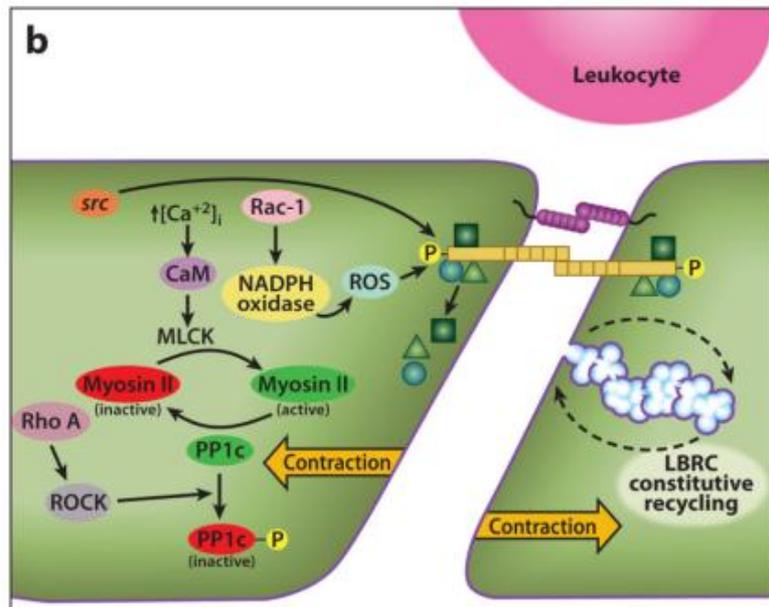
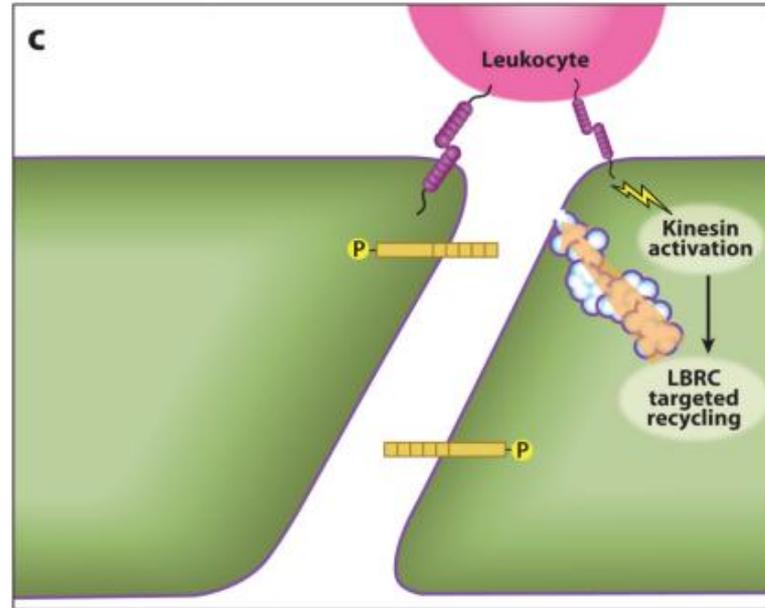
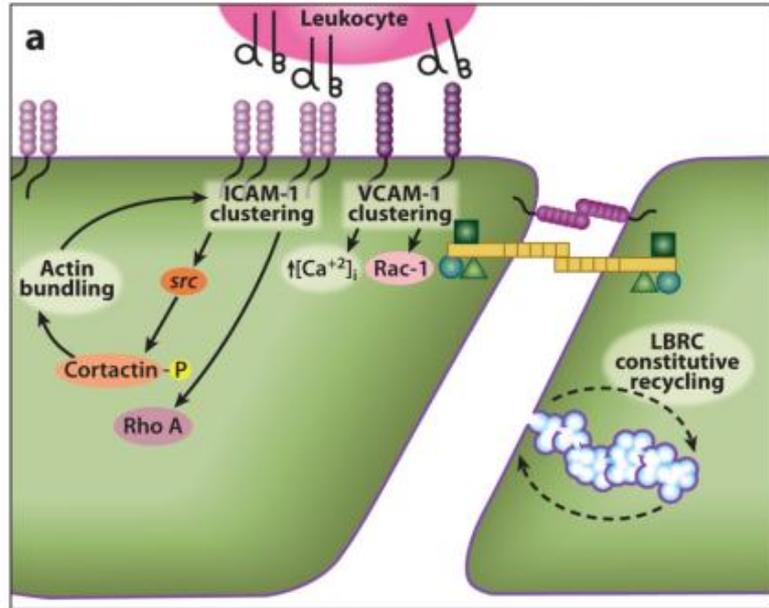
Recirculación de los leucocitos

- En monocitos y PMN, participa CX3CR1
- Depende de la interacción con las JAM
- Barreras de la migración:
 - Células endoteliales
 - Paracelular
 - Transcelular
 - Vesicular-vacuolar organellas (VVO s)
 - Células endoteliales de la membrana basal



