



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**LA ADHESIÓN DE LINFOCITOS B A CÉLULAS ENDOTELIALES  
INDUCE LA MIGRACIÓN PREFERENCIAL DE  
LINFOCITOS T DE MEMORIA CENTRAL**

**Memoria para optar al título profesional de Bioquímico**

**JOCELYN CECILIA NEIRA VILLEGAS**

Directores de Tesis:  
Dra. María Rosa Bono Merino  
Dr. Mario Roseblatt Silber  
Departamento de Biología  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

Profesor Patrocinante:  
Dr. Javier Puente Piccardo  
Departamento de Bioquímica y  
Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Santiago-Chile  
2008**

*A mis padres...*

## AGRADECIMIENTOS

Llegué al final de una etapa de mi vida, la que me hizo enriquecer mis conocimientos y mi persona. Este período no ha sido fácil, fueron bastantes los obstáculos y deseos de desistir en el camino, pero fueron muchos los que estuvieron a mí lado para darme la mano, apoyarme y motivarme a seguir adelante. Es por esto que agradezco a todos los que estuvieron conmigo...

A Dios por su infinita bondad. A mis padres a quienes les debo todo lo que soy, por guiarme, por el amor y por su comprensión. A mi hermano por amarme incondicionalmente. A mi tía Sofía, tío Jano, tío Checho por tirarme la oreja cuando lo merecía. A Rodrigo por aparecer en mi vida...por saber entenderme y soportarme. A mis amigos por compartir momentos inolvidables llenos de experiencias positivas y negativas, pero que nos han hecho crecer y fortalecer nuestra amistad. A mis amigos de inmunología que hacen del laboratorio un gran lugar para trabajar: Leito y Vale por ser profesores pacientes y por compartir sus conocimientos y experiencias; Dani, Paz, Ale, Raulito, Jenny, Caro, Jaime, Pablo Espejo, Paulita, Fabi, Fernando, Gonzalo, Pablo Vargas, Cinthia, Eva, Pame, a todos los que han trabajado en el laboratorio, por compartir discusiones y excelentes momentos. Y no puedo olvidar a mis jefes que hicieron posible que yo amara esta profesión: a María Rosa por su paciencia y tiempo que me dedicó, y por todos los sabios consejos desde el inicio hasta el final de mi tesis; y a Mario por sus importantes aportes y valiosos consejos.

No quisiera omitir a nadie, pero créanme que han sido realmente importantes para mí. Gracias y que Dios los Bendiga Siempre.

Finalmente terminó una etapa que me permite comenzar un gran viaje a lo que más me apasiona...LA CIENCIA.

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	ii
ÍNDICE GENERAL .....	iii
ÍNDICE DE TABLAS .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN .....	x
SUMMARY .....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
Vénulas endoteliales columnares.....	1
Quimioquinas.....	3
Glicosaminoglicanos.....	5
Proceso de migración transendotelial .....	6
Moléculas de histocompatibilidad de clase II y migración.....	9
Antecedentes previos .....	10
HIPÓTESIS .....	11
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
Anticuerpos.....	12
Cultivos y líneas celulares .....	12
Aislamiento de linfocitos .....	14
Co-cultivos celulares.....	15
Análisis de proteoglicanos .....	15
Citometría de flujo.....	16
Análisis de macroarrays.....	16
Extracción del RNA total.....	17
Síntesis de cDNA y síntesis de cRNA.....	17
Hibridación del cRNA .....	18
Análisis de RT-PCR .....	18
Ensayos de trans migración " <i>in vitro</i> " .....	20

Análisis estadístico .....	21
RESULTADOS.....	22
Caracterización de las células endoteliales .....	22
Las células endoteliales de amígdalas co-cultivadas con linfocitos B adquieren moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II).....	23
La adhesión de linfocitos B a células endoteliales de amígdalas inducen un patrón de expresión diferencial de quimioquinas .....	33
Las células endoteliales derivadas de amígdalas humanas co-cultivadas con células B inducen la transmigración de linfocitos T CD4+ de memoria.....	38
Los linfocitos T CD4+ de memoria central migran preferencialmente a través de células endoteliales activadas por linfocitos B .....	42
El contacto entre células endoteliales y linfocitos B, además de factores solubles son requeridos para una migración eficiente de linfocitos T.....	45
DISCUSIÓN .....	50
Moléculas de histocompatibilidad de clase II.....	50
Quimioquinas.....	53
Transmigración linfocitaria.....	56
CONCLUSIONES .....	59
BIBLIOGRAFÍA .....	60
ANEXO... ..	66

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las vénulas endoteliales columnares (HEV) .....	2
Tabla 2. Quimioquinas y receptores de quimioquinas .....	4
Tabla 3. Lista de primarios utilizados para análisis de RT-PCR.....	19
Tabla 4. Niveles relativos de expresión de genes de quimioquinas en células endoteliales derivadas de amígdalas sometidas a diferentes tratamientos .....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Eventos involucrados en la extravasación linfocitaria.....	7
Figura 2. Las células endoteliales expresan un patrón diferencial de proteoglicanos.....	22
Figura 3. Las células endoteliales de amígdalas co-cultivadas con líneas celulares B presentan moléculas MHC-II.....	23
Figura 4. La adhesión de linfocitos B, pero no de linfocitos T, induce la expresión de moléculas MHC-II en la superficie de las células endoteliales de amígdalas.....	24
Figura 5. La expresión de moléculas MHC-II en células endoteliales de amígdalas depende de la razón célula endotelial/linfocito B.....	25
Figura 6. La adhesión de linfocitos B a células endoteliales no induce la transcripción del mRNA de las moléculas MHC-II.....	26
Figura 7. Expresión de la cadena invariante (Ii) en células endoteliales de amígdalas.....	27
Figura 8. La adhesión de linfocitos B de ratón a células endoteliales humanas no produce la expresión de moléculas MHC-II.....	28
Figura 9. Las moléculas MHC-II presentes en las células endoteliales de amígdalas no provienen de la membrana plasmática de las células B.....	29
Figura 10. Las moléculas MHC-II presentes en las células endoteliales de amígdalas dependen del contacto con las células B.....	31
Figura 11. La adquisición de moléculas MHC-II en células endoteliales producida por la adhesión de linfocitos B es un fenómeno general en los endotelios.....	32
Figura 12. Expresión de genes de quimioquinas y receptores de quimioquinas en células endoteliales de amígdalas.....	35
Figura 13. Expresión del mRNA de genes de quimioquinas en células endoteliales derivadas de amígdalas.....	37
Figura 14. Las células endoteliales co-cultivadas previamente con células B inducen la trans migración selectiva de linfocitos T CD4+.....	39
Figura 15. La adhesión de células B a células endoteliales derivadas de amígdalas induce la trans migración preferencial de linfocitos T CD4+ de memoria.....	40
Figura 16. La adhesión de linfocitos B de sangre o de amígdala a células endoteliales derivadas de amígdalas induce la trans migración preferencial de linfocitos T CD4+ de memoria.....	41

Figura 17. La adhesión de linfocitos B a células endoteliales de amígdalas induce la migración preferencial de linfocitos T CD4+ de memoria central.....	43
Figura 18. La adhesión de linfocitos B a células endoteliales de amígdalas induce la migración preferencial de linfocitos T CD4+ de memoria central.....	44
Figura 19. La transmigración de linfocitos T a través de células endoteliales de amígdalas activadas con linfocitos B es incrementada por factores solubles .....	47
Figura 20. Los factores solubles inducen un patrón de transmigración preferencial de linfocitos T CD4+ de memoria central .....	48
Figura 21. La transmigración de linfocitos T es dependiente del contacto entre linfocito B y células endoteliales derivadas de amígdalas .....	49

## ABREVIATURAS

BCR	:	Receptor de célula B ( <i>B Cell Receptor</i> )
CLA	:	Antígeno asociado a linfocito cutáneo ( <i>Cutaneous Lymphocyte-Associated Antigen</i> )
DARC	:	Receptor/Antígeno Duffy para quimioquinas ( <i>Duffy Antigen/Receptor for Chemokines</i> )
DNA	:	Ácido desoxiribonucleico
EBV	:	Virus Epstein Barr ( <i>Epstein Barr Virus</i> )
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK	:	Quinasa regulada por señal extracelular ( <i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i> )
FAK	:	Quinasa focal de adhesión ( <i>Focal Adhesion Kinase</i> )
FBS	:	Suero fetal de bovino
FITC	:	Isotiocianato de fluoresceína
GAG	:	Glicosaminoglicanos
GLYCAM	:	Molécula de adhesión celular dependiente de glicosilación ( <i>Glycosylation-Dependent Cell-Adhesion Molecule</i> )
HEC	:	Células endoteliales columnares ( <i>High Endothelial Cells</i> )
HEV	:	Vénulas endoteliales columnares ( <i>High Endothelial Venules</i> )
HLA	:	Antígeno de leucocitos humano
HS	:	Heparan sulfato
HSPG	:	Proteoglicanos heparan sulfato
HUTEC	:	Células endoteliales de amígdala humana ( <i>Human Tonsil Endothelial Cells</i> )
HUVEC	:	Células endoteliales de cordón umbilical humano ( <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> )
ICAM	:	Molécula de adhesión intercelular ( <i>Intercellular Adhesion Molecule</i> )
Ii	:	Cadena invariante
IL	:	Interleuquina
IFN	:	Interferón
Ig	:	Inmunoglobulinas
JAM	:	Moléculas adhesivas de unión ( <i>Junctional Adhesion Molecules</i> )
LB	:	Linfocitos B
LFA-1	:	Antígeno tipo 1 asociado a la función del linfocito/Integrina $\alpha$ L $\beta$ 2 ( <i>Lymphocyte Function-Associated Antigen-1</i> )
LPS	:	Lipopolisacárido
LT	:	Linfocitos T

MACS	:	Separación de células activadas por magneto ( <i>Magnetic Activated Cell Sorting</i> )
MAdCAM-1	:	Molécula de adhesión celular tipo 1 de adresina vascular mucosal ( <i>Mucosal Vascular Addressin Cell-Adhesion Molecule-1</i> )
MHC-II	:	Complejo principal de histocompatibilidad de clase II
NF-κB	:	Factor nuclear κB
NI	:	No identificado
OLS	:	Órganos linfoides secundarios
PBMC	:	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	:	Tampón fosfato salino
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	:	Ficoeritrina
PerCP	:	( <i>Peridinin Chlorophyll-a Protein</i> )
PM	:	Peso molecular
PNAd	:	Adresinas del linfonodo periférico ( <i>Peripheral-Node Addressins</i> )
PSGL	:	Ligando de la glicoproteína P-selectina ( <i>P-Selectin Glycoprotein Ligand</i> )
RNA	:	Ácido ribonucleico
RT	:	Transcriptasa inversa
SDS-PAGE	:	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
Th1	:	T de ayuda 1 ( <i>T helper 1</i> )
Th2	:	T de ayuda 2 ( <i>T helper 2</i> )
TNF	:	Factor de necrosis tumoral ( <i>Tumor Necrosis Factor</i> )
VCAM-1	:	Molécula de adhesión celular vascular ( <i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i> )
VLA-4	:	Antígeno 4 de respuesta tardía/Integrina α4/β1 ( <i>Very Late Antigen-4</i> )

## RESUMEN

La migración de los linfocitos a los órganos linfoides secundarios es un paso crucial en la iniciación de la respuesta inmune adquirida. Este fenómeno es caracterizado por múltiples eventos que requieren de interacciones entre el endotelio y el linfocito, e involucra la participación de diversas moléculas que favorecen la migración de los linfocitos a través de las células endoteliales columnares (HEC). La transmigración es un proceso activo que depende del estado de activación y diferenciación de los linfocitos y de señales específicas de las células endoteliales.

Diversos estudios han demostrado que los linfocitos T de memoria migran selectivamente a través de células endoteliales a sitios de inflamación y/o infección. Además, ciertas evidencias sugieren que la expresión de moléculas MHC-II por células endoteliales facilitan el reclutamiento de linfocitos T antígeno específicos, hacia un tejido. Por otra parte, en nuestro laboratorio hemos demostrado que la adhesión de linfocitos B a células endoteliales columnares derivadas de amígdalas humanas (HUTEC) induce la activación endotelial, conduciendo a la producción de diversas citoquinas y quimioquinas.

En esta tesis determinamos que la adhesión de linfocitos B a HUTEC permite la presencia de moléculas MHC-II en la superficie endotelial, además de la producción de un patrón de expresión diferencial de quimioquinas, las cuales podrían estar involucradas en la transmigración de los linfocitos. Los resultados muestran que la presencia de moléculas MHC-II en la superficie de las células endoteliales depende de la adhesión de los linfocitos B, pero no de linfocitos T. Sin embargo, MHC-II no se induce a nivel transcripcional, sugiriendo que las HUTEC adquieren moléculas MHC-II de los linfocitos B humanos durante el proceso de adhesión celular. Además, el contacto de los linfocitos B a HUTEC induce la expresión del mRNA de las quimioquinas CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CXCL8, entre otras. Demostramos que el efecto de la adhesión de linfocitos B a HUTEC induce la transmigración de linfocitos T de memoria central. Por otra parte, investigamos el efecto de factores soluble secretados por HUTEC y/o linfocitos B, después del contacto, en la migración transendotelial. Nuestros resultados muestran que no son necesarios los factores solubles para un incremento en la transmigración, aunque estos factores permiten una migración más eficiente de los linfocitos T.

En conclusión, estos resultados sugieren que la interacción de linfocitos B con células endoteliales modula la respuesta inmune, favoreciendo la transmigración preferencial de linfocitos T CD4+ de memoria central.

## SUMMARY

### **(Adhesion of B lymphocytes to endothelial cells induces the preferential migration of central memory T lymphocytes)**

Lymphocytes migration to secondary lymphoid organs is a crucial step in the initiation of the acquired immune response. This phenomenon is characterized by multiple events that require interactions between the endothelium and lymphocytes, and involves diverse molecules that favor the migration of T lymphocytes across the high endothelial cells (HEC). Transmigration is an active process that depends on the state of activation and differentiation of T lymphocytes and specific signals of endothelial cells.

Diverse studies have demonstrated that memory T lymphocytes selectively migrate across endothelial cells to sites of inflammation and/or infection. In addition, certain evidences suggest that expression of MHC-II molecules by endothelial cells facilitate the recruitment of antigen specific T lymphocytes towards a tissue. On the other hand, in our laboratory we have demonstrated that the adhesion of B lymphocytes to high endothelial cells derived from human tonsils (HUTEC) induces endothelial activation, leading to the production of several cytokines and chemokines.

In this thesis we determined that the adhesion of B lymphocytes to HUTEC cells allows the presence of MHC-II molecules on the endothelial surface, in addition to the production of a differential expression pattern of chemokines, which could be involved in the lymphocytes' transmigration. These results show that the presence of MHC-II molecules on the surface of endothelial cells depends on the adhesion of B lymphocytes, but not T lymphocytes. However, MHC-II is not induced at transcriptional level, suggesting that HUTEC cells acquire MHC-II molecules from human B lymphocytes during the process of cellular adhesion. In addition, the contact of B lymphocytes to HUTEC cells induces the mRNA expression of chemokines such as CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CXCL8, among others. We demonstrated that the effect of the adhesion of B lymphocytes to HUTEC cells induces the memory central T lymphocytes transmigration. In the other hand, we investigated the effect of soluble factors secreted by HUTEC cells and/or B lymphocytes, after the contact between them, in the transendotelial

migration. Our results show that although soluble factors are not necessary to increase the transmigration, these factors allow a more efficient migration of T lymphocytes.

In conclusion, these results suggest that the interaction of B lymphocytes with endothelial cells modulates the immune response, favoring the preferential transmigration of central memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.

## INTRODUCCIÓN

El sistema inmune está compuesto de un gran repertorio de células especializadas, los linfocitos, los cuales tienen una alta capacidad migratoria y se encuentran continuamente recirculando entre la sangre y la linfa [Springer, 1994]. Los linfocitos T (LT) que entran a los órganos linfoides secundarios (OLS) adquieren un patrón migratorio que depende del estado de activación en que estos se encuentren y de señales específicas del tejido al que ingresan [Masuyama y cols., 1992; Ebert y cols., 2005]. Desde la sangre, los linfocitos migran al interior de los OLS a través de vénulas endoteliales columnares (*High Endothelial Venules*, HEV), un paso crucial en la respuesta inmune [Miyasaka y cols., 2004].

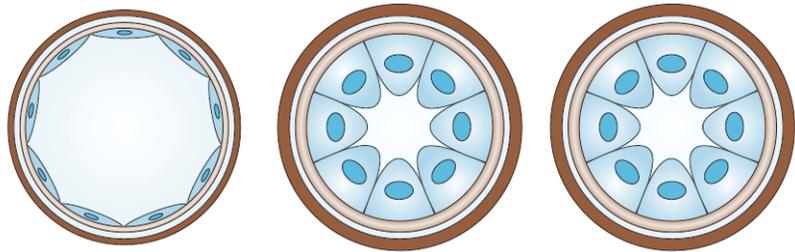
### **Vénulas endoteliales columnares**

Las HEV son vénulas postcapilares altamente especializadas, las cuales tienen características estructurales y funcionales que las diferencian de los otros vasos (Tabla 1). Morfológicamente, están constituidas por una prominente lámina perivascular, una gruesa lámina basal y una capa de células endoteliales con estructura cuboidal [Miyasaka y cols., 2004]. Las HEV se encuentran en todos los OLS (placas de Peyer, linfonodos periféricos, amígdalas, etc.), exceptuando el bazo [von Andrian y cols., 2003], y están localizadas principalmente en las zonas de células T, tales como el área paracortical de los linfonodos y las áreas interfoliculares de las placas de Peyer, y en zonas de células B, particularmente en la región folicular [Miyasaka y cols., 2004].

A niveles ultraestructurales, las células endoteliales columnares (HEC) presentan un desarrollado complejo de Golgi, abundantes polirribosomas y retículos endoplasmáticos rugosos, revelando una intensa actividad biosintética. Por otra parte, se caracterizan por presentar uniones discontinuas entre células endoteliales adyacentes, las cuales permiten la transmigración masiva de linfocitos a través de las HEV [Girard y cols., 1999; Palmeri y cols., 2004].

Las HEC expresan una variedad de moléculas regulatorias, tales como moléculas de adhesión y quimioquinas, que contribuyen a la migración eficiente y selectiva de los linfocitos [Palmeri y cols., 2004; Roseblatt y cols., 2004]. Las HEC expresan selectivamente moléculas de adhesión que difieren entre los linfonodos de diferentes zonas del organismo [von Andrian y cols., 2003]. Por ejemplo, las HEC de linfonodos periféricos expresan sialomucinas altamente glicosiladas y

**TABLA 1.** Características de las vénulas endoteliales columnares (HEV)



	Vénula Normal	HEV de linfonodo periférico	HEV de placa de Peyer
<b>Endotelio</b>	Plano	Cuboidal	Cuboidal
<b>Lámina Basal</b>	Delgada	Gruesa	Gruesa
<b>Lámina perivascular</b>	Escasa	Prominente	Prominente
<b>CD31</b>	+	+	+
<b>ICAM-1</b>	-/+	++	++
<b>ICAM-2</b>	+	+	+
<b>PNAd</b>	-	++	+
<b>MAdCAM-1</b>	-	-	+
<b>Quimioquinas CCL19, CCL21, CXCL12, CXCL13</b>	-	+	+

sulfatadas, tales como GLYCAM-1 (*Glycosylation-Dependent Cell-Adhesion Molecule-1*), CD34, podocalixina, endoglicanos, endomucinas y PNAd (*Peripheral-Node Addressins*). En cambio, las HEC de placas de Peyer expresan preferencialmente MAdCAM-1 (*Mucosal Vascular Addressin Cell-Adhesion Molecule-1*) [Miyasaka y cols., 2004]. Bajo condiciones fisiológicas, las HEC expresan constitutivamente quimioquinas [Gunn y cols., 1998]. Sin embargo, existen evidencias que las quimioquinas producidas por células extravasculares se transportarían a la superficie luminal de las HEV, donde estimularían el tráfico linfocitario hacia los órganos linfoides [Baekkevold y cols., 2001]. Además, se ha descrito que estímulos inflamatorios tales como LPS, IL-1, TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  inducen en las células endoteliales moléculas de adhesión y altos niveles de quimioquinas inflamatorias, lo que llevaría probablemente a una mayor migración linfocitaria [Beck y cols., 1999].

En humanos, se han observado vasos con características similares a HEV en tejidos asociados a inflamación crónica, tales como artritis reumatoidea, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto y lesiones inflamatorias cutáneas. Estos vasos presentan un endotelio cuboidal, incorporan sulfatos y permiten una alta infiltración de linfocitos. Esto indica que las HEV podrían jugar un rol importante en la patogénesis de múltiples enfermedades inflamatorias mediando el reclutamiento anormal de linfocitos [Girard y cols., 1995].

### **Quimioquinas**

Las quimioquinas juegan un rol importante en la trans migración endotelial a los tejidos linfoides secundarios y/o a sitios de inflamación. Ellas pertenecen a un grupo de proteínas de bajo peso molecular (8-14 KDa) y actúan como quimioattractantes de leucocitos, ejerciendo sus efectos biológicos a través de receptores de membrana acoplados a proteína G [Zlotnik y cols., 2000]. Se han identificado más de 40 quimioquinas humanas que se clasifican en cuatro subfamilias: CC, CXC, C y CX3C (Tabla 2) [Zlotnik y cols., 2000], las cuales difieren en el número y posición de los residuos cisteínas ubicados en el extremo N-terminal [Olson y cols., 2002]. Las quimioquinas se clasifican además según su actividad y distribución en los tejidos como homeostáticas e inflamatorias (Tabla 2). Las quimioquinas homeostáticas, tales como CCL19 (ELC), CXCL12 (SDF-1) y CXCL13 (BCA-1), son producidas constitutivamente y mantienen el tráfico basal de linfocitos; en contraste, las quimioquinas inflamatorias, como por ejemplo CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES) y CXCL8 (IL-8), son producidas en respuesta a un estímulo inflamatorio o inmunológico y controlan el reclutamiento de linfocitos efectores [Mantovani y cols., 2006]. Se ha observado que las respuestas celulares a las quimioquinas son rápidas y transientes [Ebert y cols., 2005], que las quimioquinas pueden actuar en forma soluble o inmovilizadas en la superficie luminal del endotelio donde se asocian a moléculas de membrana involucradas en el transporte y presentación de quimioquinas tales como glicosaminoglicanos (GAG) y receptor/antígeno Duffy para quimioquinas (DARC) [Middleton y cols., 2002]. Además, se ha determinado que la expresión de quimioquinas depende del origen del endotelio y de factores que controlan la presentación de diversas quimioquinas [Hillyer y cols., 2005]. Las quimioquinas, también pueden participar en la regulación de funciones endoteliales que incluyen migración, angiogénesis y proliferación celular [Gupta y cols., 1998; Murdoch y cols., 1999], además de participar en el reclutamiento leucocitario. Finalmente, las quimioquinas cumplen un

**TABLA 2.** Quimioquinas y receptores de quimioquinas



Familia CC			
Otros nombres	Nombre actual		Receptor
MCP1	CCL2		CCR2
MCP4	CCL13		
MCP3	CCL7		
MCP2	CCL8		CCR5
MIP1β	CCL4		
MIP1αS	CCL3		
MIP1αP	CCL3L1		CCR1
RANTES	CCL5		
MPIF-1	CCL23		
HCC-1	CCL14		CCR3
HCC-2	CCL15		
HCC-4	CCL16		
Eotaxin	CCL11		CCR4
Eotaxin-2	CCL24		
Eotaxin-3	CCL26		
TARC	CCL17		CCR6
MDC	CCL22		
MIP3α	CCL20		
ELC	CCL19		CCR7
SLC	CCL21		
I-309	CCL1		
TECK	CCL25		CCR8
CTACK	CCL27		
MEC	CCL28		
PARC	CCL18		CCR9
			CCR10
			Unknown


Familia CXC			
Otros nombres	Nombre actual		Receptor
IL-8	CXCL8		CXCR1
GCP2	CXCL6		
NAP2	CXCL7		
ENA-78	CXCL5		CXCR2
GROα	CXCL1		
GROβ	CXCL2		
GROγ	CXCL3		CXCR3B
PF4	CXCL4		
IP10	CXCL10		
MIG	CXCL9		CXCR3A
ITAC	CXCL11		
SDF1α/β	CXCL12		
BCA1/BLC	CXCL13		CXCR4
			CXCR5
			CXCR6
BRAK	CXCL14		Unknown


Familia C			
Otros nombres	Nombre actual		Receptor
Lymphotactin	XCL1		XCR1
SCM1β	XCL2		


Familia CX <sub>3</sub> C			
Otros nombres	Nombre actual		Receptor
Fractalkine	CX <sub>3</sub> CL1		CX <sub>3</sub> CR1

Las quimioquinas humanas, codificadas por 43 genes, son clasificadas en cuatro familias que difieren en el número y posición de los residuos cisteínas ubicados en el extremo N-terminal: 1. las quimioquinas CC, presentan dos residuos cisteínas adyacentes; 2. las quimioquinas CXC, tienen un aminoácido interpuesto entre los dos residuos cisteínas y son divididas en dos subfamilias dependiendo de la presencia o ausencia del motivo Glu-Leu-Arg (ERL) cerca del N-terminal; 3. las quimioquinas C; se caracterizan por la presencia de un único residuo cisteína; 4. las quimioquinas CX<sub>3</sub>C, presentan tres aminoácidos entre los dos residuos cisteínas en el N-terminal. La columna izquierda corresponde al acrónimo antiguo, seguido de la nomenclatura sistemática actual de las quimioquinas. Además, las quimioquinas se clasifican como homeostáticas (verde), inflamatorias (rosado) y con función mixta (amarillas).

