



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE
PROSTGRADO

Rol del receptor 3 de dopamina en la respuesta citotóxica generada en linfocitos T CD8⁺

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Grado de:

Magister en Ciencias Biológicas

por

Ornella Chovar-Vera

Director de Tesis:

Dr. Mario Rosemblatt

Co-director de Tesis:

Dr. Álvaro Lladser y Dr. Rodrigo Pacheco

2018

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de magister presentada por la candidata.

Ornella Chovar Vera

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas mención Biología molecular, celular y neurociencias en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Mario Roseblatt

Co-Director de Tesis

Dr. Álvaro Lladser

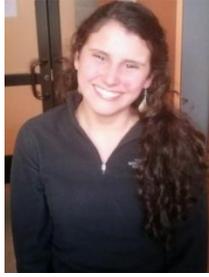
Dr. Rodrigo Pacheco

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Daniela Sauma

Dr. Elías Utreras

BIOGRAFÍA



Ornella Chovar Vera nació el 18 de Junio del año 1989.

Sus estudios de educación básica los realizó desde kínder a 7° año básico en la escuela Gabriela Mistral F-550 en la comuna de Concepción, finalizando su enseñanza básica en la escuela Ramón Freire F-674, en la comuna de Coronel. Continuó sus estudios en el liceo Experimental A-37 en la comuna de Concepción egresando el año 2006.

El año 2008 ingresó a la Universidad de Concepción a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Marina y Acuicultura, obteniendo en el año 2013 el grado de Licenciatura en Biotecnología Marina y Acuicultura, durante ese mismo año desarrolló su tesis titulada “Evaluación del colágeno IV, lectina tipo C y metaloproteasa en la respuesta inmune innata del abalón rojo *Haliotis Rufescens*” bajo la tutela del Dr. Cristian Gallardo.

Desde el 2016 a la fecha ha cursado el programa de Magister en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencia de la Universidad de Chile, desarrollando su tesis en el laboratorio de Inmunoterapia Génica a cargo del Dr. Alvaro Lladser y en cotutela con el Dr. Rodrigo Pacheco.

AGRADECIMIENTOS

Durante este proceso que a ratos quise y a otros odie, la compañía y apoyo de diferentes personas lo hizo mucho más fácil y no puedo comenzar por otra persona que no sea él, Iván mi compañero de vida que de diferentes maneras me ha apoyado, escuchando con cariño mis pataletas cuando las cosas no funcionan o alegrándose con los pequeños logros, gracias por tu amor comprensivo, cariñoso e incondicional, este pequeño logro también es tuyo.

Quiero agradecerle a mis papas, porque a pesar de la distancia y de no poder vernos todo el tiempo que quisiéramos siempre encuentran la forma de estar al tanto y presentes en mi vida, dulces compañeros de triunfos pero sobretodo de mis derrotas, gracias por los valores, el amor y la comprensión que a diario me regalan. Los amo mucho.

Y claramente en esta parte no puedo dejar de mencionar a mis compañeros de laboratorio...mis itegeanos. Cuando comencé hace tres años no sabía nada y no es falsa modestia porque de verdad no sabía nada, Ernesto me recibió y enseñó muchas de las cosas que sé, te agradezco los conocimientos que generosamente me entregaste, las risas y los chocolates cuando estaba derrotada...a tu manera siempre me apoyaste. A So y Eve por su amistad siempre están ahí en lo experimental y en la vida, en las buenas en las malas, con caña sin caña, tantos buenos momentos, las quiero mucho. También agradecerle a Pedro por las risas..que no han sido pocas y a Pablo por su roja amistad. Xime y Diego por la buena onda, todos siempre dispuestos a ayudar, a escuchar, son excelentes compañeros les tengo mucho cariño. Gracias por todo y perdón por distraerlos.

Y por último a mis tutores, Álvaro muchas gracias por permitirme trabajar en su laboratorio y compartir con todas esas grandes personas, aprendí mucho y me cargué de

experiencias que me hicieron crecer no solo en lo académico y a Rodrigo por su gran voluntad y dedicación para resolver dudas.

INDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|------------|
| BIBLIOGRAFÍA | II |
| AGRADECIMIENTOS | III |
| INDICE DE FIGURAS | VI |
| LISTA DE ABREVIATURAS | VII |
| RESUMEN | IX |
| ABSTRACT | X |
| INTRODUCCIÓN | 10 |
| Sistema inmune | 10 |
| Adquisición del perfil citotóxico por linfocitos T CD8 ⁺ | 12 |
| Mecanismos efectores de los linfocitos T citotóxicos. | 13 |
| Red sistema inmune - sistema nervioso. | 14 |
| Sistema dopaminérgico. | 17 |
| Dopamina como modulador de la respuesta inmune | 19 |
| HIPOTESIS Y OBJETIVOS | 20 |
| OBJETIVOS | 20 |
| Objetivo general | 20 |
| Objetivos específicos | 20 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| Animales | 21 |

| | |
|--|-----------|
| Purificación de linfocitos T CD8 ⁺ | 21 |
| Activación de linfocitos T CD8 ⁺ | 22 |
| Tinción de superficie e intracelular de linfocitos T CD8 ⁺ | 22 |
| Determinación <i>in vitro</i> de la proliferación en linfocitos T CD8 ⁺ mediante la tinción con CFSE | 24 |
| Evaluación <i>in vitro</i> de la citotoxicidad de linfocitos T CD8 ⁺ | 24 |
| Transferencia de linfocitos T CD8 ⁺ y vacunación | 25 |
| Preparación ADN plasmidial | 26 |
| Vacunación | 26 |
| Evaluación <i>ex vivo</i> de la producción de citoquinas en linfocitos T CD8 ⁺ en fase efectora | 26 |
| Inoculación de células tumorales | 27 |
| Evaluar <i>in vivo</i> la recirculación de linfocitos T CD8 ⁺ hacia órganos linfoides secundarios. | 28 |
| Análisis estadístico | 28 |
| RESULTADOS | 29 |
| I.Evaluar el papel del D3R en la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ <i>in vitro</i>. | 29 |
| II.Determinar el papel del D3R expresado en linfocitos T CD8⁺ en la respuesta citotóxica <i>in vivo</i> en un contexto antitumoral. | 38 |
| II.1 Evaluar el papel del D3R expresado en linfocitos T CD8 ⁺ en la expansión clonal y la formación de un perfil citotóxico <i>in vivo</i> en el contexto de una respuesta antitumoral. | 38 |
| II.2. Evaluar el papel del D3R expresado en linfocitos T CD8 ⁺ en su recirculación hacia órganos linfoides secundarios <i>in vivo</i> . | 43 |
| DISCUSIÓN | 45 |
| CONCLUSIONES | 52 |
| PROYECCIONES | 52 |
| BIBLIOGRAFÍA | 53 |

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1** : Evaluación in vitro de la producción de citoquinas en linfocitos OT I WT y OT I D3RKO activados en ausencia o presencia de IL-2. **32**
- Figura 2** : Determinación in vitro de la proliferación de linfocitos OT I WT y OT I D3RKO activados y cultivados en ausencia o presencia de IL-2. **34**
- Figura 3:** Evaluación in vitro de la capacidad citotóxica de linfocitos OT I WT y OT I D3RKO. **37**
- Figura 4** : Evaluación in vivo de la producción de citoquinas y expansión clonal en linfocitos efectores OT I WT y OT I D3RKO generados mediante vacunación. **40**
- Figura 5:** Protección tumoral generada en grupo de ratones transferido con linfocitos OT I WT u OT I D3RKO y vacunados con pVAX-OVA. **42**
- Figura 6:** Evaluación de patrones de migración mediante la detección de linfocitos OT I WT y OT I D3RKO cotransferidos. **44**
- Figura 7:** Modelo propuesto. **51**

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

APC: Célula Presentadora de Antígenos.

CD: Cluster de Diferenciación.

CFSE: Ester de Succinimidil-Carboxifluoresceína.

CTL: Linfocito T Citotóxico.

DA: Dopamina.

DAR: Receptor de dopamina.

DC: Células dendríticas.

IMF: Intensidad Media de Fluorescencia.

IFN- γ : Interferón- γ .

IL: Interleuquina.

MHC-I: Complejo Principal de Histocompatibilidad –I.

MHC-II: Complejo Principal de Histocompatibilidad –II.

NK: Célula asesina natural.

NL: Nódulo Linfático.

OVA: Ovoalbúmina.

PBS: Tampón Fosfato Salino.

PMA: Forbol-12 Miristato 13 Acetato.

SFB: Suero Fetal Bovino.

SNC: Sistema Nervioso Central.

TCR: Receptor de linfocitos T.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral- α .

WT: Wild Type (Tipo Silvestre).

RESUMEN

El sistema nervioso y el sistema inmune se encuentran íntimamente relacionados comunicándose bidireccionalmente mediante citoquinas, neuropéptidos y neurotransmisores, como la dopamina. Este neurotransmisor ejerce su efecto a través de cinco receptores dopaminérgicos que poseen diferentes grados de afinidad, contando con la mayor afinidad el receptor 3 (D3R). Su presencia se ha reportado en diferentes células del sistema inmune. La estimulación del D3R promueve la producción de IFN- γ en linfocitos T CD4⁺, favoreciendo su diferenciación a un perfil Th1. Sin embargo, el rol de este receptor en los linfocitos T CD8⁺ aún no se ha estudiado a cabalidad.