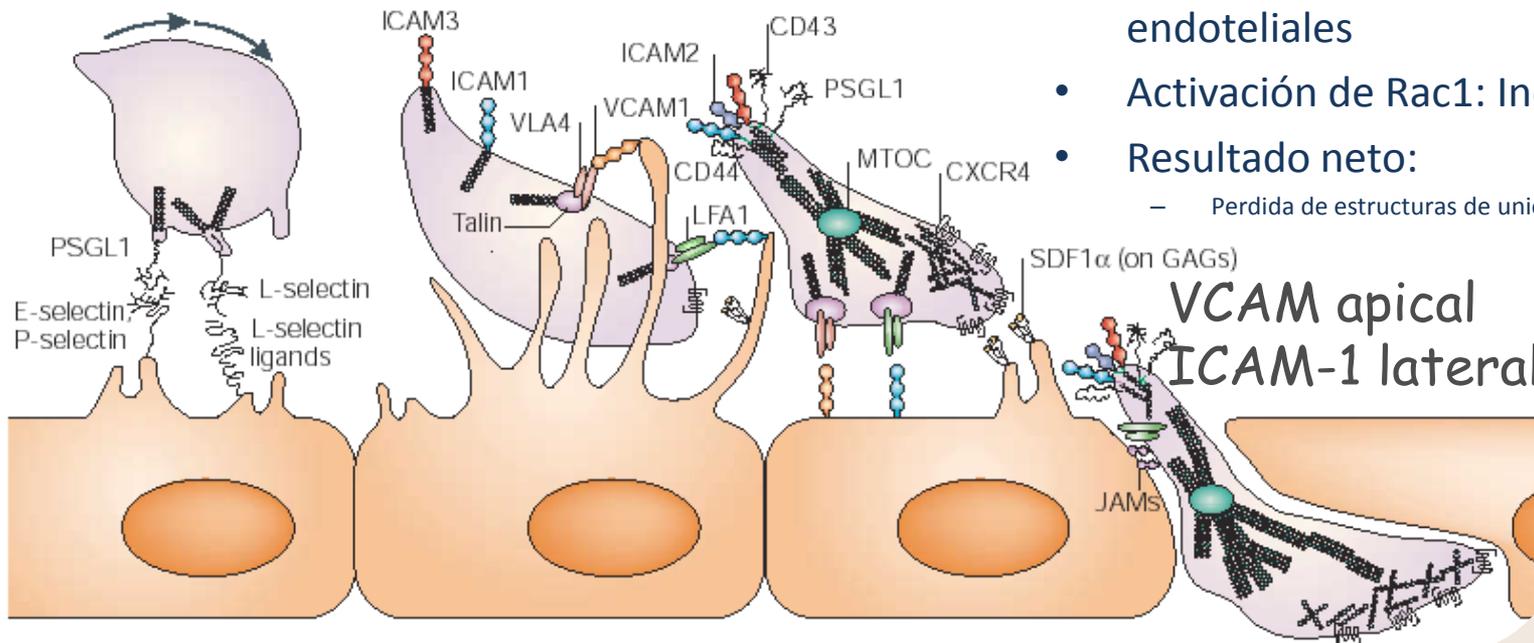
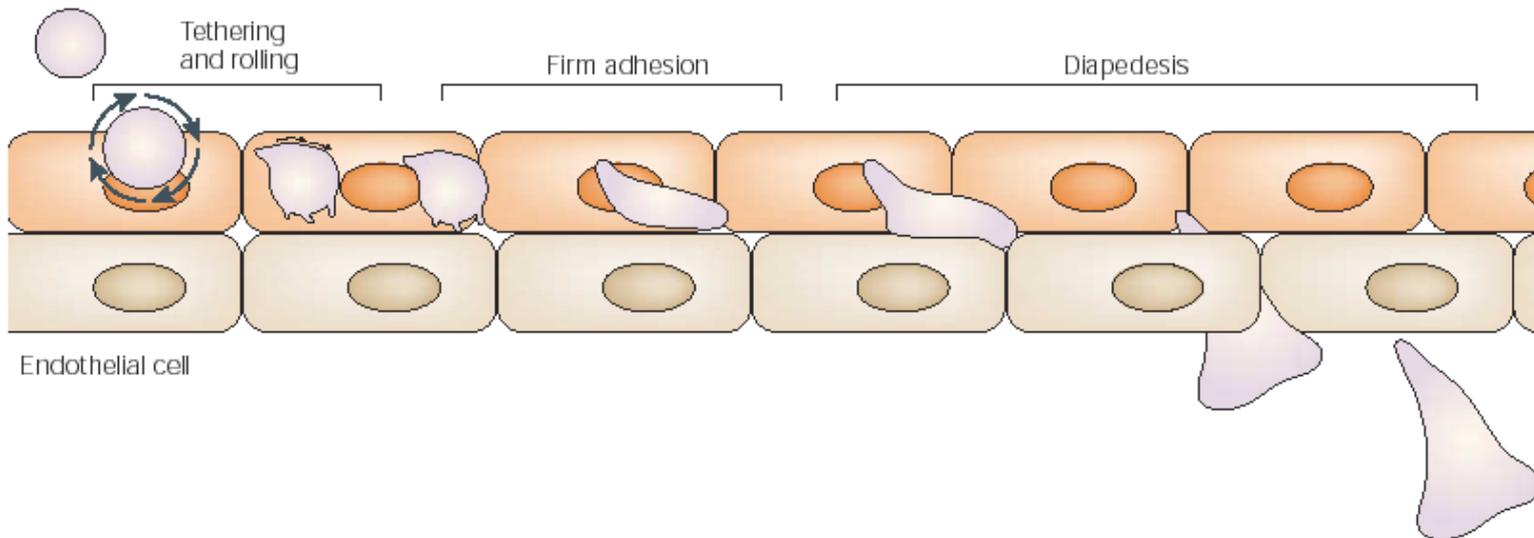
PECAM1, ICAM1, ICAM2, JAM- A, JAM- B, JAM- C y endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM)

Migración transendotelial



- VCAM-1
- ICAM-1
- PECAM
- VE-cadherin
- β-catenin
- Plakoglobin
- p120

LBRC: lateral border recycling compartment



- Fosforilación de VE-cadherina en cel endoteliales
- Activación de Rac1: Incremento de ROS
- Resultado neto:
 - Perdida de estructuras de unión