Las quimioquinas se unen a una subfamilia de receptores acoplados a proteínas G, que incluyen 18 receptores que son clasificados como CCR, CXCR, XCR y CX<sub>3</sub>CR, según la clase de quimioquina que son capaces de unir.

papel fundamental en procesos tales como organogénesis, hematopoyesis y comunicación neurona-microglia [Olson y cols., 2002].

Se ha descrito que las quimioquinas también pueden participar en el reclutamiento de los diferentes linfocitos al sitio de inflamación, por ejemplo: CCL5 [Siveke y cols., 1998; Kawai y cols., 1999], CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) y CCL4 [Siveke y cols., 1998] inducen una migración selectiva de células Th1 (que expresan CCR5 y CXCR3), pero no afecta a las células Th2 (que expresan CCR3, CCR4 y CCR8) [Kawai y cols., 1999; Esche y cols., 2005]. Por otra parte, CCL1 (I-309), CCL11 (eotaxina), CCL17 (TARC) y CCL22 (MDC), reclutan selectivamente células Th2 [Olson y cols., 2002; Esche y cols., 2005]. Otras quimioquinas como CCL2 y CXCL12, son quimioattractantes tanto de células Th1 como células Th2 [Siveke y cols., 1998]. Diversos reportes indican que existe un aumento en la expresión o síntesis *de novo* de quimioquinas en endotelio dependiendo del estímulo inflamatorio, entre las cuales se encuentran CCL2 [Meissner y cols., 2003], CCL5 [Marfaing-Koka y cols., 1995], CCL17, CCL20 [Meissner y cols., 2003], CXCL5 (ENA-78) y CXCL8 [Imaizumi y cols., 1997], CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC) [Indraccolo y cols., 2007].

### **Glicosaminoglicanos**

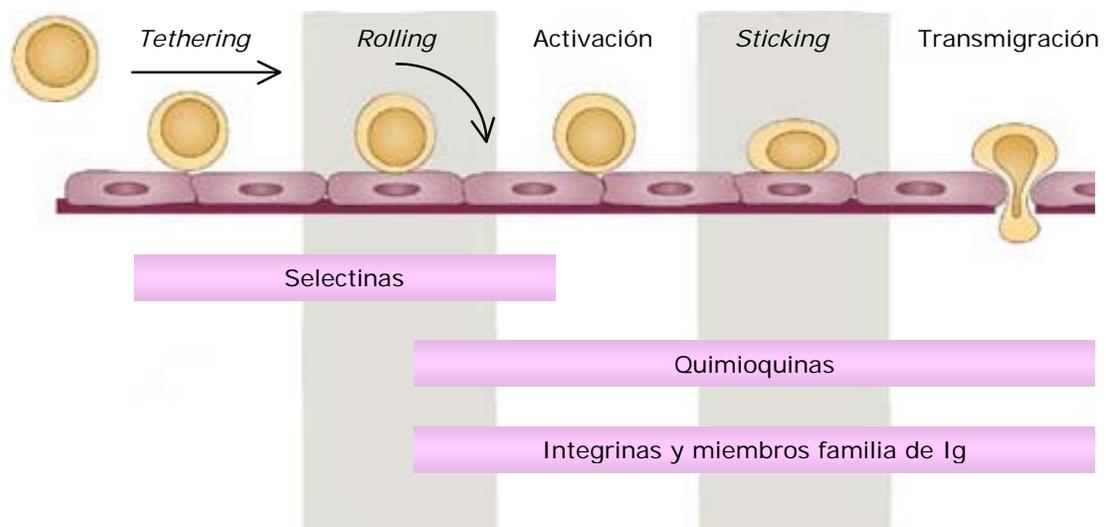
Otra familia de moléculas que pueden tener un papel importante en la adhesión de leucocitos al endotelio son los GAG, los cuales representan una gran diversidad de macromoléculas que presentan variaciones en la composición básica de los sacáridos, acetilación y N- y O-sulfación, además se pueden encontrar solubles en el plasma o unidos a la superficie celular en forma de proteoglicanos [Proudfoot, 2006]. Los GAG pueden interactuar con cientos de proteínas que incluyen proteasas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y quimioquinas [Handel y col., 2005]. Las células endoteliales expresan principalmente el heparan sulfato (HS) [Handel y col., 2005], además de condroitin y dermatan sulfato, donde las proporciones de estos GAG cambian entre los diferentes tipos de células endoteliales [Middleton y col., 2002]. Dentro de los proteoglicanos heparan sulfato (HSPG) se encuentran los sindecans, glicicans, perlecan, agrin y colágeno [Handel y col., 2005]. La evidencia indica que la interacción GAG-quimioquina da especificidad y control a la migración celular. Así, quimioquinas como CCL2, CCL5 y CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) requieren de interacciones con GAG para influenciar la migración celular *in vivo* [Middleton y col., 2002; Handel y col., 2005].

### **Proceso de migración transendotelial**

El proceso de migración a través de las HEV es altamente específico para los linfocitos, y en condiciones fisiológicas las HEV excluyen la adhesión y transmigración de otros leucocitos [Miyasaka y cols., 2004]. La migración transendotelial de linfocitos es esencial en el *homing* linfocitario y en el reclutamiento a sitios de daño, infección e inflamación [Palmeri y cols., 2000]. Este proceso es el resultado de múltiples eventos gatillados por la interacción entre los linfocitos y el endotelio (Figura 1) y permite seleccionar los linfocitos que ingresan a los distintos tejidos [Weber y cols., 2007].

La migración transendotelial se produce en etapas bien caracterizadas (Figura 1). La primera etapa corresponde al reconocimiento y rotación (*tethering* y *rolling*) de linfocitos a lo largo del endotelio vascular [Middleton y cols., 2002], que es mediado por moléculas de adhesión de la familia de las selectinas, que son lectinas dependientes de calcio unidas a membrana [Fabbri y cols., 1999]. La molécula L-selectina (CD62L) se expresa en leucocitos, excepto en LT efectoros [von Andrian y cols., 2003] y reconoce a sus ligandos PNA<sub>d</sub> expresados en HEV de linfonodos periféricos y MAdCAM-1 en HEV de placas de Peyer [Ebert y cols., 2005]. P-selectina y E-selectina se expresan en células endoteliales en respuesta a mediadores de inflamación, y unen específicamente a PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) y a CLA (*Cutaneous Lymphocyte-Associated Antigen*), respectivamente [Springer, 1995]. Además, los linfocitos que migran preferencialmente a las placas de Peyer, requieren de la interacción entre la integrina  $\alpha 4\beta 7$  y MAdCAM-1 para rodar a lo largo del endotelio [Bono y cols., 2007]. Este reconocimiento linfocito-endotelio induce la secreción de moléculas activadoras (citoquinas/quimioquinas), que influyen en la adhesión y migración de los linfocitos [Roseblatt y cols., 2004]. La segunda etapa consiste en la activación de moléculas de adhesión de la familia de las integrinas, expresadas en los linfocitos, las cuales se unen a sus respectivos ligandos en el endotelio. Las quimioquinas secretadas por las células endoteliales interactúan con sus respectivos receptores en los linfocitos, produciendo un cambio conformacional de las integrinas en los linfocitos, lo cual incrementa la afinidad por sus ligandos sin cambiar la densidad de receptores expresados en la superficie del linfocito [Fabbri y cols., 1999], permitiendo la adhesión firme del linfocito al endotelio. La adhesión firme (*sticking*) es favorecida por la interacción de las integrinas LFA-1 ( $\alpha L\beta 2$ ) y VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ) con moléculas de adhesión que pertenecen a la familia de inmunoglobulinas (Ig) ICAM-1/-2 y VCAM-1, respectivamente [Ding y cols., 2000].

Finalmente, los linfocitos entran al OLS o al tejido inflamado principalmente a través de uniones intercelulares [Engelhardt y cols., 2004]. Las moléculas que participarían en la extravasación de los linfocitos a través de estas uniones endoteliales son VE-cadherina (CD144, cadherina-5) [van Buul y cols., 2004], PECAM1 (CD31), CD99 [Engelhardt y cols., 2004] o moléculas adhesivas de unión (*Junctional Adhesion Molecules*, JAM), las cuales son importantes en el control de la permeabilidad vascular y trans migración a través de las células endoteliales [Weber y cols., 2007]. Sin embargo, existen evidencias de estudios *in vivo* e *in vitro* que los linfocitos pueden trans migrar a través de células endoteliales por canales que son formados por asociación de numerosas vesículas enriquecidas en caveolina y F-actina [Millán y cols., 2006].



**Figura 1. Eventos involucrados en la extravasación linfocitaria.** La extravasación de linfocitos desde la sangre al tejido linfoide o inflamado es gatillado por múltiples eventos que involucran la acción secuencial de señales moleculares. Las selectinas inician el reconocimiento y rodamiento a lo largo del endotelio (L-selectina en linfocitos y E- y P-selectina en célula endotelial). El *rolling* linfocitario sobre el endotelio produce la secreción de moléculas activadoras (citoquinas/quimioquinas, ejemplo: CCL21 en *homing* basal, CXCL8 en tejido inflamado). La activación de los receptores de quimioquinas gatilla señales intracelulares que activan integrinas del linfocito, las cuales interaccionan con ligandos de inmunoglobulinas (Ig) expresados en el endotelio, induciendo la adhesión firme. Las interacciones entre integrinas  $\beta 2$  e ICAM-1 y entre VLA-4 y VCAM-1 son cruciales para la adhesión, permitiendo la migración del linfocito a través de las células endoteliales columnares (HEV).

La migración transendotelial de linfocitos no es un proceso al azar y depende de la expresión diferencial de moléculas de adhesión, quimioquinas y receptores de quimioquinas tanto en los linfocitos como en las células endoteliales, lo cual permite seleccionar los linfocitos que ingresan a los distintos tejidos [Stevens y cols., 1982].

Los linfocitos vírgenes migran preferencialmente a los OLS a través de las HEV [Ebert y cols., 2005], proceso guiado por la presencia de ligandos para L-selectina y una gradiente de quimioquinas homeostáticas como CCL19 y CCL21 (SLC) [Bono y cols., 2007]. Los LT vírgenes que migran a linfonodos y placas de Peyer expresan el receptor de quimioquina CCR7, que se une a las quimioquinas CCL19 y CCL21, y L-selectina, la cual reconoce a sus ligandos PNA<sub>d</sub> en linfonodos y MAdCAM-1 en placas de Peyer, ambas presentes en la superficie de las HEV [Bono y cols., 2007]. CCL21, una quimioquina expresada constitutivamente en HEV de ratón [Gunn y cols., 1998], pero que no ha sido detectada en HEV humanas [Palmeri y cols., 2004; Carlsen y cols., 2005], induce adhesión firme vía unión de la integrina  $\alpha 2$  a ICAM-1 y estimula la quimiotaxis de LT vírgenes [Gunn y cols., 1998]. Por otro lado, CCL19 es sintetizada por células no endoteliales (células estromales asociadas a la membrana basal de las HEV) y es transportada a la superficie luminal de las HEV [Baekkevold y cols., 2001; Roseblatt y cols., 2004]. Estudios en ratones mutantes *plt/plt*, que carecen de CCL19 y CCL21, muestran una adhesión débil y una reducción en el número de los LT vírgenes en linfonodos periféricos y placas de Peyer [Warnock y cols., 2000], demostrando la importancia de estas quimioquinas en la transmigración de los linfocitos. Otras quimioquinas tales como CXCL12 y CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ) [Siveke y cols., 1998; Bono y cols., 2007], ligandos de los receptores CXCR4 y CCR6 respectivamente, han sido involucradas en promover la adhesión de LT vírgenes a HEV.

Una vez que los LT vírgenes entran a los OLS, ellos pueden reconocer un antígeno presentado por células presentadoras de antígeno profesionales como las células dendríticas [Bono y cols., 2007]. El encuentro del linfocito con su antígeno gatilla la activación de las células T [Springer, 1995], los cuales se diferencian en células efectoras, capaces de migrar al sitio de infección y erradicar al patógeno, y en células de memorias, capaces de responder más rápidamente al reencuentro con el patógeno [Ebert y cols., 2005]. Las células de memoria se caracterizan según sus propiedades funcionales y migratorias en células T de memoria efectoras y en células T de memoria central [Ebert y cols., 2005]. Los LT de memoria central expresan L-selectina y CCR7

lo cual permite su migración a los OLS, pero a diferencia de los LT vírgenes, los LT de memoria central poseen mecanismos de *homing* a linfonodos periféricos dependiente e independiente de CCR7, siendo este último mediado por la interacción CXCL12-CXCR4 [Scimone y cols., 2004]. En contraste, los LT de memoria efectores son L-selectina- CCR7- y migran principalmente a tejidos no linfoides como pulmón, hígado, piel, intestino, lámina propia o sitios de inflamación [Mora y cols., 2005]. El fenotipo CCR7+ L-selectina+ es predictivo de células que migran a linfonodos, pero no excluye que estas células puedan infiltrar tejidos periféricos [Mora y cols., 2005].

### **Moléculas de histocompatibilidad de clase II y migración**

Durante un proceso inflamatorio, las células endoteliales pueden ser activadas por citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$  e IFN- $\gamma$ , las cuales cambian el patrón de expresión tanto a nivel transcripcional como traduccional de diversas moléculas, influyendo en la capacidad de interacción entre célula endotelial-leucocito y de esta manera modular el reclutamiento de los leucocitos [Beck y cols., 1999].

Diversos estudios han demostrado que las células endoteliales, al encontrarse bajo algún estímulo inflamatorio pueden o no inducir la expresión *de novo* de moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), que son las moléculas presentadoras de antígeno a los LT CD4+, por lo tanto esenciales en el desarrollo de la respuesta inmune efectora [Janeway y cols., 1999]. Dentro de las citoquinas inflamatorias mencionadas, solo el IFN- $\gamma$  induce la síntesis de moléculas MHC-II (HLA-DR > HLA-DP > HLA-DQ) [Lapierre y cols., 1988; Melrose y cols., 1998]. La expresión de moléculas MHC-II se ha observado *in vivo* en células endoteliales de tejidos inflamados [Marelli-Berg y cols., 1999] y se ha demostrado que las células endoteliales tienen la capacidad de activar células T mediante la presentación antigénica, gatillando la proliferación de LT [Geppert y cols., 1985; Savage y cols., 1995; Marelli-Berg y cols., 1999]. En este sentido se considera a las células endoteliales como células presentadoras de antígeno semiprofesionales [Rothermel y cols., 2004]. También, se ha determinado *in vitro* e *in vivo* que la presentación antigénica por el endotelio influye en la transmigración de células T, facilitando el reclutamiento de células específicas de antígeno [Marelli-Berg y cols., 1999; Bradley y cols., 1999]. Por lo tanto, la expresión de moléculas MHC-II estaría influyendo en la migración transendotelial de células T al tejido inflamado.

### **Antecedentes previos**

Recientemente, en nuestro laboratorio se demostró que la adhesión de células B, pero no células T, induce cambios en el estado de fosforilación en residuos tirosina de proteínas pp125FAK, paxilina y ERK, causando activación funcional de células endoteliales de amígdala humana (HUTEC). Esta activación, conduce a la producción de mRNA para citoquinas y quimioquinas, tales como IL-6, CXCL8, CCL2 y CCL4 [Reyes y cols., 2002]. Además, se demostró que la interacción de HUTEC con células B y T induce la activación del factor transcripcional NF- $\kappa$ B, el cual está relacionado con la producción de IL-6 y CXCL8. La activación de NF- $\kappa$ B en HUTEC es independiente del contacto célula endotelial-célula B y ocurre por un mecanismo dependiente de factores solubles producidos por células B y HUTEC [Naves y cols., 2006].

Sobre la base de estos estudios, nos propusimos investigar el papel que cumple la adhesión de células B en la migración transendotelial de células T y el efecto en la expresión de quimioquinas en células endoteliales provenientes de amígdala humana. Determinamos que HUTEC activadas con células B adquieren moléculas MHC-II en su superficie, además de un patrón de expresión diferencial de quimioquinas, las cuales podrían estar implicadas en la trans migración de los linfocitos. Demostramos que el efecto de la adhesión de células B a HUTEC favorece la trans migración preferencial de los linfocitos T de memoria centrales (CD45RO+ CCR7+). Adicionalmente, demostramos que la trans migración es dependiente de contacto entre célula B y célula endotelial. Estos resultados sugieren que el contacto de células B con el endotelio modula la respuesta inmune favoreciendo la migración transendotelial de linfocitos T.

## **HIPÓTESIS**

La adhesión de linfocitos B a células endoteliales derivadas de amígdalas humanas modula la trans migración preferencial de linfocitos T.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto de la adhesión de linfocitos B a células endoteliales en la trans migración de linfocitos T y los posibles cambios inducidos en las células endoteliales.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estudiar la expresión de moléculas de superficie en las células endoteliales luego de la adhesión de linfocitos B.
2. Identificar el patrón de expresión de quimioquinas en las células endoteliales inducidas por la activación con linfocitos B.
3. Identificar el fenotipo de linfocitos T que transmigran a través de células endoteliales de amígdala humana después del contacto con linfocitos B.
4. Evaluar el papel de factores solubles en el fenotipo y en la migración transendotelial de linfocitos T.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Anticuerpos

Anticuerpos monoclonales: anti-CD20 humano IF-54, anti-CD3 (IgG2a) humano OKT3, anti-I-A<sup>d</sup> (IgG2a, $\kappa$ ) MKD6.3, anti-HLA-DR L243, anti-Ii Pin1 (este último donado por el Dr. Philippe Benaroch, Institut Curie, Paris, Francia), anti-stub humano 3G10 (anticuerpo contra un epitopo común generado desde HSPG digerido por heparitinasa, donado por el Dr. Enrique Brandan, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile); CD3 PerCP, CD4 PerCP, CD4 PE-Cy5, CD8 PerCP, CD8 PE-Cy5, CD13 FITC, CD13 PE, CD19 APC, CD45RA FITC, CD45RO FITC, CD45RO PE, CD62L PE, CD69 FITC, HLA-DR PE (Pharmingen, San Diego, CA, EEUU); anti-CCR7 humano hecho en rata (Pharmingen, San Diego, CA, EEUU, donado por el Dr. Tobías Manigold, Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile).

Anticuerpos policlonales: anti-Ig de ratón hecho en cabra conjugado a FITC (Dako, Glostrup, Dinamarca); mouse IgG1 anti-humano PE, anti-Ig de ratón hecho en cabra conjugado a peroxidasa (Pharmingen, San Diego, CA, EEUU); anti-rata (IgG2a) hecho en ratón conjugado a biotina, anticuerpo conjugado a estreptavidina-PE (Pharmingen, San Diego, CA, EEUU, donado por el Dr. Tobías Manigold, Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile).

### Cultivos y líneas celulares

Las células endoteliales columnares se prepararon de amígdalas (HUTEC) provenientes de pacientes que presentaban una obstrucción o inflamación crónica y se caracterizaron como se describió previamente [Castro y cols., 1996]. Después de la amigdalectomía, las amígdalas se lavaron por inmersión sucesiva en PBS estéril, etanol 70% y PBS estéril. Luego de remover el epitelio externo de las amígdalas, estas se cortaron en trozos 1 mm<sup>3</sup> aproximadamente y se digirieron durante 1 hora a temperatura ambiente con 400  $\mu$ g/ml de colagenasa A (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EEUU) y 100  $\mu$ g/ml de DNAsa tipo I (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EEUU, EEUU) en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco<sup>TM</sup>, Grand Island, NY, EEUU) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS). Posteriormente, la suspensión celular se sedimentó a 1 x g durante 5 minutos y el sobrenadante se centrifugó a 250 x g durante 10 min. Las células colectadas se lavaron 2 veces en medio de cultivo RPMI 1640 + 10% FBS y se

cultivaron a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup> en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco™, Grand Island, NY, EEUU), 100 IU/ml de penicilina (Gibco™, Grand Island, NY, EEUU), 0,5 µg/ml de anfotericina-B/fungizona (Gibco™, Grand Island, NY, EEUU) y 20% de FBS. Finalmente, las células adherentes de cultivos confluentes se soltaron con 0,25% de tripsina/EDTA en PBS, se sub-cultivaron y mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 + 10% FCS o se mantuvieron congeladas en N<sub>2</sub> líquido. Las HUTEc fueron caracterizadas mediante estudios de citometría de flujo, las cuales mostraron marcadores de células endoteliales columnares como LVAP-2 y DARC [Castro y cols., 1996; Girard y cols., 1995]. Para los experimentos, las HUTEc fueron crecidas a confluencia y utilizadas entre pasajes 1 y 6. En algunos casos, fueron tratadas con 500 U/ml IFN-γ durante 24, 48 o 96 horas.

Las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) se obtuvieron de venas de cordón umbilical provenientes de un embarazo normal. Las HUVEC se aislaron mediante digestión con colagenasa tipo IV (Gibco™, Grand Island, NY, EEUU) durante 20 minutos a 37°C. Las células se recuperaron en medio de cultivo M-199 (Gibco™, Grand Island, NY, EEUU) suplementado con 20% de FBS y 50 µg/ml de heparina y se centrifugaron a 1.600 rpm por 10 minutos. Las células se resuspendieron en medio M-199 suplementado con 100 IU/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 50 µg/ml de heparina, 0,5 µg/ml de anfotericina-B, 50 µg/ml de suplemento de crecimiento de célula endotelial (ECGS) (Calbiochem, La Jolla, CA, EEUU) y 10% de FBS. Las células obtenidas se cultivaron en placas de cultivo re-cubiertas con 2% de gelatina. Finalmente, las células adherentes de cultivos confluentes se soltaron con 0,25% de tripsina/EDTA en PBS, se sub-cultivaron y mantuvieron en M-199 suplementado con 50 µg/ml de heparina, 50 µg/ml de ECGS y 10% FBS o se mantuvieron congeladas en N<sub>2</sub> líquido.

Las líneas celulares linfoblastoides B humanas GU, FV o VR, se obtuvieron en nuestro laboratorio a partir de linfocitos B de sangre periférica humana de individuos sanos transformadas con el virus Epstein Barr (EBV). En algunos experimentos se utilizó la línea celular B de ratón A20, la cual fue obtenida desde American Type Culture Collection (ATCC). Todas las líneas celulares se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 UI/ml de Penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 10% de FBS.

### **Aislamiento de linfocitos**

Las células mononucleares de sangre periférica se obtuvieron por centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque de densidad 1,077 (Sigma-Aldrich) a partir de 450 ml de sangre venosa heparinizada de donadores voluntarios sanos, bajo supervisión médica. Los linfocitos B se obtuvieron a partir de PBMC, los cuales se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 + 2% FBS y se incubaron por 20 minutos a 4°C con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 humano IF-54. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con tampón MACS (PBS + 2 mM EDTA + 5% FBS) centrifugando a 400 x g por 5 minutos. Enseguida se agregaron 14 µl de microesferas anti-IgG de ratón por cada  $1 \times 10^8$  células en 1 ml de tampón MACS y se incubaron por 15 minutos a 4°C con agitación rotatoria. Luego, las células se lavaron una vez con tampón MACS y se resuspendieron a  $1 \times 10^8$  células en 1 ml de tampón MACS y se recolectó la fracción positiva (enriquecida en linfocitos B) y la fracción negativa (depletada de linfocitos B) usando un magneto (VarioMACS) y columnas de selección positiva LS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Los linfocitos T purificados se obtuvieron a partir de PBMC depletados de linfocitos B, que se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 humano OKT3 por 20 minutos a 4°C, seguido de la selección con columnas magnéticas tal como se describió previamente para linfocitos B. La pureza de los linfocitos B fue  $\geq 90\%$  y de los linfocitos T fue  $\geq 91\%$  determinado por citometría de flujo.

Los linfocitos de amígdalas se obtuvieron mediante disgregación mecánica de amígdalas humanas en medio de cultivo RPMI 1640 + 10% FBS. Luego, las células B de amígdala se aislaron mediante selección inmunomagnética tal como se describió previamente para los linfocitos B de sangre periférica. Los linfocitos T derivados de amígdalas se obtuvieron de la fracción negativa, luego de eliminar el remanente de linfocitos B mediante lisis por complemento. Para la lisis por complemento las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C con el anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR humano L243. Después de lavar las células con medio de cultivo RPMI 1640 + 10% FBS, se incubaron con una dilución adecuada de complemento de conejo en medio de cultivo RPMI 1640 + 10% FCS durante 1 hora a 37°C. La pureza de linfocitos B y linfocitos T determinada por citometría de flujo fue  $\geq 90\%$  y  $\geq 98\%$ , respectivamente.