En esta tesis se estudió la incidencia del D3R en la formación del perfil citotóxico en linfocitos T CD8⁺, que poseen un TCR transgénico específico para el péptido OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎ alojado sobre el MHC de clase I H2-K^b (linfocitos OT-I). La diferenciación *in vitro* muestra que la carencia del D3R en linfocitos OT-I (OT-I D3RKO) resulta en una reducción significativa en la producción de IFN- γ , TNF- α , IL-2 y en la expresión de CD25 (cadena α del receptor de IL-2) en respuesta a la estimulación con péptido OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎. Estas deficiencias se revierten al añadir IL-2 exógena a los cultivos, sugiriendo que el mecanismo de acción por el cual el D3R favorece la diferenciación hacia un fenotipo efector productor de IFN- γ y TNF- α ocurre a través de la producción de IL-2. Concordante con lo anterior, se observó que la expresión del D3R en linfocitos OT-I promueve la expansión clonal y la protección antitumoral frente a melanoma.

En conjunto los resultados obtenidos en linfocitos T CD8⁺ sugieren que el D3R promueve la formación de un perfil citotóxico, induciendo la producción de IFN- γ y favoreciendo una alta tasa de expansión clonal, lo que conlleva a una mayor sobrevida frente a un desafío tumoral.

ABSTRACT

The nervous system and the immune system are intimately related, communicating bi-directionally through cytokines, neuropeptides and neurotransmitters. Dopamine is a neurotransmitter that exerts its effect through five dopaminergic receptors which display different degrees of affinity. The D3R, which display the highest affinity for dopamine, has been found expressed in CD4⁺ T cells, where its stimulation promotes high production of IFN- γ , favoring the acquisition of the Th1 profile. However, the role of this receptor in CD8⁺ T lymphocytes has not yet been fully studied.

In this thesis the role of D3R in the acquisition of the cytotoxic profile by CD8⁺ T lymphocytes was studied. For this purpose, in this thesis CD8⁺ T-cells bearing a transgenic TCR specific for the recognition of the OVA peptide₍₂₅₇₋₂₆₄₎ over the class I MHC H2-K^b (OT-I lymphocytes) were used. *In vitro* differentiation experiments show that lack of D3R in OT-I lymphocytes (OT-I D3RKO) results in a significant reduction in the production of IFN- γ , TNF- α and on the expression of CD25 (α chain of the IL-2 receptor) in response to the stimulation with OVA peptide₍₂₅₇₋₂₆₄₎. These effects were reversed by adding exogenous IL-2 into the cultures, suggesting a mechanism by which D3R favors the differentiation towards an effector phenotype through the production of IL-2. *In vivo* experiments show that D3R expressed on OT-I lymphocytes favors a higher clonal expansion and thereby an stronger protection against melanoma tumors.

The results obtained suggest that D3R promotes the formation of a more efficient cytotoxic profile capable of producing higher percentages of IFN- γ and higher rates of clonal expansion, which leads to greater survival in the face of a tumor challenge.

INTRODUCCIÓN

Sistema inmune

El sistema inmune está conformado por una amplia red de células residentes y circulantes, proteínas y péptidos que protegen al organismo de patógenos y de células tumorales, regulando además otras funciones fisiológicas. Este se encuentra conformado por el sistema inmune innato y adaptativo, los que trabajan en conjunto para proteger al organismo y regular una variedad de funciones homeostáticas (Mackie et al. 2018).

Frente a la presencia de un patógeno el sistema inmune innato responde rápidamente (Netea et al. 2016). Esta rama del sistema inmune está compuesta por las barreras físicas y químicas que bloquean la entrada de microbios, proteínas sanguíneas así como diferentes tipos celulares. Entre estas células del sistema inmune innato se encuentran células mieloides como monocitos macrófagos, células dendríticas y granulocitos (eosinófilos y neutrófilos) así como células linfoides innatas (ILCs) (Nowarski et al. 2013). Con respecto a estas últimas cabe destacar que, de acuerdo a su similitud con los subgrupos de células T, tanto a nivel de factores de transcripción como en la producción de citoquinas, se han clasificado en ILCs1, ILCs2 e ILCs3, que son funcionalmente análogas a los linfocitos Th1, Th2 y Th17 (Ebbo et al. 2017). En su conjunto se ha propuesto que estas células interactúan generando una amplia red que regula la respuesta adaptativa ante diversos estímulos (Masi et al. 2017; Rivera et al. 2016).

En el caso de la respuesta inmune adaptativa los linfocitos B y T son células efectoras claves expresando en su superficie receptores que reconocen de manera altamente específica un amplio repertorio de antígenos (Waters et al. 2018). En el caso de los linfocitos B, estos son activados en los órganos linfoides secundario luego de la unión del antígeno al receptor de células B (BCR en inglés B-cell receptors), lo que gatilla un

serie de señales intracelulares que median su expansión, diferenciación clonal y secreción de anticuerpos (Romero-Ramírez et al. 2018). Al mismo tiempo, cuentan con la capacidad de internalizar el antígeno induciendo una serie de cambios fenotípicos y migratorios. Se ha descrito que 6 horas después de haber reconocido e internalizado el antígeno, los linfocitos B aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras como CD86 en su superficie y presentan péptidos derivados de la degradación del antígeno internalizado en complejos de histocompatibilidad de clase II (Turner et al. 2017).

La inmunidad dirigida por linfocitos T cuenta con dos poblaciones que se caracterizan por expresar en su superficie la proteína CD4 o CD8 (Fehres et al. 2014). Los linfocitos T CD4⁺ poseen la capacidad de diferenciarse en varios subconjuntos de células llamadas *T-helper* 1 (Th1), Th2, Th17, Thf (foliculares) y Treg (células T reguladoras). Su diferenciación funcional es inducida mediante la estimulación del receptor de células T (TCR) por el complejo péptido-MHC y regulada por factores ambientales, la combinación particular de citoquinas promueve la expresión de factores de transcripción maestros como T-bet, GATA-3, Ror γ t, Bcl6 o Foxp3 gatillando la diferenciación Th1, Th2, Th17, Thf o Treg respectivamente (Takeuchi and Saito 2017).

En el caso de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos estos pueden ser clasificados en los de tipo1 (Tc1), tipo2 (Tc2) y tipo17 (Tc17), caracterizados por producir IFN- γ , interleuquina-4 (IL-4) e IL-17 respectivamente, sin embargo, el último grupo mencionado cuenta con una menor capacidad citotóxica con respecto a los demás (Flores-Santibáñez et al. 2015).

Tanto los linfocitos T CD4⁺ como los linfocitos T CD8⁺ son activados mediante la presentación de antígeno realizada por células presentadoras de antígeno (APC) como las células dendríticas (CD), las que cuentan en su superficie con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Los péptidos provenientes de la degradación

antigénica son cargados moléculas de MHC de clase II y I y reconocidos por los linfocitos T CD4⁺ o T CD8⁺ respectivamente (Roche and Furuta 2015). Estos últimos poseen como principal función el control y la erradicación tanto de células infectadas con patógenos intracelulares como de células tumorales (van den Broek, Borghans, and van Wijk 2018; Valbon, Condotta, and Richer 2016). Para ello, es esencial la activación y diferenciación de células T CD8⁺ vírgenes hacia un perfil efector o linfocitos T citotóxicos (CTLs) capaces de liberar moléculas citotóxicas como granzima B, perforina, y citoquinas como IFN- γ o TNF- α entre otras (Laidlaw, Craft, and Kaech 2016; Mittrücker, Visekruna, and Huber 2014).

Adquisición del perfil citotóxico por linfocitos T CD8⁺

La diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes a linfocitos T citotóxicos ocurre como resultado de tres señales; la primera es la unión del TCR con el complejo MHC-I/péptido que se encuentra en las APC (Cruz-Adalia et al. 2017; Mittrücker et al. 2014; Valbon et al. 2016). La segunda señal, es la interacción entre moléculas coestimuladoras como CD80 o CD86 presentes en la superficie de las APC con la molécula CD28 expresada en los linfocitos T CD8⁺ efectores (Porciello et al. 2018; Valbon et al. 2016). Al ocurrir la activación, la señal número 3 que corresponde a las citoquinas presentes en el entorno inflamatorio, permitirán la óptima acumulación de linfocitos T CD8⁺ asegurando su proliferación y una respuesta prolongada a la IL-2 (Kim and Harty 2014; Valbon et al. 2016). Se ha descrito que la señalización mediada por IL-2 durante la respuesta inmune potencia la expansión y diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ recientemente activados (Boyman and Sprent 2012). Además, esta interleuquina influye en la respuesta citotóxica desarrollada por los linfocitos T CD8⁺ al inducir la expresión de IFN- γ , TNF α , moléculas efectoras citolíticas como granzima B y perforina, lo que promueve la destrucción eficaz de la célula blanco (Rollings et al. 2018; Ross and Cantrell 2018).

Producida mayoritariamente por los linfocitos T CD4⁺ y en menor tasa por los linfocitos T CD8⁺, la IL-2 media su efecto de forma autocrina y paracrina (Ye, Brand, and Zheng 2018) a través de receptores conformados por tres subunidades, IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) e IL-2R γ (CD132). La expresión de las tres cadenas es necesaria para la unión de alta afinidad con la IL-2 (Ross and Cantrell 2018), sin embargo, esta interleuquina es capaz de interactuar con baja afinidad solo con IL-2R α y con afinidad media con el heterodímero IL-2R γ -IL-2R β (Spolski, Li, and Leonard 2018).