### **Co-cultivos celulares**

Las HUTEc se crecieron en una monocapa confluyente y se co-incubaron con líneas celulares B humanas o de ratón, linfocitos B de sangre periférica, linfocitos T de sangre periférica o linfocitos B derivados de amígdalas. Las HUVEC se crecieron a confluencia y se co-incubaron con linfocitos B de sangre periférica o linfocitos B de amígdalas humanas. Luego de 24, 48 o 96 horas se analizó por citometría de flujo la expresión de moléculas MHC-II en HUTEc o HUVEC o se extrajo RNA total de HUTEc para realizar experimentos de macroarrays y RT-PCR. Antes de la extracción de RNA de las HUTEc se eliminaron los linfocitos B o T de los co-cultivos mediante sucesivos lavados con PBS y lisis por complemento con anticuerpos específicos para los linfocitos B y T. En algunos experimentos se realizaron co-cultivos de HUTEc con una línea linfoblastoide B humana en transwell (Corning Incorporated, Life Sciences, Corning, NY, EEUU) de 12 mm diámetro, el cual contiene membranas de poliéster con poros de 0,4  $\mu\text{m}$ . Las HUTEc se crecieron en la cámara inferior y las células B se agregaron en cámara superior o inferior. Luego de 24 horas de incubación, se analizó por citometría de flujo la expresión de moléculas MHC-II en HUTEc.

### **Análisis de proteoglicanos**

Para determinar los proteoglicanos presentes en superficie de HUTEc y HUVEC, se obtuvieron extractos de proteínas de estas células después de la lisis durante 30 minutos a 4°C con el tampón que contenía Tris (pH 7,4) 50 mM, NaCl 100 mM, Tritón X-100 0,5% e inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, aprotinina 1%, leupeptina 1  $\mu\text{g/ml}$ , pepstatina 1  $\mu\text{g/ml}$ , vanadato de sodio 1mM). Enseguida, el extracto se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C, se recuperó la fracción soluble en Tritón y el precipitado (fracción insoluble en Tritón). El precipitado se homogeneizó en guanidina-HCl 4M, acetato de sodio (pH 5,8) 50 mM y Tritón X-100 0,2% durante 18 horas a 4°C con agitación constante. Luego, el homogeneizado en guanidina se calentó a 100°C por 5 minutos y se dializó contra tampón de lisis. Las fracciones se digirieron con 0,3 mU de heparitinasa III durante 18 horas a 37°C y se analizaron por SDS-PAGE usando un gel de gradiente de 4-13% de acrilamida. Las proteínas se transfirieron por electroforesis a una membrana de nitrocelulosa, la cual se incubó con el anticuerpo primario anti-stub humano, luego con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, seguido de la detección quimioluminiscente usando peróxido de hidrógeno como sustrato. Las señales

quimioluminiscentes se detectaron en Hyperfilm ELC (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Inglaterra).

### **Citometría de flujo**

La expresión de moléculas de superficie se determinó mediante análisis por citometría de flujo, para lo cual se utilizaron diferentes combinaciones de anticuerpos. Para detectar moléculas MHC-II, las HUTEc no tratadas y tratadas con IFN- $\gamma$ , células B (humanas o de ratón) o células T, se incubaron con el anticuerpo monoclonal L243 (anti-HLA-DR) o MKD6.3 (anti-I-A<sup>d</sup>) durante 20 minutos a 4°C. Después, se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-ratón hecho en cabra conjugado a FITC, y finalmente con el anticuerpo monoclonal CD13 PE que se usó sólo a las células endoteliales. En algunos experimentos, las HUTEc y HUVEC se marcaron directamente con anticuerpos conjugados, anti-HLA-DR PE y CD13 FITC. Además, las células endoteliales se marcaron con yoduro de propidio, para descartar células muertas. Los linfocitos recién aislados o transmigrados, se incubaron durante 20 minutos a 4°C en oscuridad con anticuerpos conjugados directamente con un fluorocromo, diluidos en medio de cultivo RPMI 1640 + 2% FBS. En los casos en que se determinó CCR7, se realizaron tres incubaciones distintas: primero, las células se incubaron con el anticuerpo purificado anti-CCR7 hecho en rata; segundo, se incubaron con un anticuerpo anti-rata conjugado con biotina y; tercero, se incubaron con estreptavidina-PE. Todos los anticuerpos se utilizaron a la dilución apropiada previamente determinada por citometría de flujo. Luego de incubar con los anticuerpos, las células se lavaron con medio de cultivo RPMI 1640 + 2% FBS y finalmente se resuspendieron en PBS + 2% FBS. La fluorescencia se determinó utilizando un citómetro de flujo FACScan (Becton & Dickinson, EEUU) y el programa WinMDI versión 2.8. Para algunos ensayos de trans migración se utilizó un citómetro de flujo CyAn (Dako, Colorado, EEUU) y el programa Summit versión 4.3 (Dako, Colorado, EEUU).

### **Análisis de macroarrays**

Para los experimentos de macroarrays se realizaron las siguientes etapas: extracción de RNA, síntesis de cDNA, síntesis de cRNA, purificación del cRNA, hibridación de cRNA a membranas y detección quimioluminescente.

Extracción del RNA total: El RNA total se aisló de HUTEK no tratadas o tratadas durante 24 horas con 500 U/ml de IFN- $\gamma$ , linfocitos B de sangre periférica, linfocitos B de amígdalas o linfocitos T de sangre periférica. El RNA se extrajo según protocolo del kit de aislamiento de RNA total ArrayGrade<sup>TM</sup> (SuperArray, Bioscience Corporation, Frederick, MD, EEUU). Este kit incluye los siguientes reactivos: tampón de lisis y unión (G6), tampón *desalting* (G15), tampón de pre-lavado (G16) y tampón de lavado (G17). Primero, se agregó al precipitado celular el tampón G6, se traspasó a una columna filtrante y se centrifugó a 11.000 x g por 1 minuto. Luego, se agregó al filtrado etanol 70%, se traspasó a una columna y se centrifugó a 8.000 x g por 30 segundos. Luego, a la columna se agregó el tampón G15, se centrifugó a 11.000 x g durante 1 minuto. Posteriormente, se realizó un pre-lavado del RNA total usando el tampón G16, seguido del lavado usando el tampón G17. Finalmente, se agregó a la columna 50  $\mu$ l de agua libre de RNasa, se centrifugó a 11.000 x g durante 1 minuto y se recuperó el fluido que contiene el RNA total. El RNA se cuantificó determinando la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro 6405 UV/Vis (Jenway) y la calidad se determinó en un gel de agarosa al 0,8% que contiene bromuro de etidio.

Síntesis de cDNA y síntesis de cRNA: Los reactivos G1, G2, G3, G24, G25 y RI forman parte del kit TrueLabeling-AMP<sup>TM</sup> 2.0 (SuperArray, Bioscience Corporation, Frederick, MD, EEUU). A continuación se describe brevemente el protocolo utilizado sugerido por los fabricantes del kit. Se utilizaron 3  $\mu$ g de RNA total, el cual se incubó con el componente G1 y agua libre de RNasa a 70°C durante 10 minutos. Luego, se agregaron 10  $\mu$ l de una mezcla que contiene: tampón de síntesis de cDNA (G3), inhibidor RNasa (RI) y enzima de síntesis de cDNA (G2). La reacción se realizó en un termociclador (MJ Research) durante 50 minutos a 42°C, seguido por 5 minutos a 75°C, dejando enfriar a 37°C. Posteriormente, se agregaron 20  $\mu$ l de una mezcla de amplificación que contiene: tampón RNA polimerasa (G24), 1 mM biotina-11-UTP (PerkinElmer, Boston, MA, EEUU) y enzima RNA polimerasa (G25). La reacción se incubó 12 horas a 37°C. Finalmente, se realizó la purificación del cRNA según protocolo del kit de limpieza cRNA (SuperArray, Bioscience Corporation, Frederick, MD, EEUU), para lo cual se agregó 60  $\mu$ l de agua libre de RNasa, 350  $\mu$ l de tampón de lisis y unión (G6) y 350  $\mu$ l de etanol 100%, seguido de traspaso de la muestra a una columna y se centrifugó 30 segundos a 8.000 x g. Se agregó a la columna 50  $\mu$ l de agua libre de RNasa, se centrifugó 1 minuto a 8.000 x g y

recuperó el fluido que contiene el cRNA purificado de nucleótidos no incorporados en reacción de amplificación. El cRNA se cuantificó determinando la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro 6405 UV/Vis (Jenway).

Hibridación del cRNA: La hibridación fue desarrollada en 128 sitios (3 blancos, 5 negativos, 8 genes de expresión constitutiva (*housekeeping genes*) y 112 genes humanos relacionados a quimioquinas) en una membrana de nylon Oligo GEArray Human OHS-022 (SuperArray, Bioscience Corporation, Frederick, MD, EEUU). La membrana se incubó con 2 µg de cRNA biotinilado en solución de hibridación GEArray (SuperArray, Bioscience Corporation, Frederick, MD, EEUU) durante 16 horas a 60°C, con agitación suave entre 5-10 rpm en horno de hibridación. Después del lavado de la membrana, ésta se bloqueó con la solución Q GEArray blocking (SuperArray, Bioscience Corporation, Frederick, MD, EEUU) durante 40 minutos a temperatura ambiente. Luego, se incubó con estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina durante 10 minutos, seguido de la detección quimioluminiscente con el sustrato CDP-star (SuperArray, Bioscience Corporation, Frederick, MD, EEUU). Las señales quimioluminiscente se detectaron en Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Inglaterra) y se importó la imagen en formato TIFF. Las señales se cuantificaron usando el programa GEArray Expression Analysis Suite (SuperArray, Bioscience Corporation, Frederick, MD, EEUU). Para esto la señal de cada gen se expresó como un nivel de expresión relativo, la señal densitométrica se corrigió restando el ruido de fondo y luego, se normalizó con respecto al gen de expresión constitutiva (*housekeeping genes*) y finalmente, se dividió por el valor corregido del control (HUTEC no tratadas).

### **Análisis de RT-PCR**

El RNA total ya sea de células HUTEC no tratadas o tratadas durante 24 horas con 500 U/ml de IFN- $\gamma$ , linfocitos B de sangre periférica, linfocitos B de amígdalas o linfocitos T de sangre periférica, se extrajo mediante el uso de TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Brasil), seguido de cloroformo. El RNA se precipitó con isopropanol a 20°C, luego se lavó con etanol 75% se secó al aire y resuspendió en 20 µl de agua libre de RNasa. La calidad del RNA se determinó en gel de agarosa al 0,8% con bromuro de etidio y se cuantificó determinando la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro 6405 UV/Vis (Jenway).

La síntesis de cDNA se realizó por transcripción inversa incubando 2 µg de RNA total, 500 ng de oligonucleótido poli-dT (Invitrogen Life Technologies, Brasil) durante 10 minutos a 70°C. Luego, se agregaron 8 µl de una mezcla que contiene: dNTPs 1,5 mM, 5 µl tampón de reacción (Tris-HCl (pH 8,3) 250 mM, KCl 375 mM, MgCl 15 mM, DTT 50 mM), 24 U de inhibidor de ribonucleasas (Promega, Madison, WI, EEUU) y 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI, EEUU). La reacción se realizó en un termociclador (MJ Research) durante 1 hora a 42°C, seguido de 15 minutos a 70°C.

La reacción de PCR se realizó con 2 µl de cDNA y 23 µl de una mezcla de reacción que contiene: MgCl<sub>2</sub> 1,63 mM (excepto para CCL7, en que se utilizó 5,43 mM), 200 µM de cada dNTP, 2,5 µl tampón de reacción (Tris-HCl (pH 8,4) 200 mM, KCl 500 mM), 8 ng/ml de cada partidor sentido y antisentido, y 1,25 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen Life Technologies, Brasil). Los partidores usados para la amplificación de β-actina, CD19, HLA-DR [Koppelman y cols., 1990], CCL3, CCL5, CCL25, CCL28, CXCL12 [Hanamoto y cols., 2004], CCL7 [Powell y cols., 1996] fueron los que se indican en la tabla 3:

**TABLA 3.** Lista de partidores utilizados para análisis de RT-PCR

Gen	Secuencia nucleotídica de partidores	Tamaño del producto PCR
β-actina sentido	5'-AAA-TCG-TGC-GTG-ACA-TTA-AGG-3'	406 bp
β-actina antisentido	5'-CCG-ATC-CAC-ACG-GAG-TAC-TT-3'	
CD19 sentido	5'-CCC-CGC-TTA-AAC-CCT-TCT-TA-3'	755 bp
CD19 antisentido	5'-AAG-GGA-ACA-CAG-GCA-GAA-GA-3'	
HLA-DRA sentido	5'-CTG-ACT-CCC-AAC-AGA-GCG-CCC-3'	633 bp
HLA-DRA antisentido	5'-TGC-TTG-AGA-AGA-GGC-TCA-TCC-3'	
CCL3 sentido	5'-GCC CGG TGT CAT CTT CCT AAC CAA GC-3'	353 bp
CCL3 antisentido	5'-AGG GGA CAG GGG AAC TCT CAG AGC AA-3'	
CCL5 sentido	5'-CCC CGT GCC CAC ATC AAG GAG TAT TT-3'	313 bp
CCL5 antisentido	5'-CGT CCA GCC TGG GGA AGG TTT TTG TA-3'	
CCL7 sentido	5'-CAA ACT GGA CAA GGA GAT CTG TGC-3'	381 bp
CCL7 antisentido	5'-ATG AGG TAG AGA AGG GAG GAG CAT-3'	
CCL25 sentido	5'-CCA AGG TGT CTT TGA GGA CTG CTG CC-3'	356 bp
CCL25 antisentido	5'-GGG AGA CAT TCC TCT TGC TGC TGC TG-3'	
CCL28 sentido	5'-AGA AGC CAT ACT TCC CAT TGC-3'	208 bp
CCL28 antisentido	5'-AGC TTG CAC TTT CAT CCA CTG-3'	
CXCL12 sentido	5'-CCC TCT GTG AGA TCC GTC TTT GGC CT-3'	302 bp
CXCL12 antisentido	5'-TCT GAT TGG AAC CTG AAC CCC TGC TG-3'	

Las mezclas de reacción se sometieron a diferentes programas de amplificación en un termociclador (MJ Research). Para amplificar  $\beta$ -actina se utilizó un programa con un ciclo de 5 minutos a 94°C y 20 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C y 90 segundos a 72°C. Para amplificar CD19 se utilizó el programa de un ciclo de 5 minutos a 95°C y 35 ciclos de 1 minuto a 94°, 1 minuto a 60°C y 2 minutos a 72°C. Para amplificar HLA-DRA se utilizó un programa de un ciclo de 5 minutos a 94°C y 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C y 2 minutos a 72°C. Para amplificar CCL3, CCL25, CCL28, CXCL12 se utilizó el siguiente programa: un ciclo de 5 minutos a 94°C y 34 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C. Para CCL5 se utilizó un programa de un ciclo de 5 minutos a 94°C y 28 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C. Para amplificar CCL7 se utilizó el programa siguiente: un ciclo de 5 minutos a 94°C y 35 ciclos de 1 minuto 94°C, 1 minuto a 60°C y 1 minuto a 72°C. Todos los programas se terminaron con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 1,4% con bromuro de etidio y se fotografió con una cámara digital KodaK (DC 120). La cuantificación de las bandas se realizó con el programa Scion Image.

### **Ensayos de Transmigración “*in vitro*”**

Los experimentos de trans migración se realizaron usando monocapas confluentes de HUTEc crecidas en Transwell (diámetro 12 mm), que contienen membranas de policarbonato con poros de 3,0  $\mu$ m (Corning Incorporated, Life Sciences, Corning, NY, EEUU). Los ensayos de trans migración de linfocitos T se realizaron sobre HUTEc no tratadas o tratadas con 500 U/ml IFN- $\gamma$ ,  $3 \times 10^6$  líneas linfoblastoides B humanas,  $3 \times 10^6$  linfocitos B de sangre periférica o  $3 \times 10^6$  linfocitos B de amígdalas durante 18-24 horas. Pevio a la incubación con los linfocitos T, las células B se retiraron con lavados sucesivos con medio de cultivo RPMI 1640 sin suero, y en algunos casos se recuperó el sobrenadante para ser usado como medio condicionado en otros experimentos. Posteriormente, se agregaron  $2-6 \times 10^6$  linfocitos T de sangre periférica en medio de cultivo RPMI 1640 + 10% FBS o en medio condicionado. Luego de 18-24 horas, las células T transmigradas se recuperaron desde la cámara inferior, se contaron y caracterizaron mediante citometría de flujo.

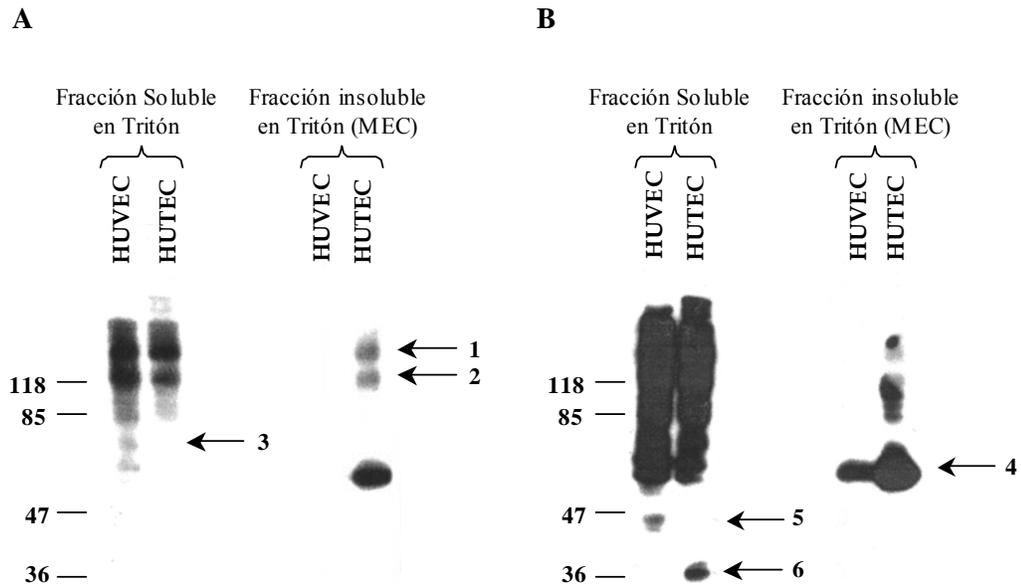
### **Análisis estadístico**

Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se muestran como figuras representativas o como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Los datos se analizaron utilizando un *test* de ANOVA no pareado para determinar la significancia estadística de los resultados, considerándose como significativo un  $p < 0,05$ . Para los análisis estadísticos y confección de los gráficos se utilizó el software GraphPad Prism versión 4 (GraphPad Software, Inc., EEUU).

## RESULTADOS

### Caracterización de las células endoteliales

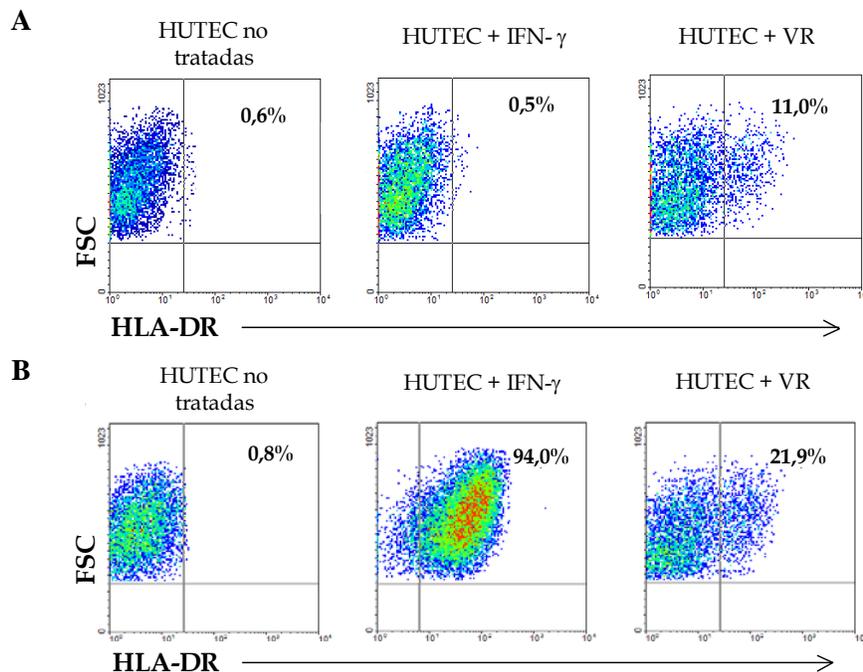
Las células endoteliales provenientes de amígdalas (HUTEC) y de cordón umbilical (HUVEC) humanas se caracterizaron en cuanto al patrón de proteoglicanos que ellas expresan. Los proteoglicanos en las células endoteliales tienen importancia en la modulación de procesos inmune, debido a la interacción con diversas proteínas entre las cuales encontramos a las quimioquinas [Handel y cols., 2005]. Mediante SDS-PAGE determinamos diferencias en la expresión de proteoglicanos entre las distintas células endoteliales, HUTEC y HUVEC (Figura 2). Estos resultados indican que las HUTEC expresan sindecan-3, -4 y glipican, mientras que las HUVEC expresan sindecan-1, -2, -3 y glipican. Esta variedad de proteoglicanos nos permite confirmar que las preparaciones utilizadas en este trabajo corresponden a células endoteliales columnares (HUTEC) y vasculares (HUVEC), respectivamente.



**Figura 2. Las células endoteliales expresan un patrón diferencial de proteoglicanos.** Los proteoglicanos de células endoteliales se analizaron mediante la técnica de SDS-PAGE, los cuales se detectaron por quimioluminiscencia usando anticuerpos anti-stub. (A) Tiempo de exposición 5 minutos, (B) tiempo de exposición 20 minutos. Los proteoglicanos encontrados son: 1) PM 135,9 (sindecan-3), 2) PM 118,7 (no identificado, posiblemente perlecan), 3) PM 78,6 (sindecan-1), 4) PM 68,0 (glipican), 5) PM 46,5 (sindecan-2), 6) PM 36,0 (sindecan-4)

### Las células endoteliales de amígdalas co-cultivadas con linfocitos B adquieren moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II)

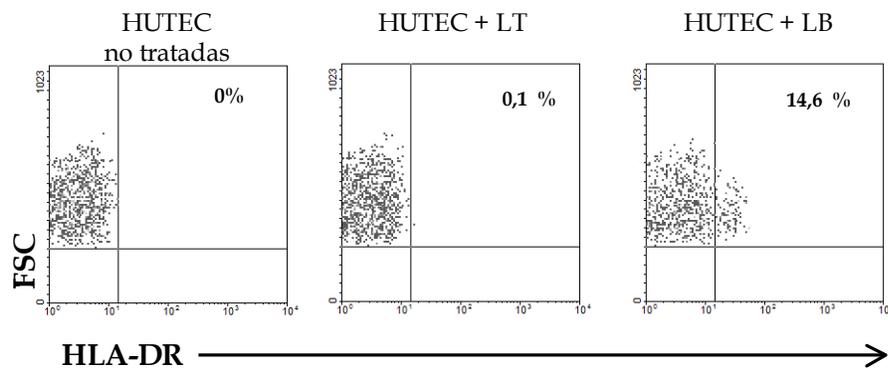
Diversos estudios han determinado que las células endoteliales tienen la capacidad de activar células T mediante presentación antigénica [Geppert y cols., 1985; Savage y cols., 1995; Marelli-Berg y cols., 1999]. Las células endoteliales estimuladas con IFN- $\gamma$  inducen la expresión *de novo* de moléculas MHC-II, principalmente HLA-DR [Lapierre y cols., 1988], siendo capaces de inducir la proliferación de LT CD4+ específicos de antígenos [Savage y cols., 1995; Kreisel y cols., 2004]. Además, se ha observado que el reconocimiento del antígeno presentado por células endoteliales influye en la trans migración de células T, facilitando el reclutamiento de células específicas de antígeno [Marelli-Berg y cols., 1999]. Estas evidencias nos llevaron a estudiar la expresión de las moléculas MHC-II, HLA-DR, en HUTEc co-cultivadas con células B por 24 y 96 horas. Después del tiempo de incubación, analizamos la presencia de la molécula HLA-DR en la superficie de las HUTEc mediante citometría de flujo. Para evaluar la expresión de



**Figura 3. Las células endoteliales de amígdalas co-cultivadas con líneas celulares B presentan moléculas MHC-II.** Las HUTEc no tratadas (panel izquierdo), tratadas con 500 U/ml IFN- $\gamma$  (panel central) o coincubadas con la línea celular VR (panel derecho) fueron cultivadas durante 24 horas (A) o 96 horas (B). Después del tiempo determinado, la expresión de MHC-II se analizaron por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-HLA-DR. Las células endoteliales se analizaron en una región correspondiente a células CD13+ vivas. Gráficos de densidad representativos de tres experimentos independientes.

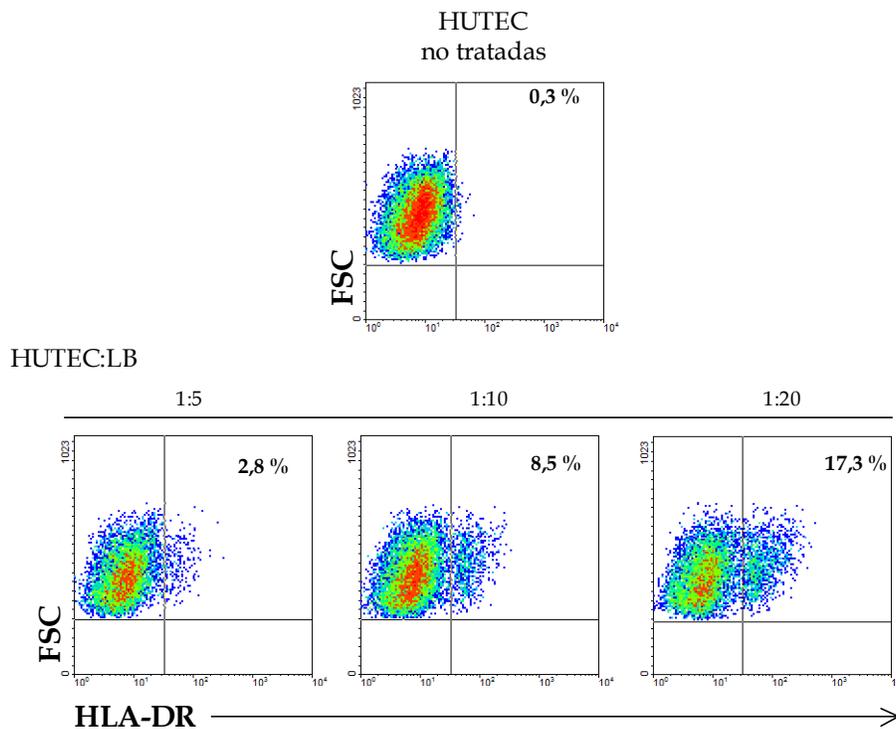
moléculas MHC-II en HUTEc, las células endoteliales se identificaron por la expresión del marcador de superficie CD13, descartando células muertas. Utilizamos como control positivo de la expresión de HLA-DR, HUTEc tratadas con 500 U/ml de IFN- $\gamma$ . Las HUTEc co-cultivadas con la línea celular linfoblastoide VR expresan moléculas MHC-II en la superficie de HUTEc (Figura 3). A las 24 horas de co-incubación, un 11% de de las HUTEc expresan moléculas HLA-DR (Figura 3A), este porcentaje varía entre un 7,4-13,4% según las diferentes líneas celulares B utilizadas y el pasaje en que se encuentran las células endoteliales. La figura 3B muestra que existe un mayor porcentaje de expresión de moléculas MHC-II en HUTEc co-cultivadas con líneas B después de 96 horas (Figura 3B). IFN- $\gamma$  induce claramente la expresión de MHC-II en HUTEc después de las 24 horas de incubación en la totalidad de las células endoteliales a diferencia de lo que ocurre con la adhesión de células B.

Por otra parte, se analizó la expresión de moléculas HLA-DR en HUTEc co-incubadas con linfocitos (LB) o linfocitos T (LT) alogénicos purificados de sangre periférica, para evaluar si la expresión de MHC-II corresponde a un efecto sólo de las líneas celulares B. Como muestra la figura 4 las HUTEc co-cultivadas con LB expresan moléculas HLA-DR en su superficie en un 14,6%, en cambio, no se observa expresión de MHC-II en HUTEc co-incubadas con LT. Este resultado demuestra que la expresión de MHC-II en la superficie de las HUTEc ocurre sólo con contacto de células B, pero no de células T.



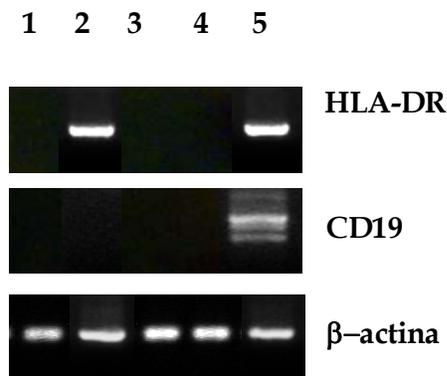
**Figura 4. La adhesión de linfocitos B, pero no de linfocitos T, induce la expresión de moléculas MHC-II en la superficie de las células endoteliales de amígdalas.** Las HUTEc se co-cultivaron durante 24 horas con LB o LT alogénicos purificados de sangre periférica. La expresión de moléculas de HLA-DR en HUTEc se analizaron por citometría de flujo, en una región correspondiente a células CD13+ vivas.

Además, investigamos si la expresión de MHC-II en la superficie de las HUTEc depende de la cantidad de células B presentes, para lo cual las HUTEc se co-cultivaron durante 24 horas con diferentes cantidades de LB alogénicos purificados de sangre periférica. Las razones utilizadas en estos experimentos fueron de 1:5, 1:10 y 1:20 (HUTEc:LB). Observamos en la figura 5 un incremento del porcentaje de moléculas HLA-DR en HUTEc a la razón 1:20, lo cual indica que la expresión de MHC-II en HUTEc es proporcional al número de células B, pero no se logra que el total de las HUTEc presenten moléculas MHC-II, ni siquiera con un tiempo de incubación mayor como es en el caso cuando las HUTEc se tratan con IFN- $\gamma$ . Este representa un argumento para descartar que se esté produciendo IFN- $\gamma$  en el co-cultivo entre HUTEc y linfocito B.



**Figura 5. La expresión de MHC-II en células endoteliales de amígdalas depende de la razón célula endotelial/linfocito B.** Análisis por citometría de flujo de la expresión de moléculas MHC-II en HUTEc no tratadas (panel de arriba) y co-cultivadas con LB humanos alogénicos purificados de sangre periférica (paneles de abajo) durante 24 horas. Las células endoteliales se analizaron en una región de células CD13+ vivas. Los gráficos de densidad en los paneles de abajo, de izquierda a derecha, muestran un aumento en el porcentaje de HUTEc que presentan moléculas HLA-DR en la superficie, en las razones 1:5, 1:10 y 1:20 HUTEc:LB.

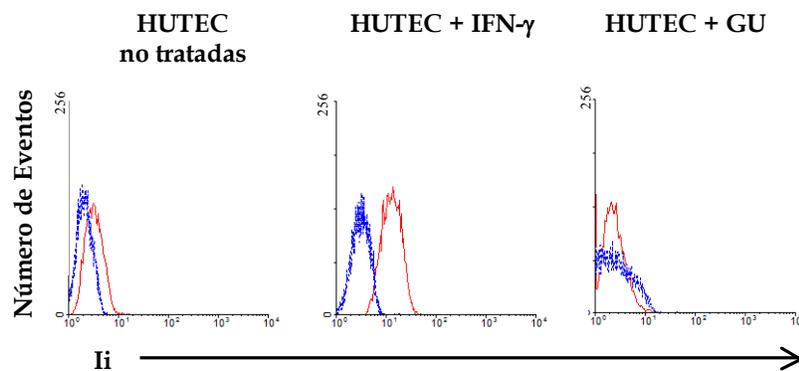
Para determinar si la expresión de moléculas MHC-II en HUTEc es inducida a nivel transcripcional, las HUTEc activadas con LB de sangre periférica por 24 horas se purificaron después de la lisis por complemento de los LB y se analizó la expresión del mRNA de HLA-DR en HUTEc mediante RT-PCR. En la figura 6 no se observa expresión de mRNA de MHC-II en HUTEc después del contacto con LB, lo que indica que las moléculas HLA-DR en HUTEc no son inducidas a nivel transcripcional. Por lo tanto, las HUTEc co-cultivadas con células B no expresan moléculas MHC-II a nivel del mRNA, pero sí presentan estas moléculas en su superficie.



**Figura 6. La adhesión de linfocitos B a células endoteliales no induce la transcripción del mRNA de las moléculas MHC-II.** Análisis por RT-PCR del mRNA de HLA-DR en HUTEc no tratadas (carril 1), tratadas durante 24 horas con IFN- $\gamma$  (carril 2), co-cultivadas con LB humanos alogénicos purificados de sangre periférica (carril 3) y co-cultivadas con LB humanos alogénicos purificados de amígdalas (carril 4). Las HUTEc co-incubadas con LB se purificaron eliminando LB mediante la técnica de lisis por complemento. Además, utilizamos una línea celular B linfoblástide (GU) como control positivo de CD19 (carril 5). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

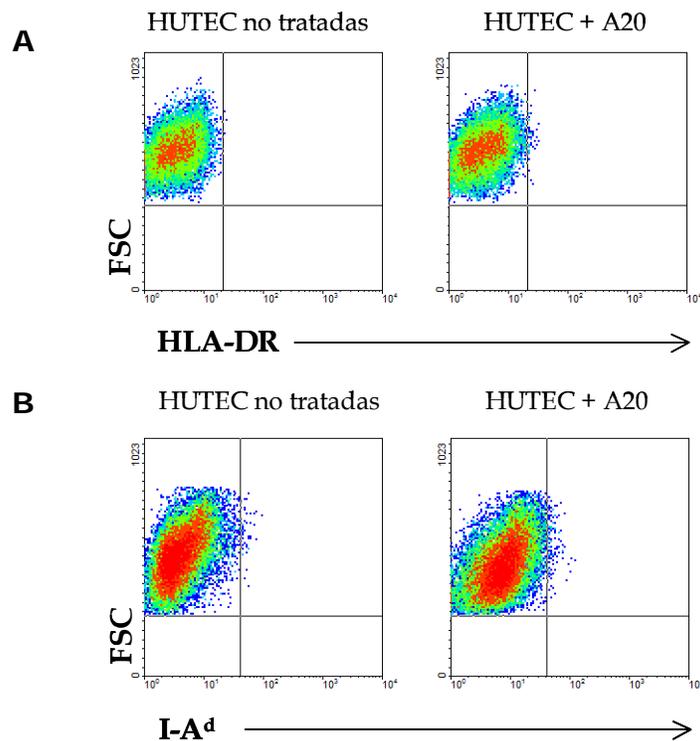
Puesto que las moléculas MHC-II se transcriben en forma coordinada con otros isotipos de moléculas MHC-II y también con moléculas relacionadas a la biosíntesis de las moléculas MHC-II, determinamos mediante análisis de citometría de flujo la presencia de la cadena invariante (Ii), la cual debería encontrarse en el citoplasma de las células. Al permeabilizar HUTEc tratadas 48 horas con IFN- $\gamma$  o con células B (Figura 7), observamos que sólo el IFN- $\gamma$  es

capaz de inducir la expresión de Ii en el citoplasma. Nosotros observamos (datos no mostrados) que luego de 24 horas de tratamiento, las HUTEc estimuladas con IFN- $\gamma$  no expresan moléculas MHC-II en la superficie ni Ii en el citoplasma, al igual que las co-incubadas con células B. Estos resultados nos sugieren fuertemente que la presencia de moléculas MHC-II en HUTEc podría estar ocurriendo por traspaso de membranas desde las células B.



**Figura 7. Expresión de la cadena invariante (Ii) en células endoteliales de amígdalas.** Análisis por citometría de flujo de cadena invariante (Ii) en HUTEc no tratadas (azul), tratadas con IFN- $\gamma$  o co-cultivadas con GU (rojo) durante 48 horas. La expresión de Ii en HUTEc se determinó utilizando el anticuerpo Pin1 (anti-Ii citoplasmática) en una región de células CD13+.

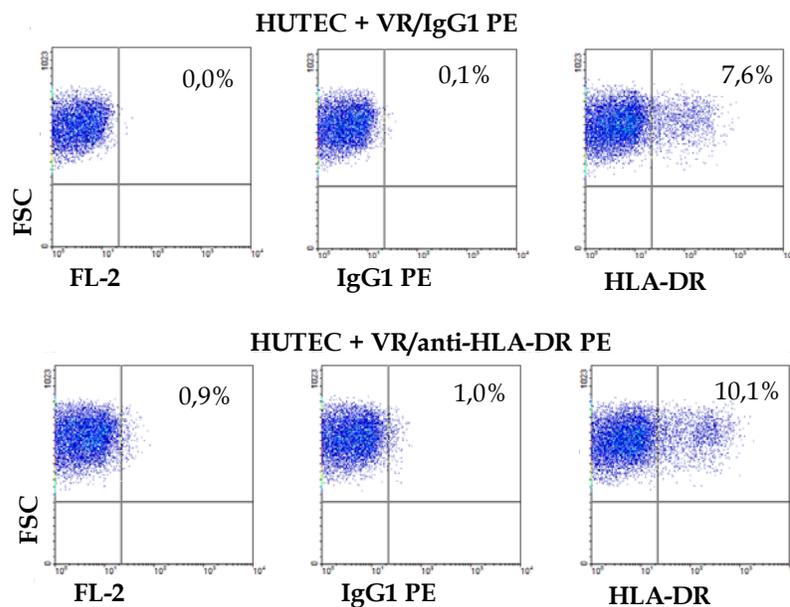
Para evaluar si la expresión de moléculas MHC-II en superficie de HUTEc es un fenómeno especie-específico, se realizaron co-cultivos durante 24 horas de HUTEc con una línea celular B (A20) derivada de ratón y se evaluó la presencia de moléculas MHC-II humanas HLA-DR y de ratón I-A<sup>d</sup> (Figura 8) en la superficie de HUTEc. Los resultados muestran que las HUTEc co-cultivadas con células A20 no presentan moléculas HLA-DR (Figura 8A) ni moléculas I-A<sup>d</sup> (Figura 8B), lo cual indica que las HUTEc presentan moléculas MHC-II sólo si se adhieren células B humanas, pero no células B murinas, demostrando que este fenómeno es especie-específico.



**Figura 8. La adhesión de linfocitos B de ratón a células endoteliales humanas no produce la expresión de moléculas MHC-II.** Análisis por citometría de flujo de la expresión de moléculas MHC-II en HUTEc no tratadas o co-cultivadas con una línea celular murina A20 durante 24 horas. Las células endoteliales se analizaron en una región de células CD13+ y vivas. **(A)** Expresión de moléculas HLA-DR en HUTEc **(B)** Expresión de moléculas MHC-II provenientes de células B de ratón.

En la literatura se ha descrito que las células son capaces de transferir moléculas o membranas a otras células mediante diversos mecanismos, incluyendo la liberación de exosomas [Raposo y cols., 1996] o transferencia intercelular de fragmentos de membrana [Poupot y cols., 2003]. Con el objetivo de determinar el mecanismo mediante el cual se estaría produciendo la transferencia de moléculas MHC-II a las células endoteliales, realizamos un co-cultivo por 24 horas de HUTEc con la línea celular B humana (VR) previamente marcadas con anticuerpos anti-HLA-DR PE o control de isotipo anti-IgG1 PE (Figura 9). Luego del tiempo de incubación, se eliminaron los LB por lavados y se tripsinizaron las HUTEc, las cuales fueron analizadas por citometría de flujo sin realizar ningún marcaje fluorescente. Al mismo tiempo se analizó la fluorescencia de los LB del co-cultivo observándose que estos eran positivos para HLA-DR para

todos los tiempos estudiados, aunque la intensidad media de fluorescencia decayó levemente en el tiempo. Las células endoteliales no presentaron fluorescencia, ya sea que fueron co-cultivadas con VR/anti-IgG1 PE o con VR/anti-HLA-DR PE (Figura 9, paneles izquierdos). Estas mismas células endoteliales fueron marcadas enseguida con anti-HLA-DR PE obteniéndose una población de células marcadas (Figura 9, paneles derechos). Este resultado muestra que las células endoteliales adquieren las moléculas MHC-II de los LB, pero que estas no provienen de un traspaso directo desde la membrana plasmática, sino más bien de un traspaso de vesículas tipo exosomas del interior de los LB.

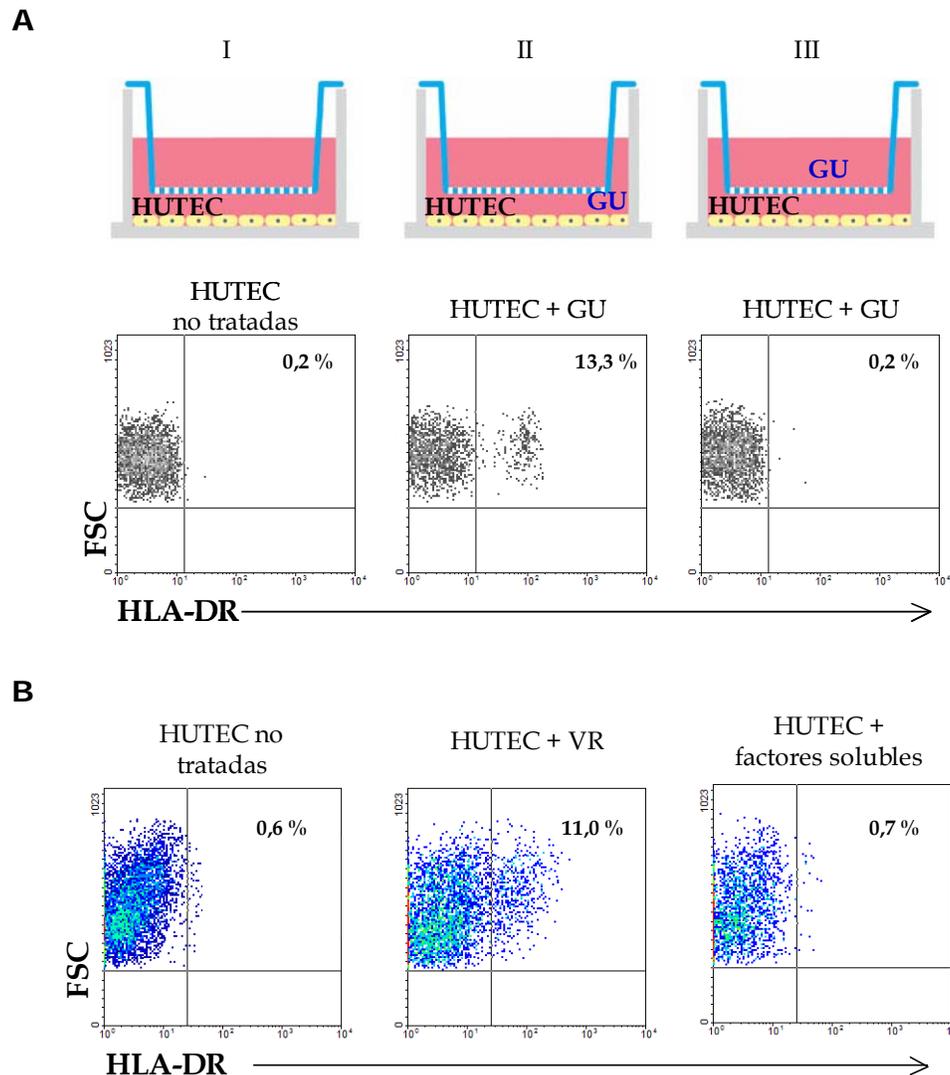


**Figura 9. Las moléculas MHC-II presentes en las células endoteliales de amígdalas no provienen de la membrana plasmática de las células B.** Mediante citometría de flujo se analizó la expresión de moléculas HLA-DR, utilizando un anticuerpo anti-HLA-DR PE y las células endoteliales se determinaron por una región de células CD13+ vivas. La línea celular B (VR) fue marcada con anticuerpos anti-HLA-DR PE o anti-IgG1 PE (control de isotipo). Luego, se co-cultivaron con HUVEC por 24 horas. Se analizaron las HUVEC sin marcar (paneles izquierdos), marcado con control de isotipo o anti-HLA-DR PE (paneles centrales y derechos, respectivamente).

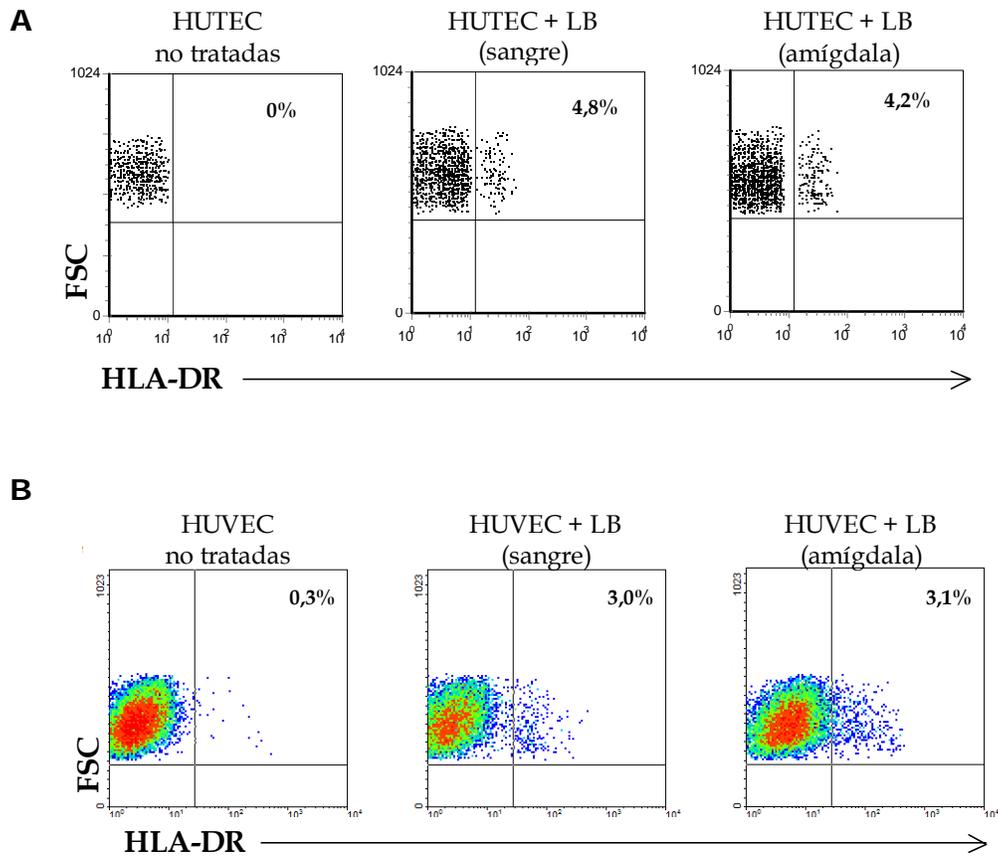
Con el fin de aclarar este punto, diseñamos experimentos para determinar si la presencia de moléculas MHC-II en la superficie de las células HUVEC depende también de factores solubles secretados como producto de la adhesión de células B a HUVEC o depende solamente de la interacción célula endotelial- célula B. Para esto se realizaron cultivos en transwell con poros de

0,4  $\mu\text{m}$ . Como muestra la figura 10A, en los cultivos de HUTEc que no tienen contacto con células B, no se observan moléculas HLA-DR en HUTEc, demostrando que la presencia de moléculas MHC-II en las células endoteliales es dependiente del contacto con las células B. Por otro lado, analizamos el efecto de factores solubles producidos durante la interacción de las células endoteliales con los LB mediante citometría de flujo. Para ello las células HUTEc se cultivaron durante 24 horas con células B (línea celular VR) o con el sobrenadante producido durante la interacción por 24 horas de HUTEc y células B. No se observa moléculas MHC-II en HUTEc incubadas con los sobrenadantes del co-cultivo (Figura 10B), lo cual nos indica que este fenómeno es independiente de factores solubles secretados por células HUTEc o células B durante el contacto. Por lo tanto, estos resultados confirman que la presencia de moléculas MHC-II en HUTEc depende de la adhesión de las células B, y es independiente de factores solubles producidos durante la interacción.

Enseguida nos preguntamos si este fenómeno de traspaso de moléculas MC-II ocurría en otros tipos de células endoteliales como las células endoteliales vasculares producidas a partir de cordón umbilical (HUVEC). En estos experimentos evaluamos adicionalmente si LB de sangre periférica u obtenidos de amígdalas eran capaces de reproducir nuestras observaciones. Por lo tanto, se co-incubaron LB alogénicos purificados de sangre periférica y de amígdalas humanas con HUTEc y HUVEC durante 24 horas, y analizamos por citometría de flujo la expresión de moléculas HLA-DR en las células endoteliales. La figura 11 muestra la presencia de moléculas HLA-DR en la superficie tanto de HUTEc como de HUVEC después del contacto con los LB, provengan estos de sangre periférica como de amígdalas, con porcentajes relativamente similares. Esto indica que el fenómeno estudiado ocurriría de manera general.