La asociación heterotrimérica de las cadenas $\alpha\beta\gamma$ se expresa transitoriamente en células activadas incluyendo linfocitos T, B, NK y CD, mientras que el complejo heterodimérico $\beta\gamma$ se expresa mayoritariamente en células T en reposo, linfocitos T CD8⁺ de memoria y NK (Ye et al. 2018). En cuanto a la cadena IL-2R α , su expresión es inducida luego de la activación de los linfocitos y convierte los receptores de afinidad intermedia en receptores de alta afinidad (Spolski et al. 2018). La interacción entre el IL-2R α con la IL-2 resulta en el cambio conformacional de esta última favoreciendo el reclutamiento e interacción de IL-2R β , luego IL-2R γ se une formando el receptor de alta afinidad (Spolski et al. 2018).

Mecanismos efectores de los linfocitos T citotóxicos.

Luego del reconocimiento del complejo MHC-I/péptido por parte de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes estos se activan y experimentan una profunda expansión clonal y diferenciación hacia un perfil efector citotóxico (CTLs) (Klein-Hessling et al. 2017; Zhang et al. 2010). Estas células efectoras son capaces de matar y erradicar infecciones o células malignas proporcionando protección contra infecciones o cáncer. Los CTLs reconocen su célula blanco de forma dependiente de TCR, estableciendo contacto directo célula a célula y permitiendo así que ocurra la sinapsis inmunológica (Halle, Halle, and Förster 2017).

Los CTLs pueden eliminar su célula blanco a través de diferentes mecanismos efectores. Uno de ellos es la vía Fas, donde la interacción entre el ligando de Fas (FasL) presente en los CTLs y Fas situado en la célula blanco genera la activación de las caspasas y posterior muerte por apoptosis (Ou-Yang et al. 2012). Otro mecanismo rápido y efectivo en la eliminación de células blanco es la exocitosis de gránulos líticos ricos en perforina y granzima (Martínez-Lostao, Anel, and Pardo 2015). El reconocimiento del complejo péptido/MHC-I por parte del TCR causa una serie de cambios celulares en los CTLs que permiten la reorientación del centrosoma y la reorganización de la red de microtúbulos, gatillando la polarización de los gránulos citotóxicos hacia la célula blanco. Esto promueve el acoplamiento del centrosoma y la fusión del gránulo con la membrana plasmática de los CTLs permitiendo así la liberación de su contenido sobre la célula blanco. La perforina liberada genera los poros a través de los cuales ingresan las granzimas al citoplasma de la célula diana para inducir apoptosis (Kapnick et al. 2017; Ou-Yang et al. 2012).

La eliminación de los patógenos da lugar a la etapa de contracción, donde la mayoría de los linfocitos T CD8⁺ efectores muere por apoptosis. Solo sobrevive entre 5 a 10% de las células T CD8⁺ activadas, las cuales formarán la memoria permitiendo en el futuro desencadenar respuestas más potentes, rápidas y eficaces ante una exposición al mismo antígeno (Kaech and Cui 2012; Laidlaw et al. 2016).

Red sistema inmune - sistema nervioso.

El sistema nervioso central y el sistema inmune son las principales formas de interacción sensorial mediante las cuales el organismo es capaz de percibir, integrar y responder a los desafíos ambientales, contando ambos sistemas con la capacidad de recordar eventos anteriores, permitiendo su adaptación a los cambios (Veiga-Fernandes and Mucida 2016). A pesar que ambos sistemas realizan funciones únicas, éstos parecen

no trabajar de forma independiente, sino que por el contrario, parecen estar íntimamente relacionados (Wrona 2006) mediante circuitos bidireccionales que involucran la liberación de mensajeros químicos como citoquinas, quimioquinas, neuropéptidos y neurotransmisores (Kioussis and Pachnis 2009).

Se han reportado tres vías a través de las que cuales el sistema nervioso central (SNC) puede influir en la respuesta generada por el sistema inmune (Takenaka, Guerreschi, and Basso 2017):

1) El eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA): mediante esta vía, la liberación de glucocorticoides (Takenaka et al. 2017) en la glándula suprarrenal promovería cambios en la respuesta adaptativa sistémica al inhibir la producción de IL-12 en macrófagos y células dendríticas. Dado que IL-12 es necesaria para la generación de linfocitos Th1 y es antagónica para el desarrollo de respuestas Th2, los glucocorticoides inducidos por el eje HPA favorecerían la diferenciación de linfocitos tipo Th2 (Sternberg 2006).

2) El reflejo inflamatorio desencadenado por el SNC en respuesta a niveles elevados de citoquinas inflamatorias en sangre: mediante la estimulación del nervio vago se promueve la actividad del nervio esplénico, el cual secreta norepinefrina (NE) en el bazo (Pavlov and Tracey 2012; Takenaka et al. 2017). Esta catecolamina puede modular posteriormente la actividad de diferentes células del sistema inmune tales como linfocitos T, B o NK (Slota et al. 2015). Como ejemplo de lo anterior es destacable como la NE promueve un aumento de la adhesión de linfocitos T CD8⁺ *in vitro* (Strell et al. 2009).

3) La inervación simpática y parasimpática de los órganos linfoides primarios (timo y médula ósea) y secundarios (nódulos linfáticos y bazo) (Kuol et al. 2018): En cuanto a esto, a través de ensayos de inmunotinción de tirosina hidroxilasa (TH) (limitante en la síntesis de catecolaminas), se ha detectado una densa red de fibras nerviosas simpáticas

que rodean los principales vasos sanguíneos que nutren la médula ósea. De manera similar, mediante detección de colina acetiltransferasa (ChAT; cuya función enzimática es promover la síntesis del neurotransmisor acetilcolina), también se han encontrado fibras parasimpáticas en los órganos linfoides primarios (Jung, Levesque, and Ruitenberg 2017).

En cuanto a lo descrito en órganos linfoides secundarios, se han encontrado inervaciones simpáticas en el bazo. Estas fibras ingresan a través del nervio esplénico y se distribuyen en compartimentos específicos como la pulpa blanca, extendiéndose a través de la arteriola central hacia la vaina linfática periarteriolar (PALS) y el folículo circundante, estableciendo contacto directo con células del sistema inmune (Cano et al. 2001; Jung et al. 2017). Es importante notar en este punto de que tanto las células del sistema inmune adaptativo como las del sistema inmune innato expresan receptores específicos y funcionales para NE y otros neurotransmisores producidos por el sistema nervioso periférico.

En conjunto con lo anterior y como se describirá en las siguientes secciones se ha reportado que células inmunes poseen la maquinaria molecular requerida para responder a diferentes factores neuronales incluyendo receptores para neurohormonas, neuropéptidos y neurotransmisores (Sternberg 2006). Específicamente, se ha evidenciado que la dopamina es un neurotransmisor clave en la comunicación entre el sistema nervioso y el sistema inmune incidiendo en la respuesta desarrollada en una amplia variedad de células inmunes como linfocitos T y B, células dendríticas, monocitos, macrófagos, microglía y neutrófilos (Marino and Cosentino 2016).

Sistema dopaminérgico.

La dopamina corresponde a uno de los principales neurotransmisores presentes en el SNC, involucrada en una amplia variedad de funciones tales como comportamiento, control de movimiento, regulación endocrina, función cardiovascular, gastrointestinal (Levite, Marino, and Cosentino 2017; Pinoli and Marino 2017; Yan et al. 2015) y la modulación de funciones fisiológicas en órganos y/o tejidos periféricos (Levite 2016) afectando la presión sanguínea, balance de sodio, homeostasis de glucosa entre otras (Pinoli and Marino 2017).

Al igual que la norepinefrina y la epinefrina la dopamina se clasifica como catecolamina, es decir, es un grupo químico que contiene un grupo catecol o 3,4 dihidroxifenilo y una amina de cadena lateral (Takenaka et al. 2017). El primer paso para su síntesis es la transformación de L-tirosina a levodopa (L-DOPA) por acción de la enzima TH. Luego, la actividad de la enzima DOPA descarboxilasa (DDC) cataliza la descarboxilación de L-DOPA para dar lugar a la dopamina, la cual es a su vez, precursora de la adrenalina y NE (Arreola et al. 2016; Pinoli and Marino 2017).

Diferentes células que participan de la respuesta inmune innata o adaptativa cuentan con la capacidad de sintetizar y liberar al medio extracelular neurotransmisores como la dopamina, provocando efectos paracrinos y autocrinos (Levite et al. 2017; Pinoli and Marino 2017; Sarkar et al. 2010). Ejemplo de lo anterior, es lo reportado en células dendríticas humanas y murinas, las que expresan la maquinaria necesaria para sintetizar y almacenar dopamina. Se ha visto que este neurotransmisor puede ser liberado por las células dendríticas ante el estímulo de maduración o presentación de antígenos (Pacheco 2018). De igual forma los linfocitos T reguladores humanos expresan constitutivamente TH y contienen dopamina y otras catecolaminas, además expresan transportadores de

monoaminas vesiculares 1 y 2 (VMAT-1 y VMAT-2) que permiten la acumulación de catecolaminas en vesículas (Pacheco, Contreras, and Zouali 2014).

El efecto de la dopamina es mediado a través de receptores dopaminérgicos (DAR), que pertenecen a la superfamilia de receptores con 7 dominios transmembrana acoplados a proteína G (GPCR) (Pinoli and Marino 2017). Estos han sido funcionalmente agrupadas en G_{α_s} , G_{α_i} , G_{α_q} , $G_{\alpha_{12}}$, basado en la naturaleza y características funcionales de la subunidad α (Beaulieu and Gainetdinov 2011). A la fecha se han reportado 5 receptores dopaminérgicos, los que cuentan con diferentes niveles de afinidad frente a este neurotransmisor, la mayor de ellas es presentada por el receptor de dopamina D3 (D3R) con un $K_i \approx 27$ nM, seguido por D5R con $K_i \approx 228$ nM, y luego seguidos por D4R, D2R y D1R que poseen $K_i \approx 450, 1705, 2340$ nM respectivamente (Elgueta et al. 2017). De acuerdo a sus propiedades farmacológicas, homología de secuencia aminoacídica y por las vías de señalización a las cuales habitualmente se acoplan, estos receptores han sido clasificados en los de tipo 1 (que considera el D1R y D5R) y los de tipo 2 (D2R, D3R y D4R) (Kassel, Schwed, and Stark 2015).