**Figura 10. Las moléculas MHC-II presentes en las células endoteliales de amígdalas dependen del contacto con las células B.** Mediante citometría de flujo se analizó la presencia de moléculas HLA-DR utilizando un anticuerpo monoclonal L243. Las células endoteliales se analizaron en una región de células CD13+ vivas. **(A)** En cámara inferior, las HUTEc se crecieron a confluencia y se cultivaron en presencia o ausencia de células B durante 24 horas. En **(I)** las HUTEc se cultivaron con medio de cultivo, en **(II)** las HUTEc se co-cultivaron con la línea celular B GU en el mismo pozo y en **(III)** las HUTEc se cultivaron en pozo inferior y GU en pozo superior. **(B)** HUTEc no tratadas, co-cultivadas por 24 horas con línea celular B VR o tratadas con factores solubles (sobrenadante derivado de HUTEc co-cultivadas con células B durante 24 horas).

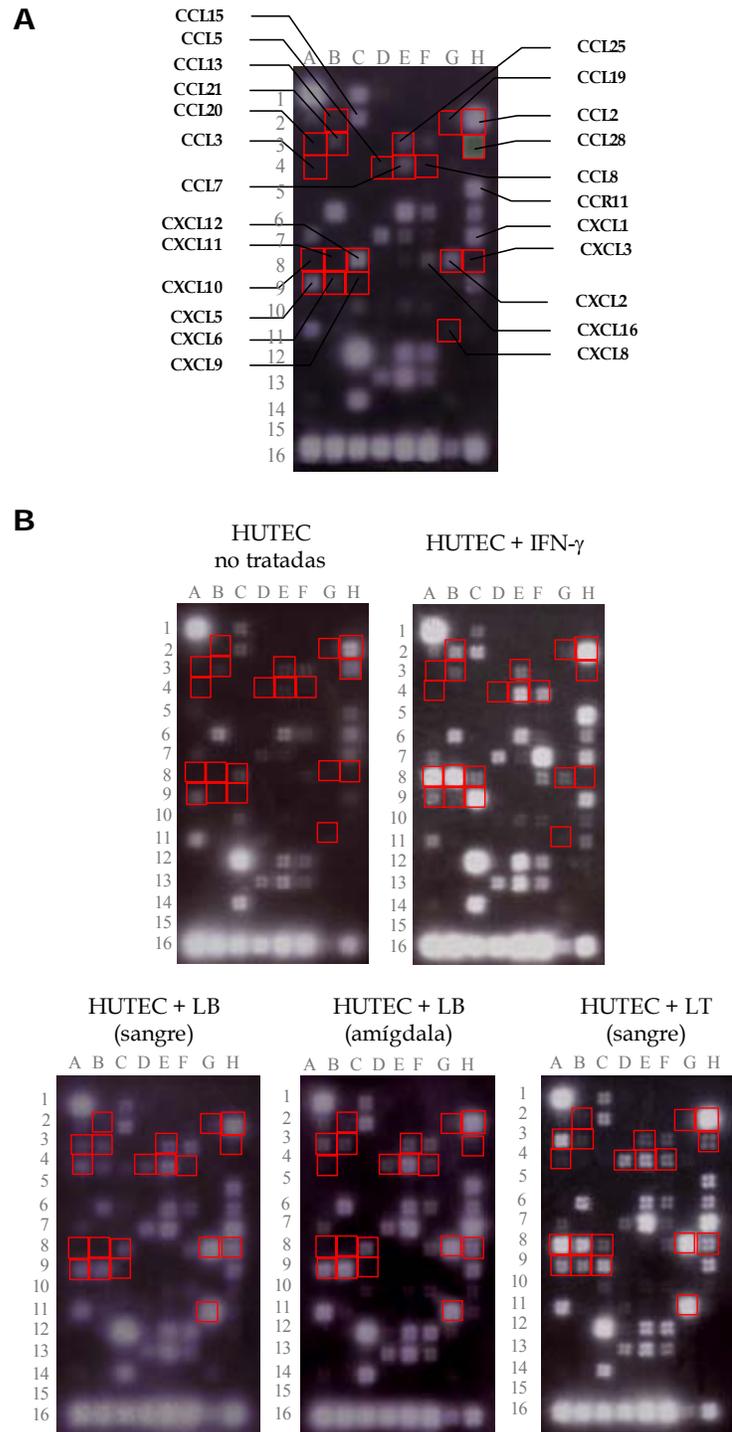


**Figura 11. La adquisición de moléculas MHC-II en células endoteliales producida por la adhesión de linfocitos B es un fenómeno general en los endotelios.** Co-cultivos de células endoteliales con LB alogénicos purificados de sangre periférica (**A**) o con LB derivados de amígdala humana (**B**) por 24 horas. Las células endoteliales se analizaron en una región para células CD13+ vivas con anticuerpos anti-HLA-DR.

### **La adhesión de linfocitos B a células endoteliales de amígdalas humanas inducen un patrón de expresión diferencial de quimioquinas**

Existen evidencias que las células endoteliales expresan constitutivamente quimioquinas [Reyes y cols., 2002; Palmeri cols., 2004] y que bajo condiciones inflamatorias cambian su patrón de expresión, el cual depende del tipo de mediadores involucrados [Meissner y cols., 2003; Marfaing-Koka y cols., 1995; Indraccolo y cols., 2007; Imaizumi y cols., 1997]. Además, se ha descrito que las quimioquinas pueden estimular la migración selectiva de los diferentes linfocitos a sitios de inflamación [Taub y cols., 1995; Ding y cols., 2001; Mohan y cols., 2002]. Debido a esto, nos propusimos estudiar si el contacto de LB con HUTEK induce un patrón de expresión diferencial de quimioquinas en HUTEK. Mediante experimentos de macroarrays analizamos la expresión de mRNA de quimioquinas en HUTEK no tratadas, tratadas con 500 U/ml de IFN- $\gamma$ , tratadas con LB o LT purificados de sangre periférica y de amígdalas humanas. Después de 24 horas de incubación en las condiciones descritas, se purificaron las HUTEK eliminando LB y LT mediante lisis por complemento, para lo cual se utilizaron anticuerpos citotóxicos IF-54 (anti-CD20) y OKT3 (anti-CD3), respectivamente. Luego de verificar la eliminación de los linfocitos mediante citometría de flujo (el nivel de contaminación fue inferior al 1% de las células totales), se extrajo el RNA total de las HUTEK y se realizaron los macroarrays según se describió en materiales y métodos, utilizando la misma cantidad de cRNA por ensayo. La figura 12B muestra la expresión constitutiva de los genes de las quimioquinas CCL2, CCL7, CCL15, CCL19, CCL21, CCL25, CXCL1, CXCL5, CXCL12, CXCL16 y el receptor CCR11 en HUTEK. La figura 12 muestra que existen diferencias en la expresión del mRNA de quimioquinas en HUTEK tratadas con IFN- $\gamma$ , LB de sangre periférica, LB de amígdalas humana y LT purificados de sangre periférica. Se observa síntesis *de novo* de transcritos para las quimioquinas CCL3, CCL5, CCL8, CCL20, CXCL2, CXCL3, CXCL6 y CXCL8, un aumento del mRNA para CCL2, CCL7 y CXCL5, y una disminución para CCL21 y CCL28, en HUTEK co-incubadas con LB de sangre periférica comparado a las células no tratadas. Las quimioquinas inducidas son características de aquellas secretadas bajo estímulos inflamatorios, y participan en el reclutamiento de linfocitos [Mantovani y cols., 2006]. La Tabla 4 muestra los niveles de expresión relativa de los genes de quimioquinas determinados por cuantificación densitométrica.

Los análisis de macroarrays demuestran que existe un patrón de expresión diferencial de quimioquinas en HUTEc co-incubadas con células B. Para confirmar la expresión de mRNA en HUTEc, medimos los mRNA de CCL3, CCL5, CCL7, CCL25, CCL28 y CXCL12 mediante RT-PCR, debido a que estas quimioquinas interactúan con receptores acoplados a proteína G presentes en las células T, además, se ha demostrado que estas quimioquinas participan en la migración transendotelial de los LT [Siveke y cols., 1998; Kawai y cols., 1999; Taub y cols., 1995; Scimone y cols., 2004]. En la figura 13 observamos una inducción de la expresión del mRNA de las quimioquinas CCL3, CCL5 y CCL7 y una disminución de CCL28 en HUTEc co-incubadas con LB, confirmando los resultados obtenidos por macroarrays. Los niveles de expresión de los mRNA se determinaron por cuantificación densitométrica [Figura 13B] y se normalizaron respecto de la expresión de  $\beta$ -actina.



**Figura 12. Expresión de genes de quimioquinas y receptores de quimioquinas en células endoteliales de amígdalas.** Experimentos de macroarrays para HUTEC en las diferentes condiciones. **(A)** Nombre de algunos de los genes de quimioquinas presentes en el macroarrays. En anexo 1 se encuentra la lista completa de genes presentes en las membranas. **(B)** Se extrajo el RNA total de HUTEC no tratadas, tratadas con IFN- $\gamma$ , cocultivadas con LB de sangre periférica, LB de amígdalas o LT de sangre periférica durante 24 horas. Se seleccionaron spots en los que se observan cambios.

**TABLA 4.** Niveles relativos de expresión de genes de quimioquinas en células endoteliales derivadas de amígdalas sometidas a diferentes tratamientos

<b>Genes de quimioquinas</b>	<b>HUTEC+LB (sangre)</b>	<b>HUTEC+LB (amígdala)</b>	<b>HUTEC+LT (sangre)</b>	<b>HUTEC+IFN-<math>\gamma</math></b>
<b>CCL2</b>	2,25 $\pm$ 1,11	1,14	1,30	2,50 $\pm$ 0,80
<b>CCL3</b>	++	+	-	-
<b>CCL5</b>	++	++	+++	-
<b>CCL7</b>	2,59 $\pm$ 0,83	2,02	4,76	4,50 $\pm$ 0,66
<b>CCL8</b>	++	++	+++	+++
<b>CCL13</b>	-	-	-	+++
<b>CCL19</b>	1,33 $\pm$ 0,12	1,44	1,48	0,59 $\pm$ 0,30
<b>CCL20</b>	++	++	+++	-
<b>CCL21</b>	0,47 $\pm$ 0,19	0,69	1,88	0,89 $\pm$ 0,47
<b>CCL25</b>	0,84 $\pm$ 0,14	1,24	1,71	0,45 $\pm$ 0,11
<b>CCL28</b>	0,21 $\pm$ 0,16	0,79	1,91	0,27 $\pm$ 0,14
<b>CXCL2</b>	+++	+++	+++	++
<b>CXCL3</b>	+++	+++	+++	-
<b>CXCL5</b>	1,46 $\pm$ 0,58	1,12	1,76	1,11 $\pm$ 0,21
<b>CXCL6</b>	+++	+++	+++	++
<b>CXCL8</b>	+++	+++	+++	-
<b>CXCL9</b>	-	-	+++	+++
<b>CXCL10</b>	-	-	+++	+++
<b>CXCL11</b>	-	-	+++	+++
<b>CXCL12</b>	0,94 $\pm$ 0,34	0,56	1,60	0,69 $\pm$ 0,13

La tabla muestra los valores relativos de la expresión de genes de quimioquinas (n=3 de HUTEC co-cultivadas con LB alogénicos purificados de sangre periférica, n=2 de HUTEC tratadas con IFN- $\gamma$ , n=1 HUTEC co-cultivados con LB derivados de amígdalas o LT purificados de sangre periférica).

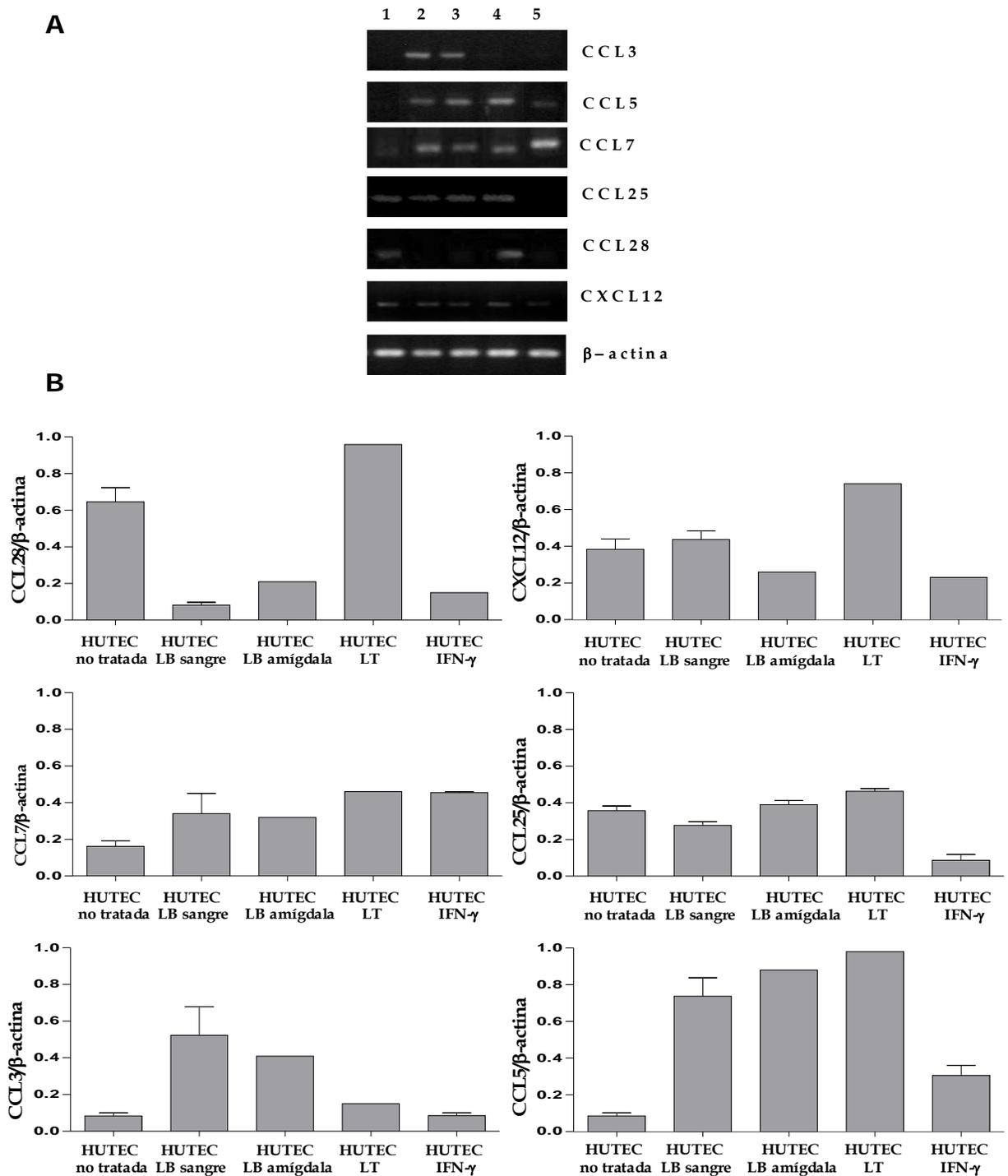
Valores >1, indican que mRNA aumenta en comparación a HUTEC no tratadas.

Valores <1, indican que mRNA disminuye en comparación a HUTEC no tratadas.

Valores =1, indican que mRNA no cambia en la expresión comparado con HUTEC no tratadas.

(-) indica que el mRNA no es detectado en HUTEC no tratadas ni en HUTEC tratadas.

(+) indica que el mRNA es detectado sólo en HUTEC tratadas. +, si el nivel de expresión del gen se encuentran entre 5-25% del nivel de expresión del gen housekeeping; ++, entre 25-50%; +++, entre 50-100%.

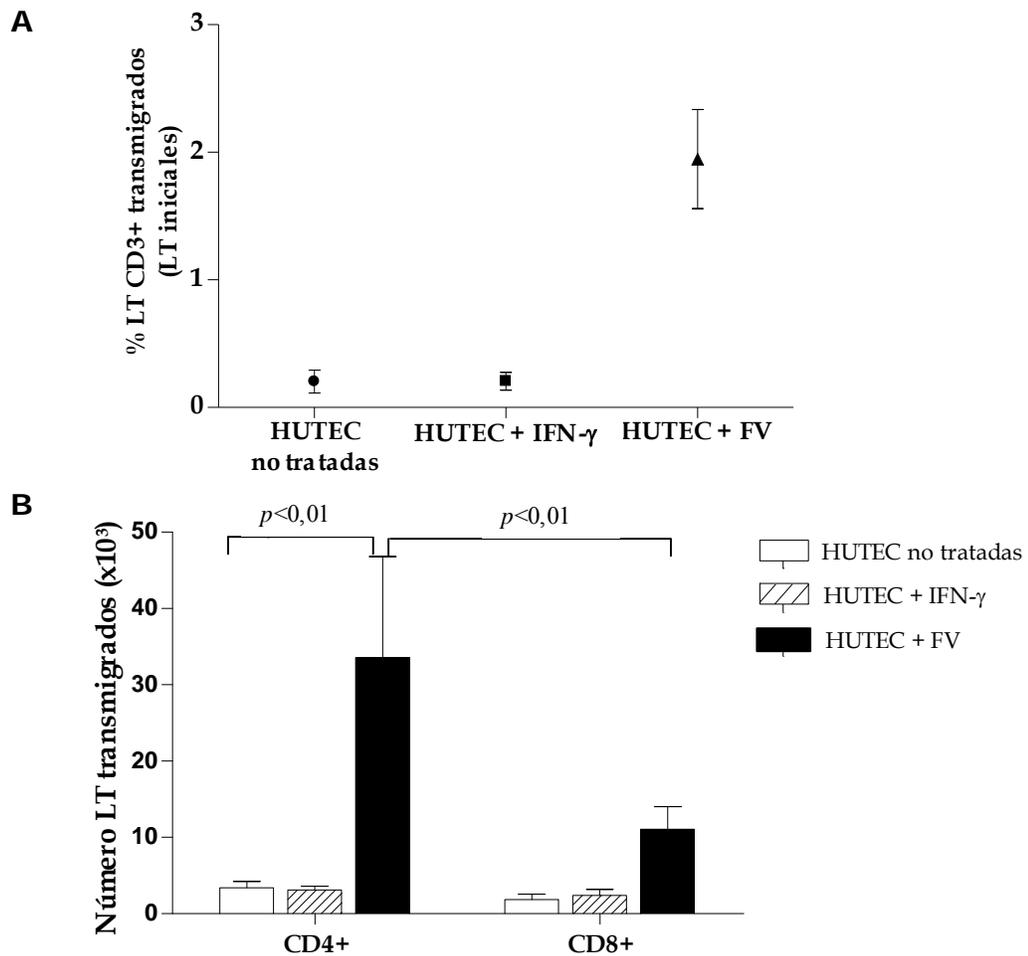


**Figura 13. Expresión del mRNA de genes de quimioquinas en células endoteliales de amígdalas.** (A) RT-PCR del mRNA de quimioquinas (CCL3, CCL5, CCL7, CCL25, CCL28 y CXCL12) provenientes de HUTEc no tratadas (carril 1), co-cultivadas con LB purificados de sangre periférica (carril 2), con LB derivados de amígdalas humanas (carril 3), con LT purificados de sangre periférica (carril 4) y tratadas con 500 U/ml IFN- $\gamma$  (carril 5). (B) Cuantificación de los mRNA de quimioquinas normalizados respecto de la expresión  $\beta$ -actina en HUTEc (n=4 de HUTEc co-cultivadas con LB de sangre periférica, n=2 de HUTEc tratadas con IFN- $\gamma$ , n=1 HUTEc co-cultivados con LB derivados de amígdalas o LT purificados de sangre periférica).

### **Las células endoteliales derivadas de amígdalas humanas co-cultivadas con células B inducen la trans migración de linfocitos T CD4+ de memoria**

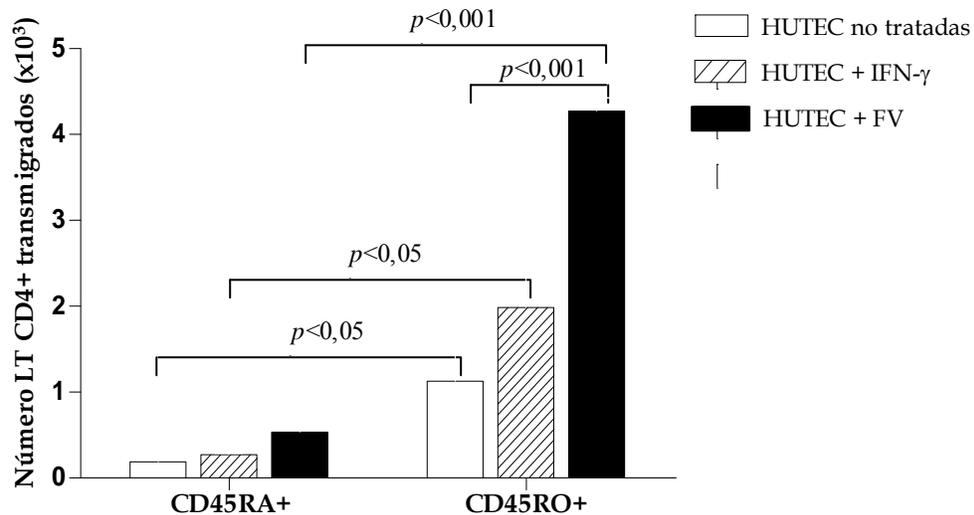
Mediante ensayos de migración *in vitro* evaluamos la trans migración de LT a través de HUTEc activadas con células B. Para estos ensayos, las HUTEc se crecieron a confluencia en la cámara superior de los transwell (poros de 3,0  $\mu\text{m}$ ), las cuales se incubaron durante 24 horas con IFN- $\gamma$  o una línea celular linfoblastoide B (FV). Luego del tiempo de incubación las células B se retiraron con lavados sucesivos con medio de cultivo RPMI 1640 sin suero. Después se agregaron LT por 24 horas, recolectándose las células que migraron a la cámara inferior, las que se analizaron mediante citometría de flujo. La figura 14 muestra que un pequeño porcentaje de los LT tienen la capacidad de migrar espontáneamente a través de HUTEc no estimuladas ( $0,20 \pm 0,09\%$ ), observándose el mismo efecto al estimular HUTEc con 500 U/ml IFN- $\gamma$  ( $0,21 \pm 0,07\%$ ). En contraste, HUTEc activadas con células B inducen un incremento en la trans migración de LT CD3+ ( $1,95 \pm 0,39\%$ ) (Figura 14A). El número de LT CD4+ que migra a través de HUTEc pre-estimuladas con células B incrementa significativamente al comparar con LT CD4+ que trans migran a través de HUTEc no tratadas ( $33,57 \pm 13,25 \times 10^3$  versus  $3,39 \pm 0,83 \times 10^3$ , respectivamente) (Figura 14B). Los LT CD8+ que migran a través de HUTEc no se ven afectadas por el tratamiento con células B. Al comparar LT CD4+ con LT CD8+ que trans migran a través de HUTEc activadas con células B, se observa una mayor migración de LT CD4+ que de LT CD8+ ( $p < 0,05$ ) (Figura 14B). El tratamiento con IFN- $\gamma$  no afecta la trans migración de LT CD4+ ni de LT CD8+. Estos resultados sugieren que el tratamiento de las HUTEc con células B favorece una migración selectiva de LT CD4+.

Enseguida, determinamos el fenotipo de los LT CD4+ que migran a través de las HUTEc estimuladas con IFN- $\gamma$ , con células B o no tratadas. En la figura 15 se muestra que tanto los LT CD4+ vírgenes (CD45RA+) como los LT CD4+ de memoria (CD45RO+) migran espontáneamente a través de HUTEc no estimuladas. Sin embargo, no se observa un incremento significativo de la población de LT CD4+ vírgenes a través de HUTEc activadas con células B, en contraste, hay un mayor número de LT CD4+ de memoria trans migrados a través de HUTEc activadas con células B comparada con HUTEc no tratadas ( $4,27 \times 10^3$  versus  $1,13 \times 10^3$ , respectivamente). Al comparar LT CD4+ vírgenes con LT CD4+ de memoria que trans migran a través de HUTEc activadas con células B, se observa una mayor migración de LT CD4+ de



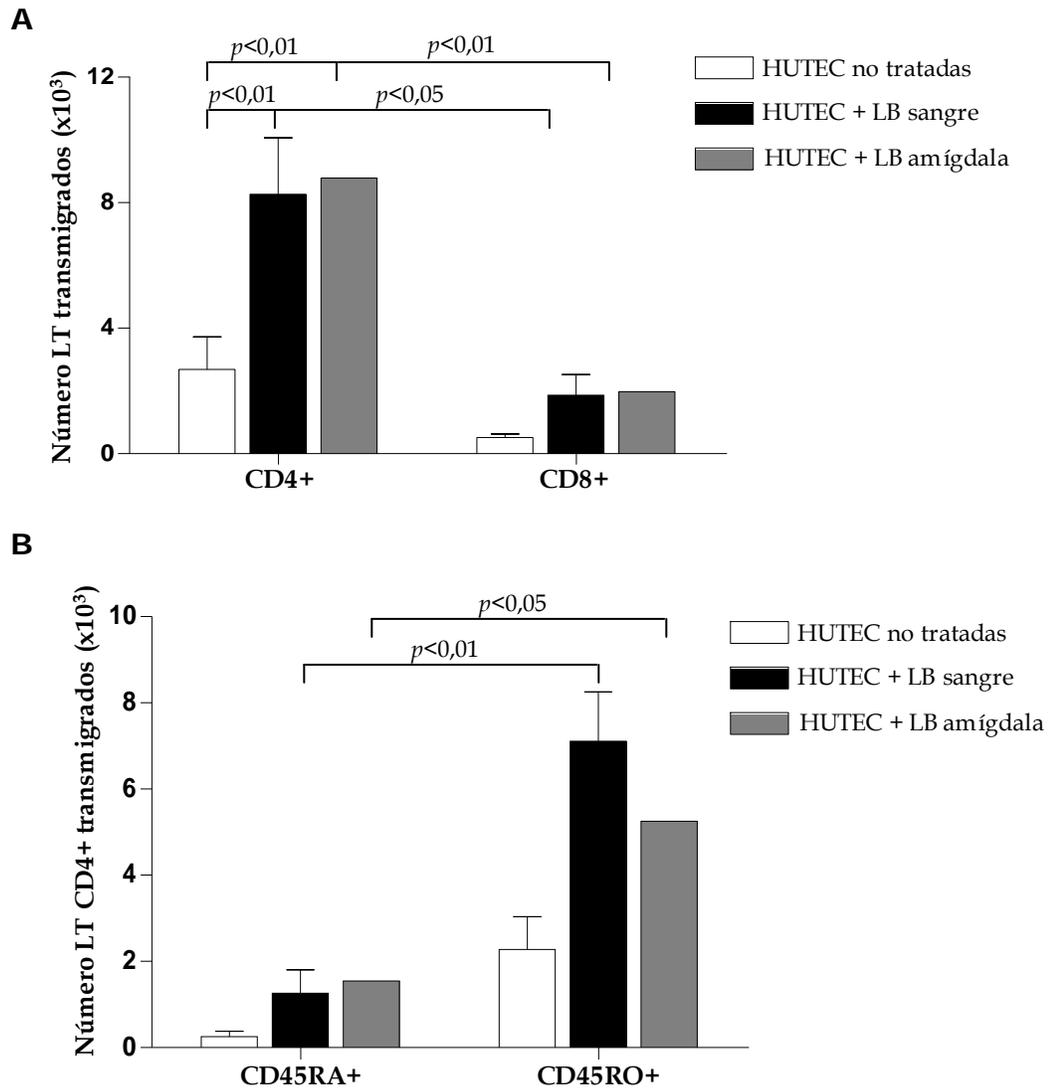
**Figura 14. Las células endoteliales co-cultivadas previamente con células B inducen la trans migración selectiva de LT CD4+.** Ensayo de trans migración de LT CD3+ se realizó a través no tratadas, pre-tratadas con 500 U/ml de IFN- $\gamma$  o con la línea celular linfoblastoide FV durante 24 horas. Luego, los LT alogénicos purificados de sangre periférica se agregaron e incubaron por 24 horas adicionales. Después del tiempo indicado, los LT que transmigraron se caracterizaron y enumeraron por citometría de flujo. **(A)** Porcentaje de LT CD3+ que transmigran respecto de la cantidad inicial agregados. Se indica la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes (HUTEc no tratadas versus HUTEc + FV  $p < 0,01$ ). **(B)** Número de LT que transmigran, donde se muestra la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

memoria que de LT CD4+ vírgenes ( $p < 0,001$ ). Al tratar las HUTEc con IFN- $\gamma$  se induce un pequeño incremento de LT CD4+ de memoria, el cual no es estadísticamente significativo comparado con HUTEc no tratadas ( $p > 0,05$ ), sin embargo, con este mismo tratamiento migran más LT CD4+ de memoria comparados a los LT CD4+ vírgenes ( $p < 0,05$ ). Esto nos indica que los LT CD4+ de memoria transmigran preferencialmente a través de las HUTEc y que la trans migración es mayor cuando las células endoteliales estuvieron previamente en contacto con LB.



**Figura 15. La adhesión de células B a células endoteliales derivadas de amígdalas induce la trans migración preferencial de linfocitos T CD4+ de memoria.** Ensayo de trans migración de LT CD3+ se realizó a través de HUVEC no tratadas (□), pre-tratadas con 500 U/ml de IFN- $\gamma$  (▨) o con la línea celular linfoblatoide GU (■) durante 24 horas. Luego, se agregaron los LT alogénicos purificados de sangre periférica y se cultivaron por 24 horas adicionales. Después del tiempo indicado, los LT que transmigraron se caracterizaron y enumeraron mediante citometría de flujo. El gráfico muestra el número de LT CD4+ vírgenes (CD45RA+) o de memoria (CD45RO+) que migran de un experimento representativo.

Por otra parte, se analizó la trans migración de LT a través de HUVEC activadas con LB alogénicos purificados de sangre periférica o derivados de amígdala humana, para evaluar si el patrón de trans migración de LT se reproduce con LB normales. Las células T que migran a través de HUVEC activadas con LB corresponde principalmente a LT CD4+ (Figura 16A), de los cuales aquellos que migran preferencialmente presentan un fenotipo de LT CD4+ de memoria (CD45RO+) (Figura 16B). No se observa una diferencia significativa en la trans migración de LT CD4+ vírgenes (CD45RA+) a través de HUVEC activadas con LB comparada con HUVEC no estimuladas ( $p > 0,05$ ) (Figura 16B). Por lo tanto, estos resultados demuestran que la trans migración preferencial de LT CD4+ de memoria es un fenómeno característico de HUVEC activadas con células B.

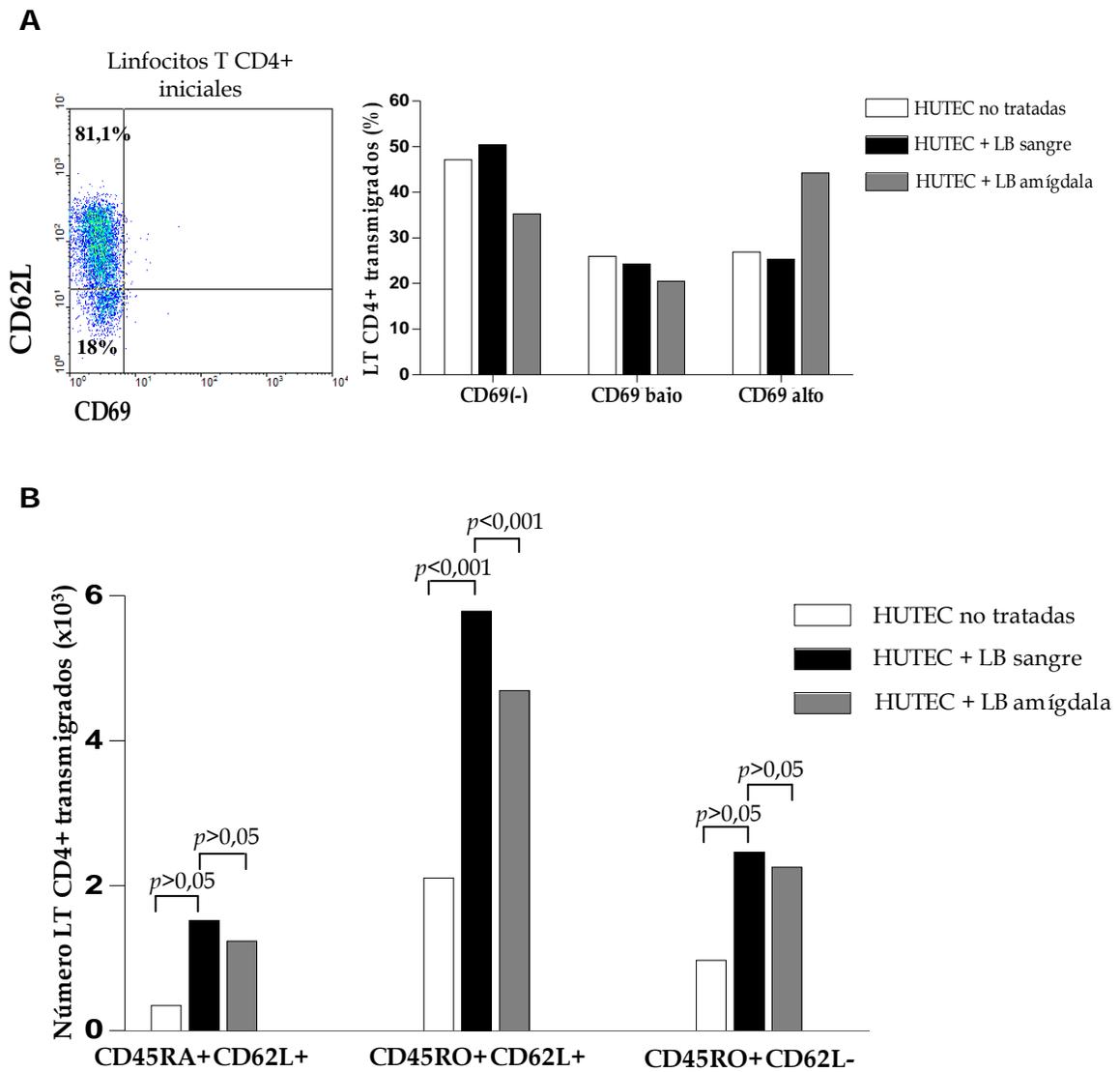


**Figura 16. La adhesión de linfocitos B de sangre o de amígdala a células endoteliales derivadas de amígdala induce la trans migración preferencial de linfocitos T CD4+ de memoria.** Ensayo de trans migración de los LT CD3+ se realizó a través de las HUVEC no tratadas (□), co-cultivadas con LB alogénicos purificados de sangre periférica (■) o derivados de amígdalas humanas (▒) durante 20 horas. Posteriormente, se agregaron LT CD3+ purificados de sangre periférica y se cultivaron por 20 horas adicionales. Las células T que transmigraron se caracterizaron y enumeraron por citometría de flujo. **(A)** Número de LT CD4+ y CD8+ que transmigran. **(B)** Número de LT CD4+ vírgenes (CD45RA+) o de memoria (CD45RO+) que transmigran.

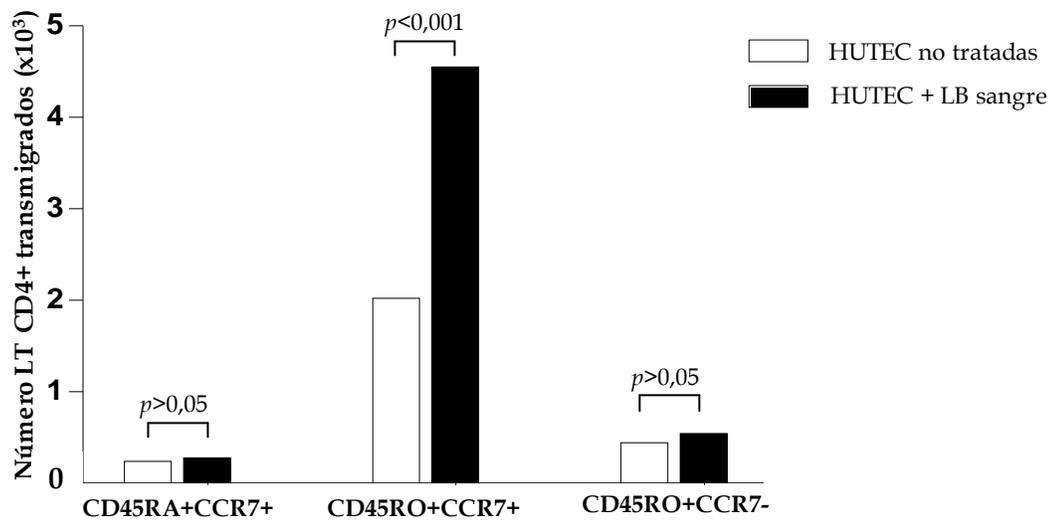
### **Los linfocitos T CD4+ de memoria central migran preferencialmente a través de células endoteliales activadas por linfocitos B**

Se ha establecido que existen dos tipos de células de memoria con patrones de recirculación diferentes: células de memoria centrales y de memoria efectoras. Para evaluar el fenotipo de los LT CD4+ de memoria que transmigran a través de las células endoteliales pre-tratadas con células B analizamos la expresión de marcadores celulares característicos de los LT CD4+ de memoria centrales o efectoras. La figura 17A muestra la cuantificación de un ensayo de trans migración en el cual se observan tres poblaciones de LT CD4+ para la expresión del marcador de activación CD69: una población mayoritaria de LT CD4+ CD69- que transmigran a través de HUTEc no estimuladas como pre-estimuladas con LB, una población de LT CD4+ CD69+ de baja expresión y otra CD69+ de alta expresión. En el gráfico de citometría inserto en la figura 17A, se muestra que los LT CD4+ inicialmente son negativos para CD69, además un 81,1% de los LT expresan CD62L, un marcador característico de los LT vírgenes y de memoria, el cual se mantiene en los LT de memoria central a diferencia de los LT de memoria efectoras [Sallusto y cols., 2004] . Por otra parte, no se observan diferencias significativas en la expresión del marcador de activación CD69 en LT CD4+ que migran a través de HUTEc pre-estimuladas con LB de sangre periférica o de LB derivados de amígdalas. El análisis de los LT CD4+ transmigrados muestra un incremento significativo de LT CD4+ de memoria central (CD45RO+CD62L+) a través de HUTEc activadas con LB comparadas con las células que migran a través de HUTEc no estimuladas (Figura 17B). No se observan diferencias significativas en la trans migración de LT CD4+ vírgenes (CD45RA+CD62L+) y LT CD4+ de memoria efectoras (CD45RO+CD62L-) a través de HUTEc tratadas previamente con LB comparadas con células que migran a través de HUTEc no estimuladas (Figura 17B).

Para confirmar el fenotipo de los LT CD4+ transmigrados como LT de memoria central, analizamos la expresión de CCR7, marcador específico de linfocitos vírgenes y de memoria central [Sallusto y cols., 2004]. La figura 18 muestra que la cantidad de LT CD4+ de memoria central (CD45RO+CCR7+) que migran a través de HUTEc es mayor que los LT CD4+ vírgenes (CD45RA+CCR7+) y LT CD4+ de memoria efectoras (CD45RO+CCR7-). El tratamiento de HUTEc con LB incrementa aún más la trans migración de LT CD4+ de memoria central.



**Figura 17. La adhesión de linfocitos B a células endoteliales de amígdalas induce la migración preferencial de linfocitos T CD4+ de memoria central.** Ensayo de trans migración de los LT CD4+ se determinó a través de HUTEc no tratadas (□), co-cultivadas con LB alogénicos purificados de sangre periférica (■) o derivados de amígdalas humanas (▒) durante 20 horas. Posteriormente, se agregaron LT CD3+ purificados de sangre periférica y se cultivaron por 20 horas adicionales. Los LT que migraron se caracterizaron y enumeraron por citometría de flujo. Los gráficos muestran resultados de un experimento representativo. **(A)** El gráfico de densidad muestra el fenotipo de LT CD4+, para los marcadores CD69 y CD62L, antes de realizar el ensayo de trans migración. Porcentaje de LT CD4+ que expresan el marcador de activación (CD69) en los LT que migran a través de HUTEc (n=2). **(B)** Número de LT CD4+ vírgenes (CD45RA+CD62L+), de memoria central (CD45RO+CD62L+) o de memoria efectora (CD45RO+CD62L-) que trans migran.



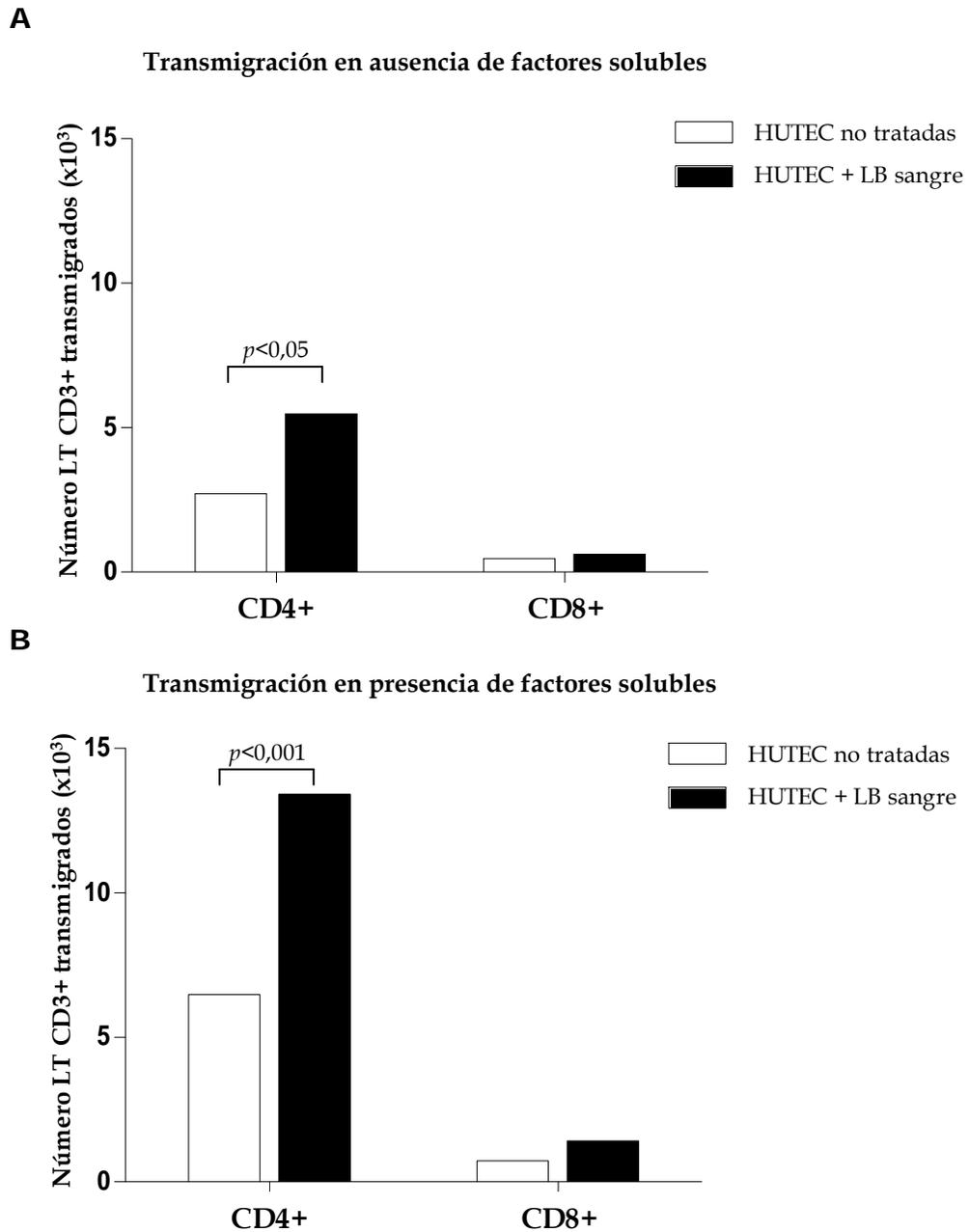
**Figura 18. La adhesión de linfocitos B a células endoteliales de amígdalas induce la migración preferencial de linfocitos T CD4+ de memoria central.** Ensayo de trans migración de LT CD4+ se determinó a través de HUVEC no tratadas (□) o pre-estimuladas con LB alógenicos purificados de sangre periférica (■) durante 24 horas. Posteriormente, se agregaron LT purificados de sangre periférica. Las células T que migran se caracterizaron y enumeraron por citometría de flujo, luego de 24 horas. El gráfico representa el número de LT CD4+ vírgenes (CD45RA+CCR7+), de memoria central (CD45RO+CCR7+) o de memoria efectores (CD45RO+CCR7-) que transmigran a través de HUVEC.

**El contacto entre células endoteliales y linfocitos B, además de factores solubles son requeridos para una migración eficiente de linfocitos T.**

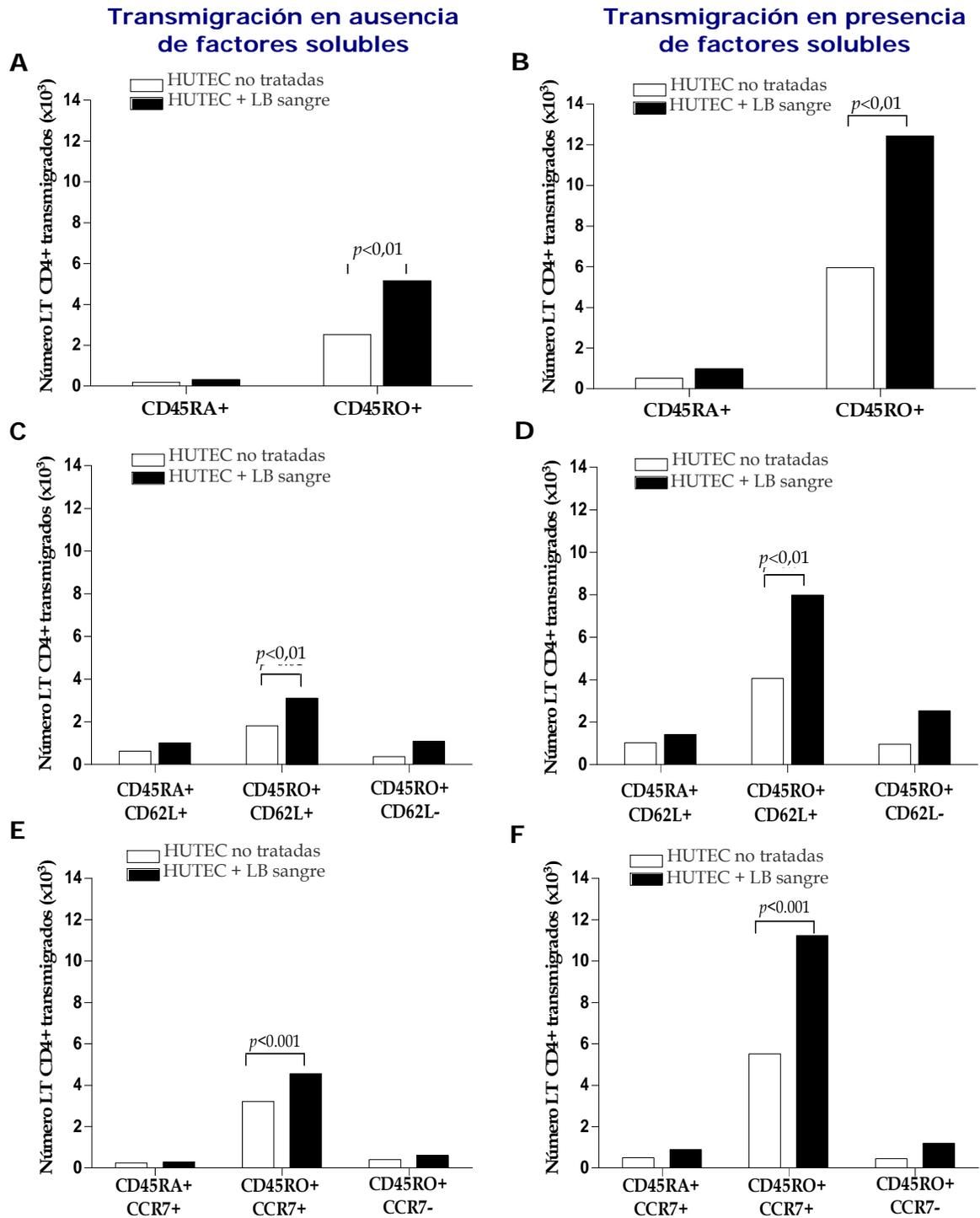
Con el fin de demostrar si la transmigración de los LT CD4<sup>+</sup> requiere de la participación de factores solubles secretados después de la adhesión de LB a HUTEc, evaluamos el fenotipo de LT transmigrados a través de HUTEc no estimuladas o activadas con LB alogénicos purificados de sangre periférica, en presencia de medio de cultivo RPMI 1640 + 10% FBS o medio condicionado por 24 horas de HUTEc producido en presencia o ausencia de LB. La figura 19 muestra un incremento de LT CD4<sup>+</sup> que migran a través de HUTEc activadas con LB en comparación a los LT CD4<sup>+</sup> que migran a través de HUTEc no estimuladas, sea esto en presencia o ausencia de factores solubles. En cambio, no se observan diferencias significativas en la transmigración de los LT CD8<sup>+</sup>. Como muestra la figura 20, en presencia de medio condicionado de HUTEc tratadas con LB, el fenotipo de los LT CD4<sup>+</sup> que migran a través de HUTEc no cambia, prevaleciendo los linfocitos de memoria central (CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>). Además, no se observan diferencias significativas en los LT CD4<sup>+</sup> vírgenes (CD45RA<sup>+</sup>) que transmigran a través de HUTEc en cualquiera de las condiciones estudiadas (Figura 20A y B). Por lo tanto, estos resultados muestran que la adhesión de LB a HUTEc induce la secreción de factores solubles que favorecen la transmigración de LT CD4<sup>+</sup> de memoria central.