Los receptores de tipo 1 se acoplan a proteínas G de tipo G_{α_s} , activando la adenilato ciclasa (AC), promoviendo el aumento intracelulares del segundo mensajero adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y la actividad de la proteína kinasa A (PKA). Por otra parte, los receptores de tipo 2 activan proteínas G inhibitoras al acoplarse a $G_{\alpha_i/o}$, lo que conlleva a la inhibición de la AC, evitando la formación AMPC y así provocando la disminución de la actividad de PKA (Beaulieu and Gainetdinov 2011; Elgueta et al. 2017; Levite 2016). Sin embargo, los receptores de tipo 1 y 2 también pueden acoplarse a otras vías de señalización afectando la apertura de canales iónicos o la actividad de otras enzimas como la PI3K (Pacheco et al. 2009; Strange 2002).

Dopamina como modulador de la respuesta inmune

Durante los últimos años la dopamina ha sido descrita como un fuerte regulador de la inmunidad innata y adaptativa (Pacheco 2017). Este efecto es mediado por receptores que se expresan en células del sistema inmune (Kustrimovic et al. 2016) innato como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos (Pinoli and Marino 2017) o adaptativo como las células T. Los DAR poseen una función dinámica de acuerdo al contexto, incidiendo en una amplia gama de funciones (Levite 2016), y mediante dopamina o el uso de agonista estos receptores modulan activación, proliferación, producción de citoquinas (Yan et al. 2015), diferenciación, quimiotaxis y apoptosis (Xue et al. 2018). Por una parte se ha señalado que la estimulación de DAR de tipo 1 inhibe la citotoxicidad de los linfocitos T CD8⁺ y afecta la función y diferenciación de linfocitos T reguladores (Pacheco et al. 2009). Mientras que la estimulación de DAR de tipo 2 como D2R y D3R en linfocitos humanos periféricos activa las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$ que promueven la adhesión de estas células a la matriz extracelular, un paso crítico en la extravasación de los linfocitos T a través de los vasos sanguíneos (Sarkar et al. 2010).

Como se ha señalado el D3R, es el receptor que cuenta con la afinidad más alta por la dopamina y ha sido involucrado fuertemente en procesos inflamatorios (Pacheco 2017). Con respecto a esto, recientemente evidencia genética y farmacológica ha mostrado que la estimulación de D3R en linfocitos T CD4⁺ disminuye la diferenciación hacia el fenotipo Th2 y favorece la inmunidad mediada por células Th1 y Th17 (Contreras et al. 2016; Franz et al. 2015). Por otro lado, en cuanto a la función del D3R en linfocitos T CD8⁺ solo existe evidencia farmacológica, que apunta hacia una función en la migración y proliferación de estas células (Watanabe et al. 2006). Sin embargo, no existe evidencia genética ni farmacológica sobre el papel que este receptor podría tener en la respuesta de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos en modelos *in vivo*.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

De acuerdo a los antecedentes expuestos, en este trabajo se plantea la hipótesis que **el receptor de dopamina D3 expresado en los linfocitos T CD8⁺ promueve la diferenciación hacia linfocitos citotóxicos con potencial antitumoral.**

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el efecto del receptor de dopamina D3 (D3R) en la generación de la respuesta desarrollada en linfocitos T CD8⁺ citotóxicos.

Objetivos específicos:

- I. Evaluar el papel del D3R en la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ *in vitro*.
- II. Determinar el efecto del D3R expresado en linfocitos T CD8⁺ en la respuesta citotóxica *in vivo* en un contexto antitumoral.
 - II.1. Evaluar el papel del D3R expresado en linfocitos T CD8⁺ en la expansión clonal y la formación de un perfil citotóxico *in vivo* en el contexto de una respuesta antitumoral.
 - II.2. Evaluar el papel del D3R expresado en linfocitos T CD8⁺ en su recirculación hacia órganos linfoides secundarios *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6J tipo silvestre ("wild type" WT) y ratones B6SJL-PTPRC que expresa el alelo CD45.2^{+/+} y CD45.1^{+/+} respectivamente. En este trabajo se utilizaron ratones C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J (OT-I WT) que cuentan con TCR transgénico específico para el péptido OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎ de la proteína ovoalbúmina y ratones OT-I deficientes del D3R (OT-I D3RKO) que poseen el alelo CD45.1.2 y CD45.2 respectivamente.

Para este trabajo se utilizaron animales que tenían entre 6 y 12 semanas de edad. Los animales fueron mantenidos en el Bioterio de Fundación Ciencia & Vida bajo la normativa establecida por el comité de bioética de dicha institución de acuerdo a las normativas nacionales e internacionales establecidas.

Purificación de linfocitos T CD8⁺

Se extrajo el bazo de ratones OT I WT y OT I D3RKO y se dispuso cada uno en una placa 60 mm con 5 ml de medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI Gibco Life Technologies; #catalogo A1049-01) suplementado con 10% de suero bovino fetal filtrado (SFB, Gibco Life Technologies; #catalogo 10437-028), 200uM del dipéptido glutamina y alanina (Glutamax, Gibco Life Technologies; #catalogo 35050-61), 10UL/ml de penicilina, 10ug/ml de estreptomina, 25 ng/ml de Fungizona (Antibiotic- Antimycotic, Gibco Life Technologies; #catalogo 15240062) y 1% de aminoácidos no esenciales (MEM aminoácidos no esenciales, Gibco Life Technologies; #catalogo 11140-050). Los bazos fueron disgregados utilizando dos cubre objetos que posterior a su uso fueron lavados con 5 ml de RPMI suplementado. El material obtenido fue pasado por un colador celular de 40µm para luego comenzar la purificación por selección negativa utilizando el Kit EasySep

Mouse CD8 T Cell Isolation (Stemcell; #catálogo 19853) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

En el caso de los experimentos *in vivo* donde se realizó la transferencia de linfocitos T CD8⁺ a ratones receptores C57BL/6J o B6SJL-PTPRC luego de la purificación las células se lavaron 3 veces con una solución tampón fosfato salino estéril (PBS) (Corning cell referencia 21-040-CVR). Para luego ser resuspendidas a una concentración de 2×10^6 células/mL.

Activación de linfocitos T CD8⁺

Los linfocitos T CD8⁺ OT I WT y OT I D3RKO se cultivaron a una concentración de 5×10^5 células por mL de medio RPMI suplementado en placas no tratadas de 24 pocillos con anticuerpos α CD3 (clon: 195-2C11) y α CD28 (clon: 27.51) a una concentración de 1 μ g/mL. El cultivo se realizó en ausencia o presencia de IL-2 a 50 U/mL (BioLegend; #catalogo 575406). Luego de 48 h, los cultivos fueron colectados en tubos cónicos de 15 mL, centrifugados a 400g durante 5 minutos y se cultivados durante otras 48 h a una concentración de 5×10^5 células por mL en una placa sin α CD3 ni α CD28. Luego se recuperó cada una de las condiciones y los linfocitos T CD8⁺ fueron estimulados con el péptido OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎ a una concentración de 1 μ g/mL o con PMA (Sigma; #catalogo 16561-29-8) a una concentración de 50 ng/mL e ionomicina (Sigma; #catalogo I0634-1MG) usada a 1 mg/mL, manteniendo una muestra sin estimular como control. Todas las muestras se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 6 h, pero las últimas 4 h de cultivo los linfocitos estuvieron en presencia de brefeldin A (BD; # catalogo: 555029).

Tinción de superficie e intracelular de linfocitos T CD8⁺

Las muestras a analizar se llevaron a placas de 96 pocillos con fondo redondo, se centrifugaron durante 5 min a 400g y 4°C, realizó un lavado con 200 μ l de PBS-SFB 2%. Las muestras fueron resuspendidas en 50 μ l de la mezcla de anticuerpos de superficie e

incubadas en oscuridad durante 20 minutos a 4°C. Los anticuerpos monoclonales murinos utilizados, todos de la marca Biolegend fueron; anti CD3 FITC o Pe o APC (clon 17A2), CD8 Brilliant Violet 421 o APC-Cy7 (clon 53-6.7), V α 2 Brilliant Violet 421 o Pe (clon B20.1), V β 5 APC (clon MR9-4), CD45.1 FITC o Pe-Cy7 (clon A20), CD45.2 PerCp Cy5.5 (clon 104), KLRG-1 Brilliant Violet (clon 2F1), CD44 Pe o PerCp (clon IM7), CD25 FITC (clon PC61 y 3C7) y el marcador de viabilidad Zombie aqua (referencia 423101). En los casos donde solo se evaluaron marcadores de superficie, posterior a la incubación con la mezcla de anticuerpos se realizaron 2 lavados con PBS-FBS 2% y al finalizar las muestras fueron resuspendidas en 200ul de la misma solución tampón.