Dado que los resultados muestran que los factores solubles son importantes para la transmigración de los LT, nos preguntamos si el contacto directo entre HUTEc y LB es también importante para la migración. Para lo cual las HUTEc se crecieron a confluencia tanto en la cámara superior e inferior del transwell y, luego se trataron durante 24 horas con LB de sangre periférica (en cámara superior o inferior del transwell). La figura 21A muestra una disminución significativa de los LT CD4<sup>+</sup> que migran a través de HUTEc que no tuvieron contacto previo con LB (co-cultivo entre HUTEc y LB en cámara inferior del transwell) comparados con los LT CD4<sup>+</sup> que migran a través de HUTEc activadas con LB (co-cultivo entre HUTEc y LB en cámara superior del transwell). Además no se observan diferencias significativas en la transmigración tanto de los LT CD4<sup>+</sup> como los LT CD8<sup>+</sup> al ser comparados con los que

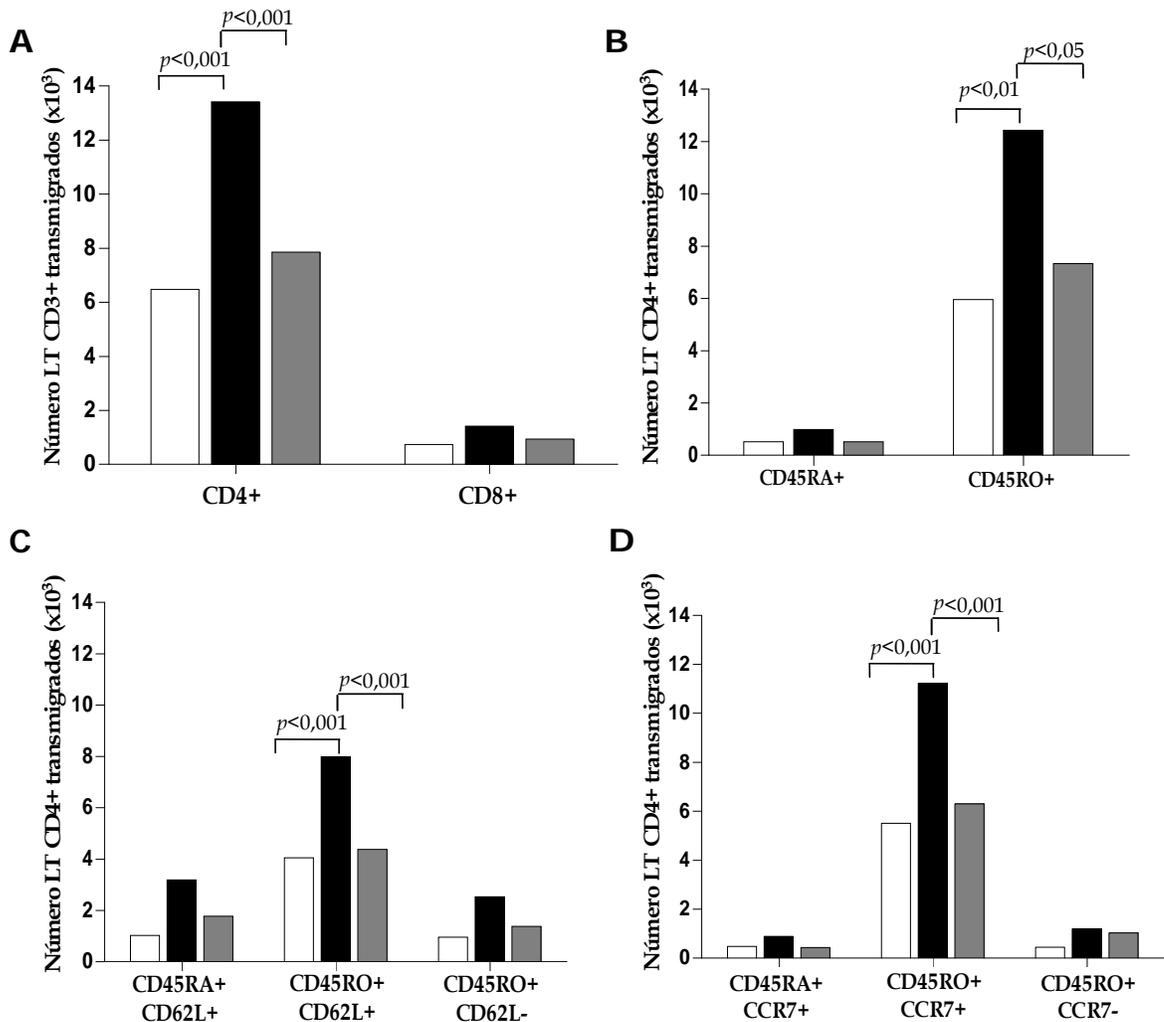
migran a través de HUTEc no tratadas. Las figuras 21B-D, muestran que el fenotipo de los LT CD4<sup>+</sup> que transmigran preferencialmente es de memoria central. Al igual que lo demuestran los experimentos anteriores, no se observan diferencias significativas la transmigración de los LT CD4<sup>+</sup> vírgenes (CD45RA<sup>+</sup>) (Figura 21B). Estos resultados demuestran que la transmigración de LT es un proceso que ocurre más eficientemente cuando existe contacto directo previo entre las células endoteliales y los LB, y por otro lado este proceso es potenciado por los factores solubles que se producen durante este contacto. Por lo tanto, la adhesión de LB a células endoteliales y los factores solubles son requeridos para una migración eficiente de LT CD4<sup>+</sup> de memoria central.



**Figura 19. La transmigración de linfocitos T a través de células endoteliales de amígdalas activadas con linfocitos B es incrementada por factores solubles.** Ensayo de transmigración de LT CD4+ se determinó a través de HUVEC no tratadas (□) o pre-estimuladas con LB alogénicos purificados de sangre periférica (■), se caracterizaron y enumeraron mediante citometría de flujo. **(A)** y **(B)** Número de LT CD4+ y CD8+ que migran a través de HUVEC. **(A)** Los LT CD3+ se agregaron en presencia de medio de cultivo RPMI + 10% FCS. **(B)** Los LT CD3+ se agregaron en presencia de medio condicionado (HUVEC en ausencia de LB (□); HUVEC en presencia de LB (■))



**Figura 20. Los factores solubles inducen un patrón de trans migración preferencial de LT CD4+ de memoria central.** Ensayo de trans migración de los LT se determinó a través de los HUTEc no tratadas (□) o tratadas con LB alógenicos purificados de sangre periférica (■), se caracterizaron y enumeraron por citometría de flujo. (A), (C) y (E) Los LT CD3+ se agregaron en presencia de medio de cultivo RPMI + 10% FCS. (B), (D) y (F) Los LT CD3+ se agregaron en presencia de medio condicionado (barra blanca □), medio condicionado de HUTEc en presencia de LB). (A) y (B) Número de LT CD4+ CD45RA+ o CD45RO+ que migran. (C) y (D) Número de LT CD4+ CD45RA+CD62L+, CD45RO+CD62L+ o CD45RO+CD62L- que migran. (E) y (F) Número de LT CD4+ CD45RA+CCR7+, CD45RO+CCR7+ o CD45RO+CCR7- que migran.



**Figura 21. La trans migración de linfocitos T es dependiente del contacto entre linfocito B y células endoteliales derivadas de amígdalas.** Las HUTEc se crecieron a confluencia en cámara superior e inferior del transwell, las cuales pre-trataron con LB alogénicos purificados de sangre periférica. La barra blanca (□), indica HUTEc no tratadas, la barra negra (■) indica que el co-cultivo de HUTEc con LB se realizó en la cámara superior del transwell, y la barra gris (▒) indica que el co-cultivo de HUTEc con LB se realizó en la cámara inferior del transwell. Los LT que migran se caracterizaron y enumeraron por citometría de flujo. **(A)** Número de LT CD4+ y CD8+ que migran. **(B)** Número de LT CD4+ CD45RA+ o CD45RO+ que migran. **(C)** Número de LT CD4+ CD45RA+CD62L+, CD45RO+CD62L+ o CD45RO+CD62L- que migran. **(D)** Número de LT CD4+ CD45RA+CCR7+, CD45RO+CCR7+ o CD45RO+CCR7- que migran.

## DISCUSIÓN

La migración de los linfocitos a los OLS o a sitios de inflamación es un proceso esencial de la respuesta inmune que requiere de la interacción célula endotelial-linfocito. Este proceso depende del estado de activación y diferenciación del linfocito, de señales específicas del tejido y del contexto en el cual está ocurriendo el proceso, sea éste homeostático o inflamatorio [Roseblatt y cols., 2004; Bono y cols., 2007]. Numerosos reportes indican que la transmigración de células T desde el lumen vascular al tejido es regulada por citoquinas, quimioquinas, receptores de adhesión [Roseblatt y cols., 2004; Bono y cols., 2007] y puede ser acompañada por el reconocimiento del complejo péptido-MHC-II [Lapierre y cols., 1988; Marelli-Berg y cols., 1999]. Estas señales conducen al reconocimiento selectivo de linfocitos por las células endoteliales, seguido de la migración transendotelial [Marelli-Berg y cols., 1999; Bradley y cols., 1999]. En esta tesis estudiamos el efecto de la adhesión de LB a un tipo específico de células endoteliales llamadas columnares o *high endothelial cells* derivadas de amígdalas humanas (HUTEC), en la transmigración de LT. Previamente en nuestro laboratorio se demostró que la adhesión de LB a HUTEC produce una activación funcional de las células endoteliales induciendo la fosforilación en tirosinas de la proteína de adhesión focal FAK, de la proteína de citoesqueleto paxilina y de la proteína kinasa activada por mitógenos ERK2. Además estimula la producción de una variedad de citoquinas y quimioquinas, entre ellas IL-6 e IL-8 [Reyes y cols., 2002]. En un trabajo más reciente demostramos también que la interacción de los LB con HUTEC induce la translocación nuclear del factor NF- $\kappa$ B en las células endoteliales, pero a diferencia de los resultados anteriormente mencionados, este fenómeno es independiente de la adhesión de los LB a HUTEC y sólo requiere de los factores solubles que se producen en presencia de ambos tipos celulares [Naves y cols., 2006].

### **Moléculas de histocompatibilidad de clase II**

Los resultados de esta tesis extienden nuestros resultados anteriores al demostrar que la interacción de los LB con HUTEC, pero no con LT, lleva a la expresión de moléculas MHC-II, HLA-DR (Figura 4) en la superficie de las HUTEC. Este fenómeno sólo ocurre entre células de la misma especie, dado que LB de ratón no permiten la expresión de moléculas MHC-II (I-A<sup>d</sup>) murinas en las células endoteliales humanas (Figura 8). Esto refleja una interacción especie-específica entre los LB y las células endoteliales columnares. Cuando se co-cultivaron las células

endoteliales con los LB en insertos bicamerales, sólo observamos expresión de moléculas MHC-II en las células endoteliales cuando ambos tipos celulares se encontraban en el mismo compartimento (Figura 10A), indicando que es necesaria una interacción directa entre LB y célula endotelial para producir la expresión de las moléculas MHC-II en las células endoteliales. Además comprobamos que los factores solubles acumulados por 24 horas durante la interacción entre LB y células endoteliales son incapaces de reproducir el efecto del contacto celular sobre la presencia de moléculas MHC-II en las células endoteliales (Figura 10B). Con estos experimentos descartamos la producción durante el co-cultivo de citoquinas como IFN- $\gamma$ , molécula capaz de inducir la expresión de moléculas MHC-II en diversos tipos celulares. Puesto que la mayor parte de estos experimentos fueron realizados utilizando líneas celulares B linfoblastoides, fue importante verificar los resultados utilizando LB humanos purificados de sangre periférica o LB obtenidos directamente de amígdalas humanas. En ambos casos y con distintos donantes obtuvimos los mismos resultados (Figura 11A) e incluso demostramos que este fenómeno se reproduce al utilizar células endoteliales de cordón umbilical (Figura 11B), lo que indica que se trata de un fenómeno bastante general, y probablemente fisiológicamente relevante.

Enseguida nos preguntamos si la presencia de moléculas MHC-II en las células endoteliales inducidas por la interacción con los LB ocurre a nivel transcripcional. Para ello preparamos RNA total de células endoteliales tratadas durante 24 horas con LB, los cuales fueron eliminados por lisis con complemento utilizando un anticuerpo para el marcador CD20 específico de LB. Luego comprobamos mediante citometría de flujo y RT-PCR para CD19 la ausencia de LB en nuestras preparaciones. El análisis por RT-PCR para el mRNA de la molécula MHC-II HLA-DR indica que la adhesión de LB a HUTEc no induce la expresión de este mensajero, en contraste con el tratamiento con IFN- $\gamma$  que sí induce el mRNA de HLA-DR (Figura 6). Estos resultados sugieren que las moléculas MHC-II presentes en HUTEc producidas por la interacción con los LB serían el resultado de un posible traspaso de membranas o moléculas provenientes del LB. Con el objetivo de investigar los mecanismos involucrados en la transferencia de moléculas MHC-II a las células endoteliales, se realizaron varios experimentos en los cuales co-incubamos LB cuya membrana plasmática fue marcada con anti-HLA-DR conjugado a ficoeritrina (PE). De tal modo que, si los LB provocan la transferencia de MHC-II desde la superficie, las células endoteliales deberían encontrarse marcadas después del co-cultivo. Al obtener las HUTEc a

distintos tiempos de incubación con la línea celular B llamada VR marcada con anti-HLA-DR PE o con el control de isotipo anti-IgG1 PE no observamos fluorescencia en las células. Sin embargo, cuando marcamos con anti-HLA-DR PE estas mismas células, encontramos que una fracción de ellas expresaban moléculas MHC-II (Figura 9). Estos resultados, en conjunto con aquellos que muestran que las células endoteliales co-cultivadas con los LB no están produciendo la síntesis *de novo* de MHC-II, ya que no producen cadena invariante (Figura 7) ni síntesis del mRNA para MHC-II (Figura 6), sugieren fuertemente que las moléculas MHC-II de las células endoteliales provienen de vesículas intracelulares de los LB, tipo exosomas.

En la literatura se ha descrito que diferentes tipos celulares son capaces de transferir proteínas de membrana mediante un proceso activo, el cual puede ser gatillado por estimulación celular mediada por receptor [Rialland y cols., 2006; Hudrisier y cols., 2007]. La liberación de exosomas, que son nanovesículas enriquecidas en moléculas MHC-II [Raposo y cols., 1996], moléculas co-estimuladoras de la respuesta inmune, proteínas de membrana de la familia de tetraspanina [Escola y cols., 1998] e integrinas [Wubbolts y cols., 2003; Clayton y cols., 2004], representa un mecanismo bastante aceptado en la literatura. Se ha demostrado que al estimular el receptor para el antígeno de células B (BCR) incrementa la liberación de exosomas por células B [Rialland y cols., 2006]. El papel funcional de este fenómeno ha sido demostrado *in vitro*, puesto que la liberación de exosomas por los LB permiten la activación de LT específicos para un determinado antígeno presentado en moléculas MHC-II [Raposo y cols., 1996]. Además, los exosomas son capaces de adherirse a fibroblastos estimulados con citoquinas [Clayton y cols., 2004] y a células dendríticas foliculares [Denzer y cols., 2000] permitiendo la adquisición por estas células de proteínas que les confieren nuevas funciones en la modulación de la respuesta inmune. Este mismo fenómeno podría estar ocurriendo con las células endoteliales.

El rol funcional de moléculas MHC-II en células endoteliales se desconoce, pero es ampliamente reconocido que *in vivo* las células endoteliales de diversos tejidos presentan moléculas MHC-II [Tay y cols., 2003]. Varios investigadores han propuesto que células endoteliales expuestas a IFN- $\gamma$  presentan eficientemente antígenos en el contexto de moléculas MHC-II a los LT CD4+, los cuales se activan induciendo su proliferación y secreción de citoquinas [Geppert y cols., 1985; Savage y cols., 1995]. Por otra parte, diversos estudios *in vitro* han demostrado que el reconocimiento de antígenos presentados por células endoteliales influye en la trans migración de

los LT, favoreciendo el reclutamiento de LT CD4+ de memoria [Marelli-Berg y cols., 1999]. Sin embargo, estudios *in vivo* demuestran que los LT CD4+ de memoria no son capaces de migrar a nodos linfáticos periféricos en ausencia de antígeno [Bradley y cols., 1999]. Los resultados de este último trabajo deben ser interpretados en el contexto del descubrimiento realizado por el grupo de Sallusto y cols., en el cual demostraron la existencia de LT CD4+ de memoria efectores y de memoria centrales, los cuales presentan diferentes propiedades migratorias [Sallusto y cols., 1999]. En efecto, los LT CD4+ de memoria efectores L-selectina-/CCR7- migran a tejidos periféricos inflamados donde ejercen su función efectora inmediatamente [Sallusto y cols., 2004; Scimone y cols., 2004] mientras que los LT de memoria central L-selectina+/CCR7+ tienen la capacidad de migrar al interior de los OLS a través de las células endoteliales columnares y localizarse en las zonas de células T. Los LT CD4+ de memoria central representan una pequeña población de los LT CD4+ de memoria y sólo pueden ser discriminados de los LT CD4+ vírgenes en base a la expresión de CD45RO+ [Sallusto y cols., 2004]. Cabe preguntarse si existen señales específicas de localización en los linfonodos periféricos para los LT CD4+ vírgenes y de memoria central. Puesto que los LB tienen la capacidad de capturar antígenos de la circulación y de presentarlos en moléculas MHC-II sintetizadas *de novo*, así como de secretar exosomas conteniendo entre otras moléculas MHC-II, y de activar las células endoteliales produciendo citoquinas y quimioquinas, nos preguntamos si la interacción directa de los LB con las células endoteliales juega un posible rol en la trans migración de LT.

### **Quimioquinas**

Puesto que las quimioquinas son proteínas directamente relacionadas con la migración celular, estudiamos la expresión de quimioquinas y receptores de quimioquinas en HUTEK activadas con LB mediante análisis de macroarrays. Para ello comparamos en al menos 3 experimentos independientes el patrón de citoquinas producidos por las células endoteliales en cultivo, con aquellos producidos por las células endoteliales co-cultivadas con LB o LT purificados de sangre periférica, o tratadas con IFN- $\gamma$ . En la Figura 12 mostramos que las células endoteliales co-incubadas con LB producen la síntesis *de novo* del mRNA para CCL3, CCL5, CCL8, CCL20, CXCL2, CXCL3, CXCL6 y CXCL8, un aumento de CCL2, CCL7 y CXCL5, y una disminución de CCL21 y CCL28. No existen mayores diferencias en el patrón de quimioquinas producidas por la adhesión de LB de sangre periférica o de amígdalas. La mayor parte de las quimioquinas

producidas son inflamatorias, excepto CCL19 y CCL20, lo cual indica que la adhesión de LB a HUTEc estaría simulando un fenómeno inflamatorio. Existen reportes que indican que células endoteliales tratadas con estímulos inflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-1 o LPS inducen la expresión de quimioquinas tales como CCL2, CXCL1, CXCL6, CXCL7, CX<sub>3</sub>CL3 [Beck y cols., 1999], CXCL5 y CXCL8 [Imaizumi y cols., 1997; Beck y cols., 1999], algunas de ellas comunes con nuestros resultados. La interacción de las células endoteliales con LT produce la síntesis *de novo* del mRNA para CCL3, CCL5, CCL8, CCL20, CXCL3, CXCL6, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11 y un aumento de CCL7, CCL25, CCL28 y CXCL2. Cuando comparamos los patrones de quimioquinas producidos por la interacción de las HUTEc con los LB o LT observamos que los LT inducen un mayor número de quimioquinas en las HUTEc, algunas de ellas totalmente ausentes en la interacción con los LB como son CXCL9, CXCL10 y CXCL11. Además, contrario a lo que ocurre en la interacción con los LB, la interacción con los LT aumenta la expresión de las quimioquinas CCL25 y CCL28 y produce un notable aumento de la quimioquina CXCL2. En la literatura se ha reportado que la interacción entre células endoteliales y LT CD4<sup>+</sup> induce CCL1, CCL5, CCL8, CCL15, CXCL1 y CXCL5 [Tay y cols., 2004]. Aunque existen algunas coincidencias con estos datos, el origen de las células endoteliales en todos estos trabajos puede probablemente explicar las diferencias encontradas. El tratamiento de las células endoteliales con IFN- $\gamma$  produce la síntesis *de novo* del mRNA para CCL8, CCL13, CXCL2, CXCL6, CXCL9, CXCL10 y CXCL11, un aumento de CCL2 y CCL7 y una disminución de CCL19, CCL25, CCL28 y CXCL2. El patrón de quimioquinas producidas por IFN- $\gamma$  no corresponde a ninguno de los otros dos patrones analizados y es en cierto modo intermedio entre ambos. En la literatura encontramos varios trabajos que confirman los resultados obtenidos con IFN- $\gamma$  en los cuales muestran la inducción de CCL5 [Kawai y cols., 1999], CCL8, CXCL9, CXCL10 y CXCL11 [Indraccolo y cols., 2007].

Por otra parte, encontramos que HUTEc expresan constitutivamente un gran número de genes para quimioquinas homeostáticas como CCL21, inflamatorias como CCL2, CCL7, CCL28, CXCL1, CXCL2, CXCL5 y CXCL16, y con función mixta, tales como CCL15, CCL19, CCL25 y CXCL12. Resultados nuestros y de otros laboratorios muestran que las células endoteliales columnares derivadas de amígdalas humanas expresan constitutivamente el mRNA para CCL2 [Reyes y cols., 2002], CCL20, CXCL10 y CXCL8 [Palmeri cols., 2004]. Nuestros resultados no coinciden exactamente con aquellos de Palmeri y cols., probablemente debido a que las HUTEc

que utilizamos fueron subcultivadas. Existen evidencias experimentales que muestran que la capacidad de las células endoteliales para producir quimioquinas depende del origen del endotelio [Hillyer y cols., 2005] y esta puede ser una de las razones para la variedad de resultados que se encuentran en la literatura.

Numerosos estudios han demostrado que la expresión selectiva de quimioquinas por células endoteliales columnares dirige la migración de poblaciones de linfocitos dentro de tejidos linfoides [Mantovani y cols., 2006]. En forma similar se ha demostrado que en tejidos no linfoides se produce un patrón de quimioquinas característico de migración a los tejidos inflamados [Hillyer y cols., 2005]. La migración de LT vírgenes y de memoria central depende de la presencia de CCL21, una quimioquina homeostática que se une al receptor de quimioquina CCR7 presente en estos linfocitos [Nagira y cols., 1998]. Nuestros resultados muestran que las HUTEc no sólo expresan constitutivamente CCL21, sino que la interacción de las células endoteliales con los LB induce además la expresión de CCL19 que también interacciona con CCR7, a diferencia de lo que ocurre cuando las HUTEc están bajo condiciones inflamatorias, en presencia de IFN- $\gamma$ . Por otra parte, en un endotelio activado, las quimioquinas CCL2, CCL3 y CCL5, todas ellas inducidas por la interacción de los LB con las HUTEc, estimulan la transmigración selectiva de LT de memoria, mientras que CXCL12 induce migración tanto de células T vírgenes como de memoria [Ding y cols., 2000]. Nuestros resultados muestran que CXCL12 no cambia su expresión cuando las HUTEc son co-cultivadas con LB de sangre periférica, lo cual sugiere un papel importante de CXCL12 para la migración de los LT vírgenes. Además, se ha demostrado que la expresión de CCL5 en células endoteliales inducen una migración selectiva de células Th1 (células que expresan CCR5 y CXCR3) [Kawai y cols., 1999]. Por último, se ha descrito en artritis reumatoídea que la presencia de la quimioquina CCL20 en fibroblastos sinoviales se correlaciona con la infiltración de leucocitos CCR6+, receptor de quimioquina presente una población de LT de memoria [Meissner y cols., 2003]. Nuestros resultados demuestran que CCL20 es inducida tanto por la interacción de LB como LT con las células endoteliales, sugiriendo que la migración celular depende más bien de la presencia de un patrón de quimioquinas que de la presencia de una quimioquina en particular. Cabe mencionar que en la caracterización del cultivo de células endoteliales utilizadas en este estudio comparamos los proteoglicanos presentes en la matriz extracelular de células endoteliales columnares (HUTEc) con células endoteliales vasculares (HUVEC) y encontramos

diferencias notables en el patrón de expresión (Figura 1), lo cual agrega complejidad a este análisis, ya que el patrón de proteoglicanos presentes en las células endoteliales facilita la interacción de las quimioquinas con sus respectivos receptores presentes en los linfocitos [Götte, 2003].

### **Transmigración linfocitaria**

Para evaluar el rol de la adhesión de LB a HUTEc en la transmigración de los LT, realizamos ensayos de migración *in vitro* utilizando insertos bicamerales sobre los cuales se crecieron las células endoteliales a confluencia. Luego se agregaron los LB de diferentes líneas celulares linfoblastoide o bien LB purificados de sangre periférica o directamente de amígdalas y se mantuvieron en cultivo con las células endoteliales durante 24 horas, tiempo suficiente para que se produzca la transferencia de MHC clase II a las HUTEc. Nuestros resultados muestran un incremento de 10 veces en la transmigración de LT a través de HUTEc activadas con células B (Figura 14A) comparado a HUTEc no tratadas o tratadas con IFN- $\gamma$ . Cabe notar que un porcentaje bajo de LT transmigra a través de HUTEc no activadas. Cuando analizamos la naturaleza de los LT que transmigran, encontramos que migraron significativamente más LT CD4<sup>+</sup> (Figura 14B y 16A) que LT CD8<sup>+</sup>. La caracterización de los LT CD4<sup>+</sup> que exhiben una capacidad migratoria nos mostró que existe una migración espontánea de LT CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> vírgenes y LT CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> de memoria, siendo mayor aquella de los LT CD4<sup>+</sup> de memoria (Figura 15). Además, la adhesión de LB, cualquiera sea el origen de estos a HUTEc induce una migración preferencial de LT CD4<sup>+</sup> de memoria (Figura 15 y 16). Los LT de memoria han sido clasificados últimamente en LT de memoria efectoras y de memoria central, los cuales presentan diferentes propiedades migratorias [Sallusto y cols., 2004]. Los LT de memoria central se caracterizan por expresar L-selectina (CD62L) y el receptor de quimioquina CCR7, se localizan en OLS y se diferencian a células efectoras en respuesta a estimulación antigénica. Los LT de memoria efectoras son CD62L-CCR7<sup>-</sup>, migran a tejidos periféricos inflamados y ejercen su función efectora inmediatamente [Sallusto y cols., 2004; Scimone y cols., 2004]. Las moléculas CCR7 y CD62L se expresan constitutivamente en LT vírgenes y de memoria centrales, y son requeridos para migrar a través de las células endoteliales columnares a las zonas de células T de los órganos linfoides secundarios [Sallusto y cols., 2004]. Es interesante resaltar que nuestros resultados muestran que los LT CD4<sup>+</sup> de memoria que transmigran a través de HUTEc activadas o no con LB, son preferencialmente de memoria central (Figura 17B y 18), dado que

son CD62L+CCR7+, lo que nos sugiere que la capacidad migratoria de estos LT es una característica intrínseca de este fenotipo. A pesar que nuestros resultados demuestran que los LT CD4+ de memoria central migran espontáneamente a través de HUTEc, los ensayos de transmigración realizados utilizando el medio condicionado del co-cultivo durante 24 horas de HUTEc con LB demuestran claramente que la transmigración es más eficiente sólo cuando las células endoteliales han estado en contacto directo con los LB (Figura 19).

Estudios de transmigración *in vitro* demuestran que una población de LT CD4+ exhiben propiedades migratorias, los cuales son predominantemente células T de memoria CD45RO+, CD29+, CD62L-. Las células T CD4+ que migran están enriquecidas en marcadores CD26, CD44, CD11a, CD58, CD98, CD49d, CD49e y CD49f, y sólo un pequeño porcentaje de estas células expresan CD69, por lo tanto se encuentran activadas [Brezinschek y cols., 1995]. En otros estudios han encontrado que los LT CD4+ que migran selectivamente durante infecciones virales agudas expresan un fenotipo CD62L-, CD11a+, CD44+ y CD49d+ [Borthwick y cols., 1997], en cambio, los LT CD4+ encontrados en tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoídea expresan CD62L+, CD11a+, CD44+ y CD49d+ [Ueki y cols., 1994; Kohem y cols., 1996; Maldonado y cols., 2003]. Además, varios reportes han demostrado que el principal tipo celular que transmigra a sitios de inflamación son particularmente LT CD4+ de memoria [Pietschmann y cols., 1992; Rohnelt y cols., 1997]. Un estudio que concuerda con los resultados obtenidos en esta tesis muestra que el endotelio activado por citoquinas induce un pequeño incremento en la transmigración de LT CD4+, los cuales presentan el mismo fenotipo de los LT CD4+ que migran a través de células endoteliales no estimuladas, excepto por un aumento de la expresión de CD69 y CD62L [Brezinschek y cols., 1995].

Finalmente no está claro cuales podrían ser las señales que producen la adhesión de los LB al endotelio, aunque sabemos que la integrina  $\alpha 4$  media este proceso en un contexto inflamatorio [Postigo y cols., 1993; Castro y cols., 1996]. En esta tesis demostramos que la adhesión de LB a un tipo especial de células endoteliales, HUTEc, produce la transferencia de moléculas MHC-II (y probablemente de otras moléculas), y producción de diversas citoquinas y quimioquinas. Aunque no pudimos probar formalmente que la presencia de las moléculas MHC-II en las células endoteliales esté influyendo directamente en la migración de los LT CD4+ de memoria centrales, sí probamos que la interacción de los LB con las células endoteliales produce un

patrón de citoquinas y quimioquinas particular que potencia la migración de LT CD4+ de memoria central. Aunque no fue posible demostrar que la presencia de moléculas MHC-II en las células endoteliales co-incubadas con LB fuese la responsable de la trans migración preferencial de los LT CD4+ de memoria, cabe destacar que sólo los LT CD4+ reconocen las moléculas MHC-II en forma antígeno específica o a través del co-receptor CD4 independiente de antígeno. Otro resultado de esta tesis fue la migración espontánea de LT CD4+ de memoria central a través de las células endoteliales columnares comparado a los LT CD4+ de memoria efector, LT CD4+ vírgenes y LT CD8+. El dogma de la inmunología dice que este tipo de células endoteliales permite la trans migración al interior de los OLS a todos los linfocitos libremente, pero aparentemente existen preferencias en este proceso. Es probable que los LT de memoria centrales (siendo una población muy minoritaria), tengan fuertes requerimientos de un microambiente favorable para su permanencia en el tiempo y que debido a ello posean ventajas migratorias comparados a otros linfocitos. Puesto que los LB inducen en las células endoteliales un patrón de expresión particular de quimioquinas comparado a células sin tratamiento, las diferencias encontradas deberían permitir determinar cuáles quimioquinas son esenciales para la trans migración de los LT. El conocimiento de patrones particulares de moléculas involucradas en la trans migración endotelial podrían permitir entender patologías asociadas a estos fenómenos.

## CONCLUSIONES

Las células endoteliales columnares derivadas de amígdala humana co-cultivadas con linfocitos B adquieren moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), HLA-DR, en la superficie celular, probablemente a través del traspaso de exosomas.

La presencia de moléculas MHC-II en las células endoteliales depende de la adhesión de linfocitos B, pero no de linfocitos T. Este efecto no es reproducido por los factores solubles producidos durante la interacción linfocito B-endotelio.

La presencia de moléculas MHC-II en las células endoteliales columnares de amígdala humana es especie-específica, pues la adhesión de células B de ratón no produce la expresión de MHC-II de ratón en la superficie celular de células endoteliales.

La adhesión de linfocitos B a células endoteliales induce un patrón de expresión diferencial de quimioquinas, comparado a aquel producido por la adhesión de linfocitos T o la acción de IFN- $\gamma$ .

La adhesión de linfocitos B a células endoteliales columnares potencia la trans migración preferencial de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria central caracterizados como CD62L<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>.

El aumento de la trans migración de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria central depende de la adhesión de los linfocitos B a las células endoteliales, y no de la producción de factores solubles secretados por el contacto entre célula endotelial y linfocito B.

## BIBLIOGRAFÍA

- Baekkevold, E., Yamanaka, T., Palframan, R., Carlsen, H., Reinholt, F., von Andrian, U., Brandtzaeg, P., Haraldsen, G. The CCR7 ligand ELC (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J. Med. Exp.* 2001; 193 (9): 1105-1111
- Beck, G., Yard, B., Breedijk, A., Ackern, K., van der Woude, F. Release of CXC-chemokines by human lung microvascular endothelial cells (LMVEC) compared with macrovascular umbilical vein endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 1999; 118: 298-303
- Bono, M.R., Elgueta, R., Sauma, D., Pino, K., Osorio, F., Michea, P., Fierro, A., Roseblatt, M. The esencial role of chemokine in the selective regulation of lymphocyte homing. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007; 18: 33-43
- Borthwick, N., Akbar, A., Maccormac, L., Lowdell, M., Craigen, J., Hassan, I., Grundy, J., Salmon, M., Yong, K. Selective migration of highly differentiated primed T cells, defined by low expression of CD45RB, across human umbilical vein endothelial cells: effects of viral infection on transmigration. *Immunol.* 1997; 90: 270-280
- Bradley, L., Harbertson, J., Watson, S. Memory CD4 cells do not migrate into peripheral lymph nodes in the absence of antigen. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 3273-3284
- Brezinschek, R., Lipsky, P., Galea, P., Vita, R., Oppenheimer-Marks, N. Phenotypic characterization of CD4+ T cells that exhibit a transendothelial migratory capacity. *J. Immunol.* 1995; 154: 3062-3077
- Carlsen, H., Haraldsen, G., Brandtzaeg, P., Baekkevold, E. Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules. *Blood.* 2005; 106: 444-446
- Castro, A., Bono, M.R., Simon, V., Roseblatt, M. Lymphocyte adhesion to endothelium derived from human lymphoid tissue. *Eur. J. Cell Biol.* 1996; 70: 61-68
- Clayton, A., Turkes, A., Dewitt, S., Steadman, R., Mason, M., Hallett, M. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB J.* 2004; 18 (9): 977-979
- Denzer, K., van Eijk, M., Kleijmeer, M., Jakobson, E., de Groot, C., Geuze, H. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J. Immunol.* 2000; 165: 1259-1265
- Ding, Z., Xiong, K., Issekutz, T. Regulation of chemokine-induced transendothelial migration of T lymphocyte by endothelial activation: differential effects on naive and memory T cells. *J. Leukoc. Biol.* 2000; 67: 825-833
- Ebert, L., Schaerli, P., Moser, B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol. Immunol.* 2005; 42: 799-809

- Engelhardt, B., Wolburg, H. Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur. J. Immunol.* 2004; 34: 2955-2963
- Esche, C., Stellato, C., Beck, L. Chemokines: Key players in innate and adaptive immunity. *J. Invest. Dermatol.* 2005; 125: 615-628
- Escola, J.M., Kleijmeer, M., Stoorvogel, W., Griffith, J., Yoshie, O., Geuze, H. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (32): 20121-20127
- Fabbri, M., Bianchi, E., Fumagalli, L., Pardi, R. Regulation of lymphocyte traffic by adhesion molecules. *Inflamm. Res.* 1999; 48: 239-246
- Geppert, T., Lipsky, P. Antigen presentation by interferon- $\gamma$ -treated endothelial cells and fibroblasts: differential ability to function as antigen-presenting cells despite comparable Ia Expression. *J. Immunol.* 1985; 135 (6): 3750-3762
- Girard, J.P., Baekkevold, E., Yamanaka, T., Haraldsen, G., Brandtzaeg, P., Amalric, F. Heterogeneity of endothelial cells. The specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. *Am. J. Pathol.* 1999; 155 (6): 2043-2055
- Girard, J.P., Springer, T. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol. Today.* 1995; 16 (9): 449-457
- Götte, M. Syndecans in inflammation. *FASEB J.* 2003, 17 (6): 575-591
- Gunn, M., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J., Rosen, S., Williams, L. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; 95: 258-263
- Gupta, S., Lysko, P., Pillarisetti, K., Ohlstein, E., Stadel, J. Chemokine Receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (7): 4282-4287
- Hanamoto, H., Nakayama, T., Miyazato, H., Takegawa, S., Hieshima, K., Tatsumi, Y., Kanamaru, A., Yoshie, O. Expression of CCL28 by reed-sternberg cells defines a major subtype of classical Hodgkin's disease with frequent infiltration of eosinophils and/or plasma cells. *Am. J. Pathol.* 2004; 164 (3): 997-1006
- Handel, T., Johnson, Z., Crown, S., Lau, E., Sweeney, M., Proudfoot, A. Regulation of protein function by glycosaminoglycans-as exemplified by chemokines. *Annu. Rev. Biochem.* 2005; 74: 385-410
- Hillyer, P., Male, D. Expression of chemokine on the surface of different human endothelia. *Immunol. Cell Biol.* 2005; 83: 375-382

- Hudrisier, D., Aucher, A., Puaux, A., Bordier, C., Joly, E. Capture of target cell membrane components via trogocytosis is triggered by a selected set of surface molecules on T or B cells. *J. Immunol.* 2007; 178 (6) : 3637-3647
- Imaizumi, T., Albertine, K., Jicha, D., McIntyre, T., Prescott, S., Zimmerman, G. Human endothelial cells synthesize ENA-78: relationship to IL-8 and to signaling of PMN adhesion. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1997; 17:181-192
- Indraccolo, S., Pfeffer, U., Minuzzo, S., Esposito, G., Roni, V., Mandruzzato, S., Ferrari, N., Anfosso, L., Dell'Eva, R., Noonan, D., Chieco-Bianchi, L., Albini, A., Amadori, A. Identification of genes selectively regulated by IFNs in endothelial cells. *J. Immunol.* 2007; 178: 1122-1135
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Capra, D. *Immunobiology. The immune system in health and disease.* Fourth edition. 1999
- Kawai, T., Seki, M., Hiromatsu, K., Eastcott, J., Watts, G., Sugai, M., Smith, D., Porcelli, S., Taubman, M. Selective diapedesis of Th1 cells induced by endothelial cell RANTES. *J. Immunol.* 1999; 163: 3269-3278
- Kohem, C., Brezinschek, R., Wisbey, H., Tortorella, C., Lipsky, P., Oppenheimer-Marks, N. Enrichment of differentiated CD45RBdim, CD27- memory T cells in the peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1996, 39 (5): 844-54
- Koppelman, B., Cresswell, P. Rapid nonlysosomal degradation of assembled HLA Class II glycoproteins incorporating a mutant DR  $\alpha$ -chain. *J. Immunol.* 1990; 145 (8): 2730-2736
- Kreisel, D., Krasinskas, A., Krupnick, A., Gelman, A., Balsara, K., Popma, S., Riha, M., Rosengard, A., Turka, L., Rosengard, B. Vasculae endothelium does not activate CD4+ direct allorecognition in graft rejection. *J. Immunol.* 2004; 173: 3027-3034
- Lapierre, L., Fiers, W., Pober, J. Three distinct classes of regulatory cytokines control endothelial cell MHC antigen expression. Interactions with immune  $\gamma$  interferon differentiate the effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin from those of leukocyte  $\alpha$  and fibroblast  $\beta$  interferons. *J. Exp. Med.* 1988; 167: 794-804
- Maldonado, A., Mueller, Y., Thomas, P., Bojczuk, P., O'Connors, C., Katsikis, P. Decreased effector memory CD45RA+CD62L- CD8+ T cells and increased central memory CD45RA-CD62L+ CD8+ T cells in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Research Therapy.* 2003, 5 (2): R91-R96
- Mantovani, A., Bonecchi, R., Locati, M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 907-918
- Marelli-Berg, F., Frasca, L., Weng, L., Lombardi, G., Lechler, R. Antigen recognition influences transendothelial migration of CD4+ T cells. *J. Immunol.* 1999; 162: 696-703

- Marfaing-Koka, A., Devergne, O., Gorgone, G., Portier, A., Schall, T., Galanaud, P., Emilie, D. Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN- $\gamma$  plus TNF- $\alpha$  and inhibition by IL-4 and IL-13. *J. Immunol.* 1995; 154: 1870-1878
- Masuyama, J., Berman, J., Cruikshank, W., Morimoto, C., Center, D. Evidence for recent as well as long term activation of T cells migrating through endothelial cell monolayers *in vitro*. *J. Immunol.* 1992; 148 (5): 1367-1374
- Meissner, A., Zilles, O., Varona, R., Jozefowski, K., Ritter, U., Marquez, G., Hallmann, R., Körner, H. CC chemokine ligand 20 partially controls adhesion of naive B cells to activated endothelial cells under shear stress. *Blood.* 2003; 102: 2724-2727
- Melrose, J., Tsurushita, N., Liu, G., Berg, E. IFN- $\gamma$  inhibits activation-induced expression of E- and P-selectin on endothelial cells. *J. Immunol.* 1998; 161: 2457-2464
- Middleton, J., Patterson, A., Gardner, L., Schmutz, C., Ashton, B. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood.* 2002; 100: 3853-3860
- Millán, J., Hewlett, L., Glyn, M., Toomre, D., Clark, P., Ridley, A. Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat. Cell Biol.* 2006; 8 (2); 113-123
- Miyasaka, M., Tanaka, T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4: 360-370
- Mohan, K., Ding, Z., Hanly, J., Issekutz, T. IFN- $\gamma$ -inducible T cell  $\alpha$  chemoattractant is a potent stimulator of normal human blood T lymphocyte transendothelial migration: differential regulation by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . *J. Immunol.* 2002; 168: 6420-6428
- Mora, J., von Andrian, U. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *TRENDS Immunol.* 2006; 27 (5): 235-243
- Murdoch, C., Monk, P., Finn, A. CXC chemokine receptor expression on human endothelial cells. *Cytokine.* 1999; 11 (9): 704-712
- Nagira, M., Imai, T., Yoshida, R., Takagi, S., Iwasaki, M., Baba, M., Tabira, Y., Akagi, J., Nomiyama, H., Yoshie, O. A lymphocyte-specific CC chemokine, secondary lymphoid tissue chemokine (SLC), is a highly efficient chemoattractant for B cells and activated T cells. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 1516-1523
- Naves, R., Reyes, L., Roseblatt, M., Jacobelli, S., González, A., Bono, M.R. Lymphoid B cells induce NF- $\kappa$ B activation in high endothelial cells from human tonsils. *Int. Immunol.* 2006; 18: 259-267
- Olson, T., Ley, K. Chemokine and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002; 283: R7-R28

- Palmeri, D., Zuo, F.R., Rosen, S., Hemmerich, S. Differential gene expression profile of human tonsil high endothelial cells: implications for lymphocyte trafficking. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75: 910-927
- Pietschmann, P., Cush, J., Lipsky, P., Oppenheimer-Marks, N. Identification of subsets of human T cells capable of enhanced transendothelial migration. *J. Immunol.* 1992; 149: 1170-1178
- Postigo, A., Sánchez-Mateos, P., Lazarovits, A., Sánchez-Madrid, F., Landázuri, M.  $\alpha 4\beta 7$  integrin mediates B cell binding to fibronectin and vascular cell adhesion molecule-1. *J. Immunol.* 1993; 151 (5): 2471-2483
- Poupot, M., Fournié J. Spontaneous membrane transfer through homotypic synapses between lymphoma cells. *J. Immunol.* 2003; 171: 2517–2523.
- Powell, N., Humbert, M., Durham, S., Assoufi, B., Kay, A., Corrigan, C. Increased expression of mRNA encoding RANTES and MCP-3 in the bronchial mucosa in atopic asthma. *Eur. Respir. J.* 1996; 9: 2454-2460
- Proudfoot, A. The biological relevance of chemokine-proteoglycan interactions. *Biochem. Soc. Transactions.* 2006; 34 (3): 422-426
- Raposo, G., Nijman, H., Stoorvogel, W., Leijendekker, R., Harding, C., Melief, C., Geuze, H. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 1161-1172
- Reyes, L., Escobar, P., Bono, M.R., Roseblatt, M. Adhesion of B cell lines to endothelial cells from human lymphoid tissue modulates tyrosine phosphorylation and endothelial cell activation. *J. Immunol.* 2002; 169: 5881-5888
- Rialland, P., Lankar, D., Raposo, G., Bonnerot, C., Hubert, P. BCR-bound antigen is targeted to exosomes in human follicular lymphoma B-cells. *Biol. Cell.* 2006; 98: 491-501
- Röhnelt, R., Hoch, G., Reib, Y., Engelhardt, B. Immunosurveillance modelled *in vitro*: naive and memory T cells spontaneously migrate across unstimulated microvascular endothelium. *Int. Immunol.* 1997; 9 (3): 435-450
- Roseblatt, M., Bono, M.R. Functional consequences of immune cell adhesion to endothelial cells. *Curr. Pharm. Des.* 2004; 10: 109-120
- Rothermel, A., Wang, Y., Schechner, J., Mook-Kanamori, B., Aird, W., Pober, J., Tellides, G., Johnson, D. Endothelial cells present antigens *in vivo*. *BMC Immunol.* 2004; 5: 1-15
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999; 401: 708-712
- Sallusto, F., Geginat, J., Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22: 745–63

- Savage, C., Brooks, C., Harcourt, G., Picard, J., King, W., Sansom, D., Willcox, N. Human vascular endothelial cells process and present autoantigen to human T cell lines. *Int. Immunol.* 1995; 3: 471-479
- Siveke, J., Hamann, A. Cutting Edge: T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J. Immunol.* 1998; 160: 550-554
- Scimone, M.L., Felbinger, T., Mazo, I., Stein, J., von Andrian, U., Wening, W. CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central memory cells, but not naive T cells, in peripheral lymph nodes. *J. Exp. Med.* 2004; 199 (8): 1113-1120
- Springer, T. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994; 76: 301-314
- Stevens, S., Weissman, I., Butcher, E. Differences in the migration of B and T lymphocytes: organ-selective localization *in vivo* and the role of lymphocyte-endothelial cell recognition. *J. Immunol.* 1982; 128 (2): 844-851
- Taub, D., Proost, P., Murphy, W., Anver, M., Longo, D., Damme, J., Oppenheim, J. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 1370-1376
- Tay, S., McCormack A., Rose, M. Effect of cognate human CD4<sup>+</sup> T cell and endothelial cell interactions upon chemokine production. *Transplantation.* 2004; 78: 987-994
- Ueki, Y., Eguchi, K., Shimada, H., Nakashima, M., Ida, H., Miyaly, S., Nagataki, S., Tominaga, Y. Increase in adhesion molecules on CD4<sup>+</sup> cells and CD4<sup>+</sup> cell subsets in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 1994; 21 (6): 1003-1010
- van Buul, J., Hordijk, P. Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 824-833
- von Andrian, U., Mempel, T. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 867-878
- Warnock, R., Campbell, J., Dorf, M., Matsuzawa, A. The role of chemokines in the microenvironmental control of T *versus* B cell arrest in Peyer's patch high. *J. Exp. Med.* 2000; 191 (1): 77-88
- Weber, C., Fraemohs, L., Dejana, E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7: 467-477
- Wubbolts, R., Leckie, R., Veenhuizen, P., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.W., Geuze, H., Stoorvogel, W. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (13): 10963-10972
- Zlotnik, A., Yoshie, O. Chemokines: a new classification review system and their role in immunity. *Immunity.* 2000; 12: 121-127

**Anexo.** Lista completa de genes presentes en la membrana de nylon Oligo GEArray Human OHS-022

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	RPS27A	AGTRL1	BDNF	CXCR5	C20orfL75	C5	CCBP2	CCL1
2	CCL11	CCL13	CCL15	CCL16	CCL17	CCL18	CCL19	CCL2
3	CCL20	CCL21	CCL23	CCL24	CCL25	CCL26	CCL27	CCL28
4	CCL3	CCL4	CCL4L1	CCL5	CCL7	CCL8	CCR1	CCR2
5	CCR3	CCR4	CCR5	CCR6	CCR7	CCR8	CCR9	CCRL1
6	CCRL2	CKLF	CMTM1	CMTM2	CMTM3	CMTM4	CMTM5	CMTM6
7	CMTM7	CMTM8	CMKLR1	CXCR7	CSF3	CX3CL1	CX3CR1	CXCL1
8	CXCL10	CXCL11	CXCL12	CXCL13	CXCL14	CXCL16	CXCL2	CXCL3
9	CXCL5	CXCL6	CXCL9	CXCR3	CXCR4	CXCR6	CYFIP2	TYMP
10	EPO	DARC	GDF5	GPR109B	CCR10	GPR31	C5AR1	GPR81
11	HIF1A	IL13	IL16	IL18	IL1A	IL4	IL8	IL8RA
12	IL8RB	LTB4R	MMP2	MMP7	MYD88	NFKB1	PF4	PPBP
13	PRL	RGS13	RGS3	SCYE1	SDF2	SLIT2	TCP10	TLR2
14	TLR4	TNF	TNFRSF1 A	TNFSF14	TREM1	TREM2	VHL	XCL1
15	XCR1	Blank	PUC18	Blank	Blank	AS1R2	AS1R1	AS1
16	GAPDH	B2M	HSP90AB1	HSP90AB1	ACTB	ACTB	BAS2C	BAS2C