Para realizar la tinción intracelular de citoquinas, posterior a la incubación de las células con la mezcla de anticuerpos de superficie se realizó un lavado con PBS-FBS2%. Se adicionaron 100ul de cytofix/cytopem (BD Biosciences; #catalogo 51-2090KZ) y se incubó durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se realizaron 2 lavados con el buffer de permeabilización perm/wash (BD Biosciences; #catalogo 51-2091KZ) y se centrifugaron las células 5 minutos a 400g. Se agregó 50 μ L de perm/wash con los anticuerpos intracelulares, anti IFN- γ Pe (clon XMG1.2), granzima B AF648 (clon GB11), TNF- α APC-Cy7 (clon MP6-XT22), T-bet APC (clon 4B10) e IL-2 Pe-Cy7 (clon JES6-5H-4). Todos los anticuerpos utilizados se obtuvieron de Biolegend. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente se lavó las muestras con perm/wash y se resuspendieron en PBS-FBS 2% para ser analizadas por citometría de flujo con el citómetro FACS-Canto II (BD Bioscience). Los datos obtenidos se analizaron utilizando el programa FlowJo Versión vX.0.7.

Determinación *in vitro* de la proliferación en linfocitos T CD8⁺ mediante la tinción con CFSE

Para evaluar la proliferación desarrollada por las células antes de comenzar con el protocolo de activación los linfocitos OT I WT y OT I D3RKO fueron teñidos con CFSE (Biolegend; #catalogo 423801). Los linfocitos obtenidos fueron llevados a un tubo cónico de 15mL, centrifugados durante 5 minutos a 400g y resuspendidos en 1 mL de PBS-FBS 5% y se agregó 1mL de PBS con CFSE que quedo a una concentración final de 2.5 μ M, se mezcló rápidamente durante 10 seg y se incubó por 10 min a 37°C. Luego se llevó a un volumen de 10mL con PBS-FBS 5% y se centrifugó durante 5 min a 400g. Los linfocitos OT I WT y OT I D3RKO fueron lavados 3 veces y activados siguiendo el protocolo ya descrito. Al finalizar las muestras fueron colectadas y llevada a un tubo cónico de 15 mL, centrifugadas durante 5 min a 400g temperatura ambiente y resuspendidas en 200ul de PBS para ser teñidas.

Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de linfocitos T CD8⁺

Se extrajo el bazo de un ratón C57BL/6J se llevó a una placa de 60 mm con 5 ml de RPMI suplementado, se disgregó utilizando dos cubre objetos, los que fueron lavados al igual que la placa con 5 mL de RPMI suplementado. Todo el material colectado fue pasado a través de un colador de células 40 μ m a un tubo cónico de 50 mL y centrifugado durante 5 min a 400g a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en 2 mL de tampón de lisis de glóbulos rojos (Red Blood Cell Lysis Buffer: RBC) (Biolegend; #catalogo 420301) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se llevó a un volumen final de 10mL con PBS y se centrifugo durante 5 min a 400g, se descartó el sobrenadante y se agregó 10 mL de RPMI suplementado. Los esplenocitos obtenidos fueron contados y divididos en dos placas de 100mm, en cantidades iguales y en un volumen final de 7mL de RPMI suplementado por placa. Las células de una de las placas fueron pulsados con el péptido

OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎ a una concentración de 10 µg/mL, manteniendo la otra placa libre de péptido. Ambas se cultivaron durante 2 h a 37°C con 5% CO₂ y se tiñeron con CFSE (#catalogo 423801) a una concentración de 2.5µM y 0.25µM respectivamente. Al finalizar la tinción se contó las células blanco (esplenocitos pulsados) y las células control (esplenocitos sin pulsar) siguiendo el protocolo CountBright™ absolute counting beads (Invitrogen; #catalogo C36950) siguiendo las recomendaciones del fabricante y se mezcló las células blanco con las células control a una proporción de 1:1.

Se cocultivó las células blanco/control con las células efectoras a diferentes razones (0.25:1, 0.5:1, 1:1, 5:1, 10:1, 1:20) en una volumen final de 200µL durante 14 h a 37°C con 5% CO₂. Las células efectoras correspondieron a linfocitos T OT I WT y OT I D3RKO activados siguiendo el protocolo de activación descrito y manteniendo las diferentes condiciones. Posterior al tiempo de incubación se determinó mediante citometría de flujo la muerte celular tiñendo con el marcador de viabilidad Zombia aqua (Biolegend; referencia 423101).

La muerte específica se determinó utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Muerte específica} = 100 - \left(\frac{\frac{\% \text{ Esplenocitos pulsados con péptido OVA}_{(257-264)}}{\% \text{ Esplenocitos NO pulsados}}}{\frac{\% \text{ Esplenocitos pulsados con péptido OVA}_{(257-264)} \text{ control}}{\% \text{ Esplenocitos NO pulsados control}}} \times 100 \right)$$

Transferencia de linfocitos T CD8⁺ y vacunación

Los linfocitos OT I WT y D3RKO fueron purificados y tratados siguiendo el protocolo de purificación señalado en la sección anterior. Utilizando una jeringa de 25g fueron transferidos de forma intravenosa 2x10⁵ linfocitos OT I WT u OT I D3RKO en 100 ul de PBS estéril a dos grupos de ratones C57BL/6J WT (CD45.2^{+/+}) respectivamente.

Preparación ADN plasmidial

Un inóculo de bacterias transformadas que expresan el plásmido pVax-OVA se incubó durante toda la noche en medio LB (USBiological; #catalogo L1520) en agitación constante, a 37°C y en presencia de 50 µg/mL kanamicina (Sigma-Aldrich). La purificación del plásmido a partir del inóculo se realizó utilizando el kit NucleoBond Xtra MidiEF (Macherey Nagel; Referencia 740420.10) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Vacunación

Para realizar este procedimiento los animales fueron anestesiados con Sevoflurano 3% (Baxter). La vacunación fue dada de forma intradérmica en ambos lados de la parte baja del lomo, administrando 20 µg diluidos en 20 µl de PBS estéril del vector pVAX-OVA por lado, formándose dos ampollas, sobre estas se ubicó el electrodo que cuenta con dos columnas paralelas de 4 agujas, cada una de 2 mm para la entrega de los pulsos eléctricos utilizando el equipo Derma Vax DNA Vaccine Skin Delivery System (Cyto Pulse Science, Inc.).

Evaluación *ex vivo* de la producción de citoquinas en linfocitos T CD8⁺ en fase efectora

Para la evaluación de la expansión clonal y la producción de citoquinas, doce días posteriores a la vacunación se tomaron muestras de sangre de todos los animales. Para ello, con un bisturí estéril se hizo un corte en la vena de la cola y se colectaron entre 200-300 µl de sangre en un tubo de 1.5 mL con 70 µl de heparina a una concentración de 500 U/mL (Laboratorio Sanderson).

Cada una de las muestras fue llevada a un tubo cónico de 15 mL con 2 mL de tampón de lisis de glóbulos rojos (Red Blood Cell Lysis Buffer: RBC) (Biolegend; #catalogo 420301) y se incubó durante 5 min en hielo, posteriormente las muestras fueron

llevadas a un volumen final de 15 mL con PBS y centrifugadas a durante 5 min a 400g a 4°C. Las muestras fueron llevadas a una placa de 96 pocillos manteniendo una muestra control y otra estimulada con el péptido OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎ a una concentración de 1 µg/mL. La incubación se realizó a 37 °C y 5% de CO₂ durante 6 h, pero las últimas 4 h de cultivo las muestras estuvieron en presencia de brefeldin A (BD; # catalogo: 555029). Finalizada la incubación se realizó una tinción de superficie e intracelular para analizar las muestras mediante FACS.

Inoculación de células tumorales

Las células B16-OTI utilizadas para este procedimiento fueron mantenidas en placas de 100mm en 10 mL de medio RPMI suplementado de la forma ya especificada, a 37°C con 5% de CO₂, se llevaron a las placas necesarias que permitieran asegurar que el día de la inoculación cada una de ellas contara con una confluencia aproximada del 70%.

Catorce días posteriores a la vacunación se inocularon de forma subcutánea en el costado de cada ratón 2x10⁶ o 1x10⁶ células de la línea tumoral B16F10-OTI contenidas en 100 uL de PBS estéril respectivamente.

El crecimiento tumoral se monitoreo tres días a la semana utilizando un pie de metro considerando, el largo y ancho del tumor, lo que permitió determinar el volumen del tumor utilizando la siguiente formula:

$$\text{Volumen} = (\text{Ancho}^2 \times \text{Largo}) / 2$$

Los animales fueron sacrificados al contar con una volumen igual o superior a 15mm³ o al presentar sangrado o ulceras en el tumor.

Evaluar *in vivo* la recirculación de linfocitos T CD8⁺ hacia órganos linfoides secundarios.

Los linfocitos OT I WT y OT I D3RKO fueron purificados de la forma señalada en las secciones anteriores, contados y llevados a igual concentración para ser mezclados en proporción 1:1, específicamente 1×10^6 de linfocitos OT I WT/ D3RKO y fueron transferidos de forma intravenosa a ratones B6SJL-PTPRC (CD45.1^{+/+}). Luego de 24 h se sacrificaron los animales y se evaluó la presencia de linfocitos OT I WT u OT I D3RKO en nódulo linfático inguinal, nódulo linfático mesenterico y bazo. Se comenzó con la extracción de estos órganos y cada uno fue llevado a una placa de 60mm con 5 mL de RPMI suplementados y disgregado utilizando dos cubre objetos. Todo el material obtenido se pasó a través de un colador de células de 40 μ m a un tubo conico de 15mL y se centrifugó durante 5 min a 400g. Las muestras fueron lavadas dos veces con PBS-FBS2%. Posterior a estos lavado las células fueron llevadas a una placa de 96 pocillos para realizar una tinción de superficie. En todos los órganos de interés los linfocitos OT I WT/ D3RKO fueron contados utilizando CountBright™ absolute counting beads (Invitrogen; #catalogo C36950) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc). Los test utilizados fueron, test estadístico utilizado fue Mann-Whitney, considerando los datos no pareados, con una distribución no paramétrica y para comparaciones múltiples Anova de dos vías, en ambos casos el valor de P aceptado para considerar significancia fue < 0.05 .

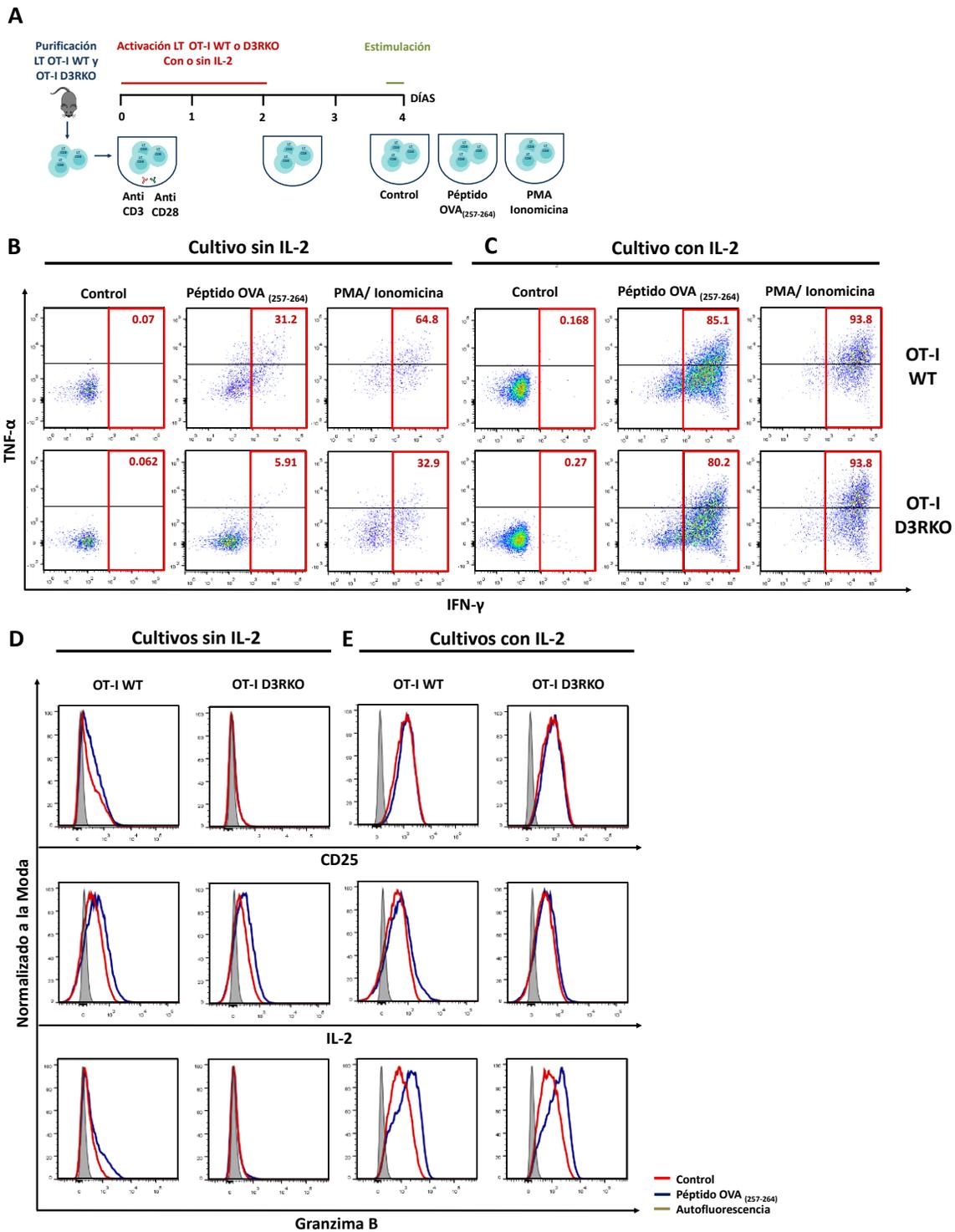
RESULTADOS

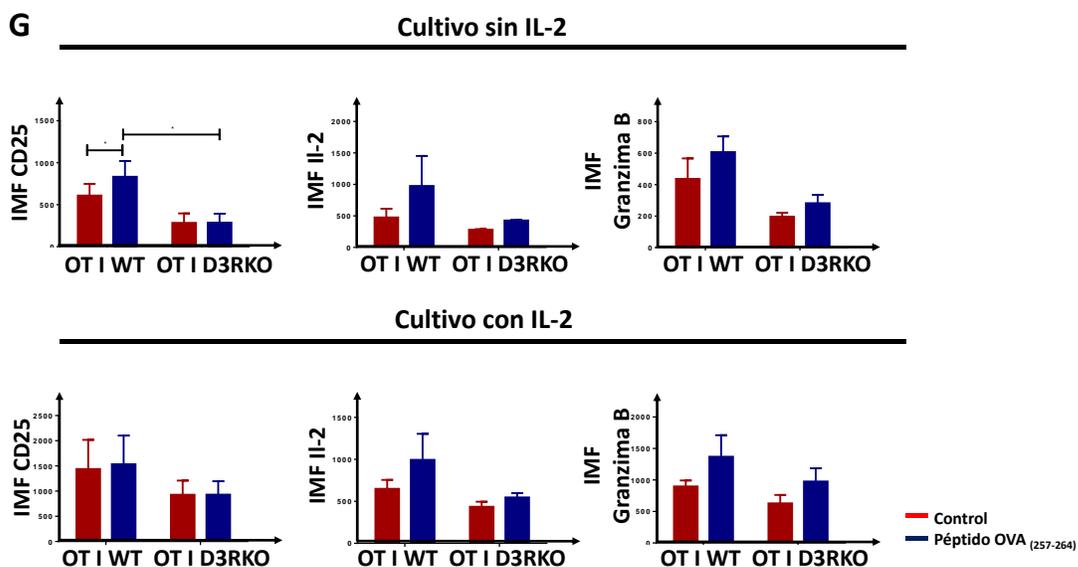
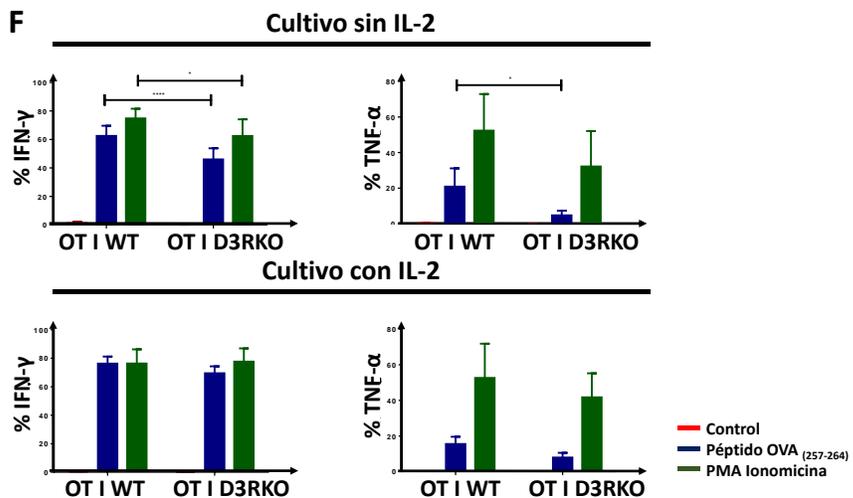
I. Evaluar el papel del D3R en la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ *in vitro*.

Para determinar si el D3R participa en la formación del perfil citotóxico de los linfocitos T CD8⁺, caracterizado por la liberación de citoquinas como IFN- γ y TNF- α (Mitrücker et al. 2014), el primer experimento consistió en la activación de los linfocitos OT I WT y OT I D3RKO cultivados en ausencia o presencia de IL-2 (50Ui/mL). Lo anterior obedece principalmente a dos razones, la relevancia que posee la IL-2 al promover importantes procesos como, proliferación, diferenciación y supervivencia de los linfocitos T específicos (Tähtinen et al. 2015) y que los linfocitos T CD4⁺ D3R^{-/-} poseen una menor capacidad para secretar esta interleucina y para adquirir un fenotipo efector (Contreras et al. 2016), lo que de replicarse en los linfocitos OT I D3RKO se espera genere una formación menos eficiente del perfil citotóxico en aquellos cultivos donde no se agregó IL-2.

Es importante mencionar que, debido a que la intensidad media de fluorescencia (IMF) puede variar entre experimentos los datos de la expresión de CD25, IL-2 y granzima B fueron normalizados de acuerdo a lo obtenido en los linfocitos OT I WT en los cultivos donde no se agregó IL-2.

Los resultados señalan que tanto los linfocitos OT I WT como los OT I D3RKO una vez activados son capaces de producir citoquinas pero, se observa un menor porcentaje de linfocitos OT I D3RKO productores de IFN- γ , TNF- α (Figura 1B y 1F) al mismo tiempo que cuentan con una menor expresión de CD25 respecto a su contraparte WT (Figura 1D y 1G). Sin embargo, al agregar IL-2 al cultivo de forma exógena el resultado señalado es revertido, generándose porcentajes de linfocitos OT I WT y OT D3RKO productores de IFN- γ y TNF- α similares (Figura 1C y 1F) dándose el mismo efecto en la expresión de CD25 (Figura 1E y 1G).





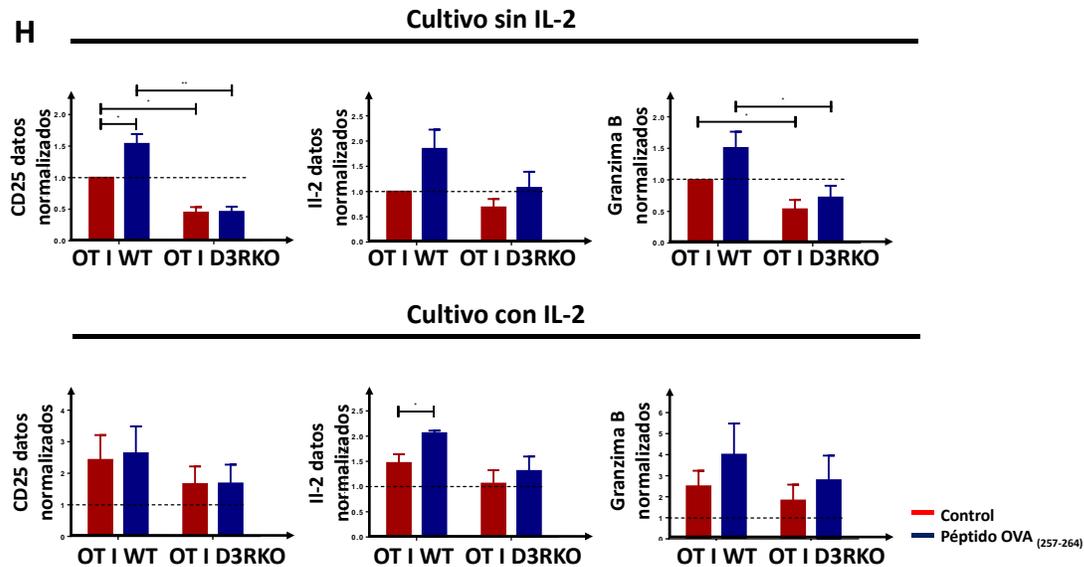


Figura 1: Evaluación *in vitro* de la producción de citoquinas en linfocitos OT I WT y OT I D3RKO activados en ausencia o presencia de IL-2. Linfocitos OT I WT y OT I D3RKO activados con anti α CD3 y anti α CD28 unidos a placa durante 48 h en ausencia o presencia de IL-2. Posterior a este tiempo los cultivos fueron llevados a una placa libre de anti α CD3 y anti α CD28 durante otras 48 h. Los linfocitos T CD8⁺ fueron estimulados durante 6 h con el péptido OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎ o con PMA/ Ionomicina manteniendo una muestra sin estimular como control. Se evaluó la producción de citoquinas mediante tinción intracelular y citometría de flujo. **(A)** Diseño experimental. **(B-C)** Gráfico de eventos representativo de la producción de IFN- γ y TNF- α en ausencia de IL-2 exógena y en presencia de IL-2. **(D-E)** Histogramas de la IMF de la expresión de CD25, IL-2 y granzima B en cultivos sin IL-2 y con IL-2. **(F)** Cuantificación de los datos obtenidos. Las barras en E y F corresponden al promedio \pm error estándar. Los datos representan 8 experimentos independientes al estimular con péptido OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎ y 4 experimentos independientes al estimular con PMA ionomicina. **(G)** Valores normalizados de la IMF dada en CD25, IL-2 y granzima B obtenidos en 3 experimentos independientes. **(H)** Normalización de los datos señalados en F. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Anova de dos vías. *P < 0.05.

La generación de porcentajes menores de linfocitos OT I D3RKO productores de IFN- γ y TNF- α , en conjunto con la menor expresión de CD25 permiten sugerir que estos poseen dificultades para formar un perfil efector, lo que podría deberse a que no ocurre con eficiencia el bucle autocrino de IL-2, que es necesario para la óptima activación de células T (Strell et al. 2009). Indicando alguna relación o punto común entre ambas rutas, que hace dependiente a los linfocitos OT I D3RKO de la incorporación exógena de IL-2.

Para determinar la incidencia del D3R en la proliferación, como se especifica en la figura 2A los linfocitos OT I WT y OT I D3RKO fueron teñidos con la sonda intracelular CFSE y activados, al finalizar se estimularon con el péptido OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎ o PMA/ Ionomicina para evaluar la producción de IFN- γ . Observándose que la expresión del D3R no incide en la capacidad proliferativa de los linfocitos T CD8⁺ sean estos cultivados en ausencia del IL-2 o en cultivos donde esta se agregó de forma exógena. Estos resultados siguen la línea de lo descrito en linfocitos T CD4⁺, donde se ha reportado que la expresión del D3R no contribuye en su comportamiento proliferativo (Contreras et al. 2016).

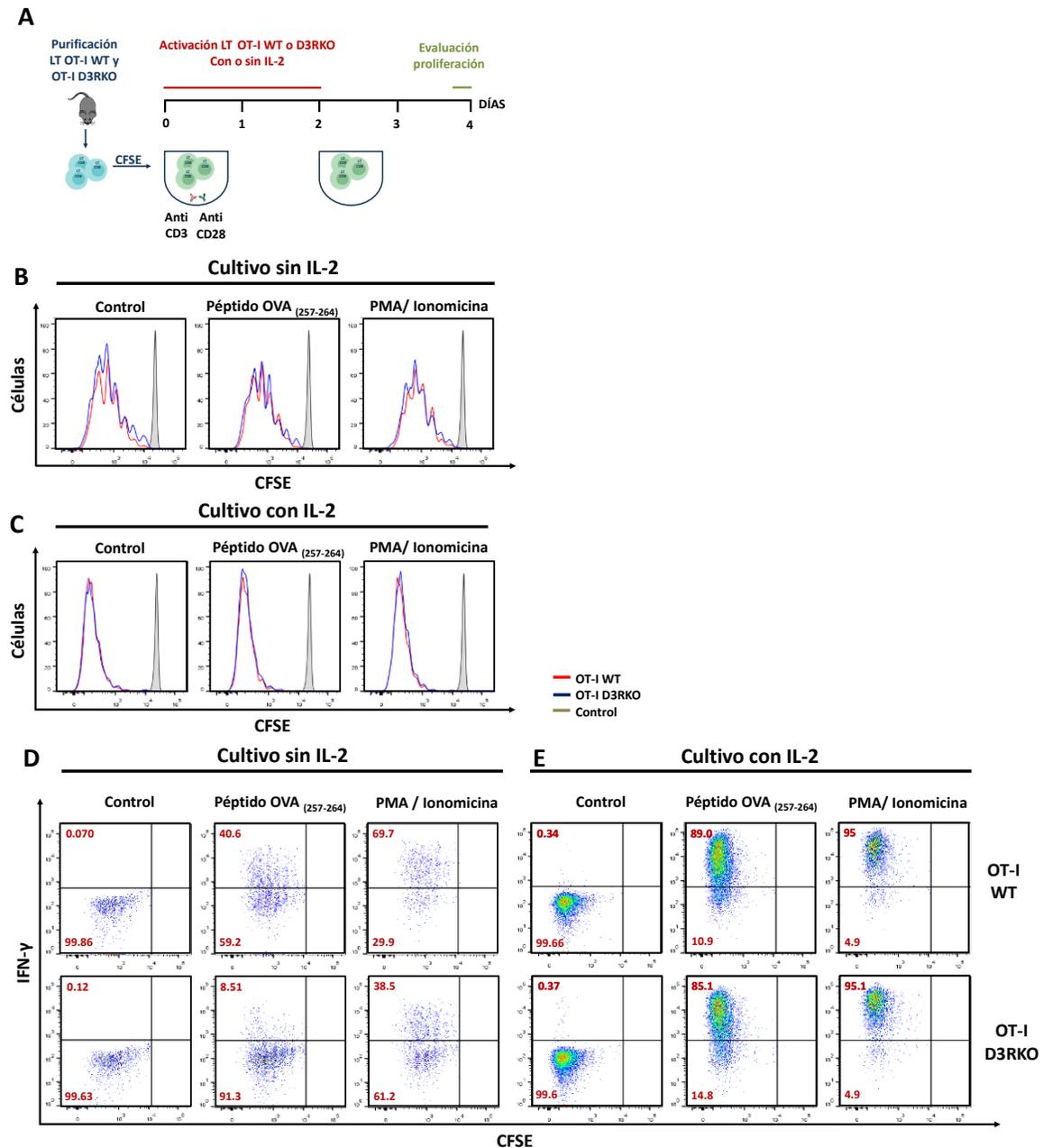
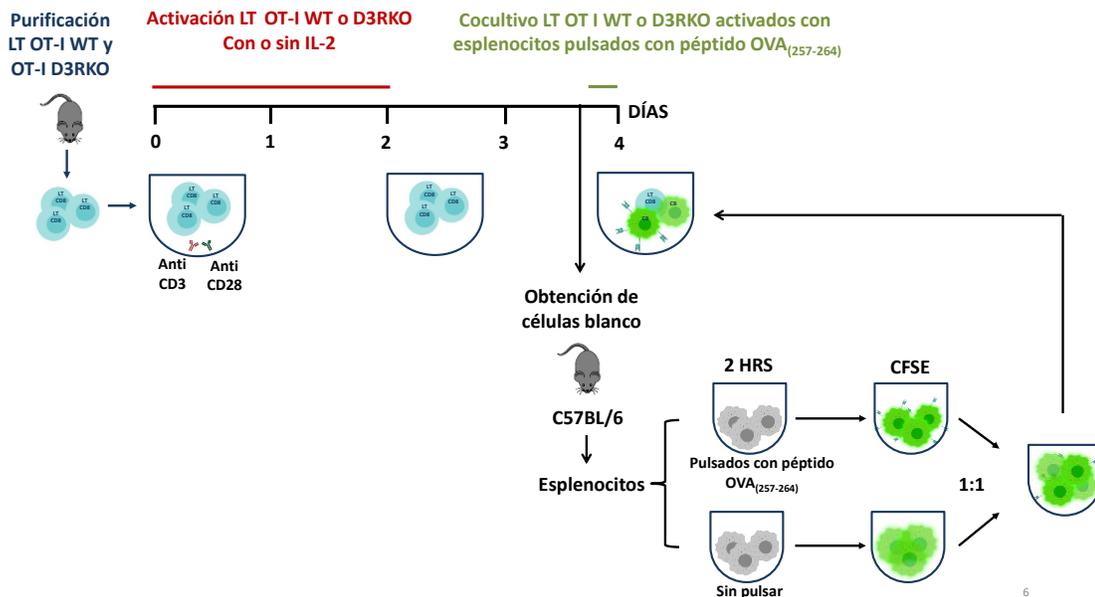


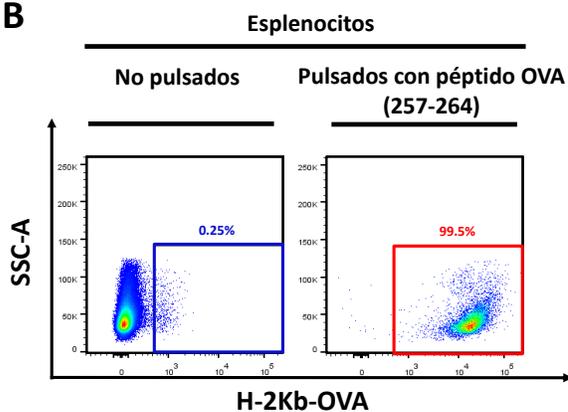
Figura 2: Determinación *in vitro* de la proliferación de linfocitos OT I WT y OT I D3RKO activados y cultivados en ausencia o presencia de IL-2. Linfocitos OT I WT y OT I D3RKO fueron teñidos con CFSE 2.5 μ M, activados en ausencia o presencia de IL-2 y estimulados con el péptido OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎ o PMA/Ionomicina, manteniendo una muestra sin estimular como control. **A** Diseño experimental. **(B-C)** Gráfico de las rondas de proliferación en linfocitos OT I WT y D3RKO cultivados en ausencia de IL-2 y en presencia de IL-2. **(D-E)** Gráfico de puntos representativo de la producción de IFN- γ en linfocitos OT I WT y OT I D3RKO cultivados en ausencia de IL-2 y presencia de IL-2.

La principal función de los linfocitos T CD8⁺ es eliminar células infectadas, su rol es crítico en el control y erradicación de patógenos intracelulares y células tumorales (Valbon et al. 2016). Por ello y por los resultados obtenidos que dan cuenta de diferencias en la producción de IFN- γ y TNF- α entre linfocitos OT I WT y OT I D3RKO. Se evaluó la citotoxicidad de ambos genotipos mediante ensayos *in vitro* donde, se utilizaron esplenocitos pulsados con el péptido OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎, manteniendo esplenocitos sin pulsar como control interno, ambos fueron teñidos con CFSE a 2.5 μ M y 0.25 μ M respectivamente y mezclado en razón 1:1 para luego ser cocultivados durante toda la noche, en diferentes proporciones con los linfocitos OT I WT y OT I D3RKO activados en ausencia y presencia de IL-2. A pesar de los resultados señalados en figuras anteriores, bajo este diseño experimental no se observaron diferencias en la eliminación de células blanco entre ambos genotipos, independientemente si estos se cultivaron en presencia o no de IL-2 la tendencia de su capacidad citotóxica es bastante similar. Esto puede deberse a la ausencia de otras células en el cultivo que permitan el desarrollo de una respuesta más completa, a que los tiempos ya sea de activación de los linfocitos T CD8⁺ o de contacto con la célula blanco no son lo suficientemente amplios para lograr detectar diferencias entre ambos genotipos. O también porque a pesar de contar con diferencias en la producción de citoquinas de relevancia citotóxica como el IFN- γ , los linfocitos T CD8⁺ deficientes del D3R logran desarrollar mediante otra ruta que no pesquemos niveles de citotoxicidad similares a los linfocitos que si cuentan con este receptor. Buscando encontrar antecedentes que nos permitan dilucidar lo presentado es que se realizaron ensayos de *in vivo* bajo un contexto antitumoral.

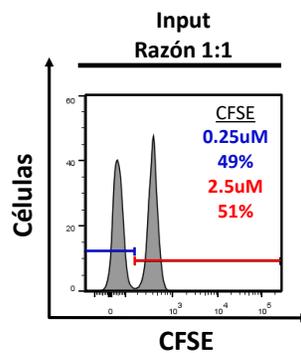
A



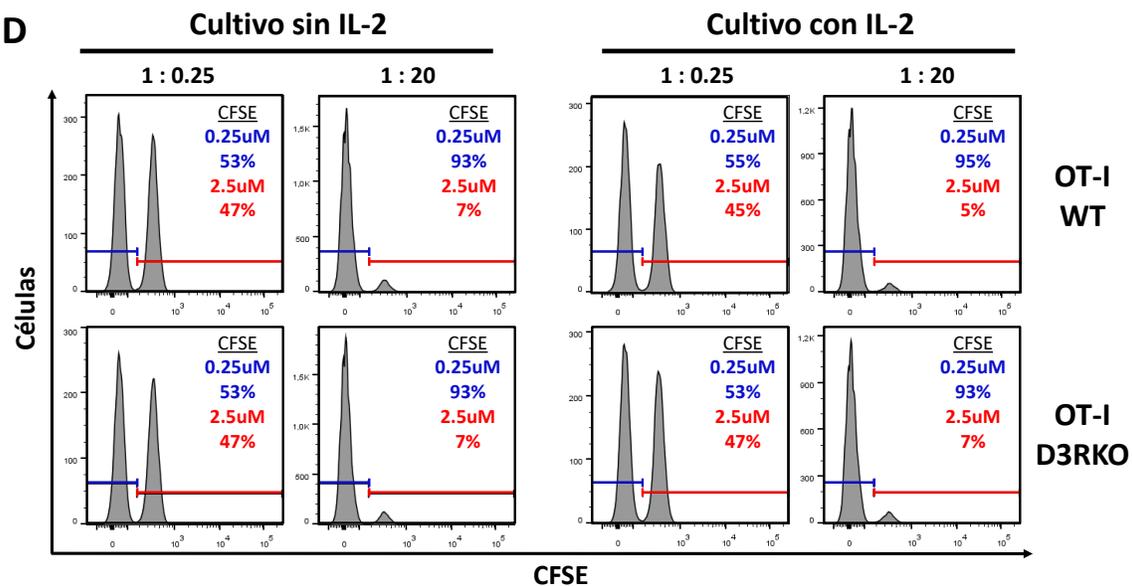
B



C



D



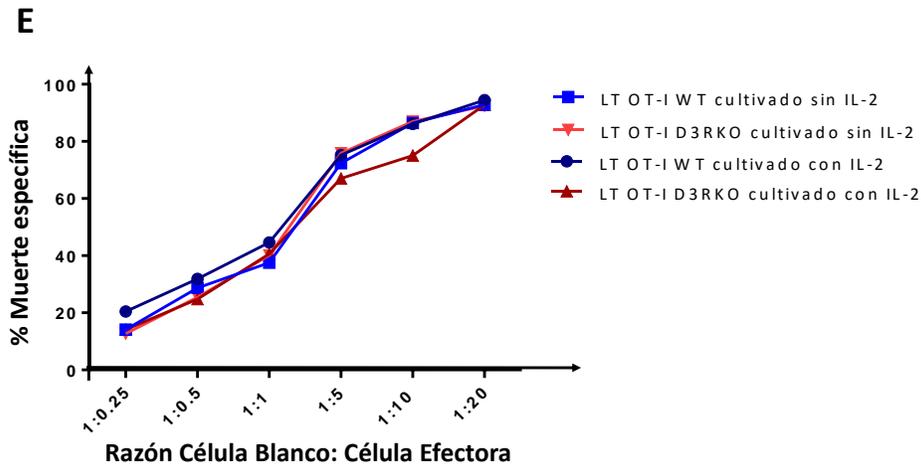


Figura 3: Evaluación *in vitro* de la capacidad citotóxica de linfocitos OT I WT y OT I D3RKO. Esplenocitos fueron pulsados con el péptido OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎ manteniendo una porción sin pulsar usada como control interno, teñidos con CFSE a 2.5uM y 0.25uM respectivamente y mezclados en razón 1:1, se cocultivaron en diferentes proporciones con linfocitos OT I WT u OT I D3RKO activados en ausencia o presencia de IL-2. **(A)** Diseño experimental. **(B)** Gráfico de los esplenocitos sin pulsar y pulsados. **(C)** Input de esplenocitos no pulsados y pulsados teñidos con CFSE 2.5uM y 0.25 uM mezclados en razón 1:1. **(D)** Histogramas representativos del cocultivo de células blanco y efectoras, en razones de 1:0.25 y 1: 20. **(E)** Gráfico de la muerte específica. Experimento representativo de dos experimentos independientes.

II. Determinar el papel del D3R expresado en linfocitos T CD8⁺ en la respuesta citotóxica *in vivo* en un ontento antitumoral.

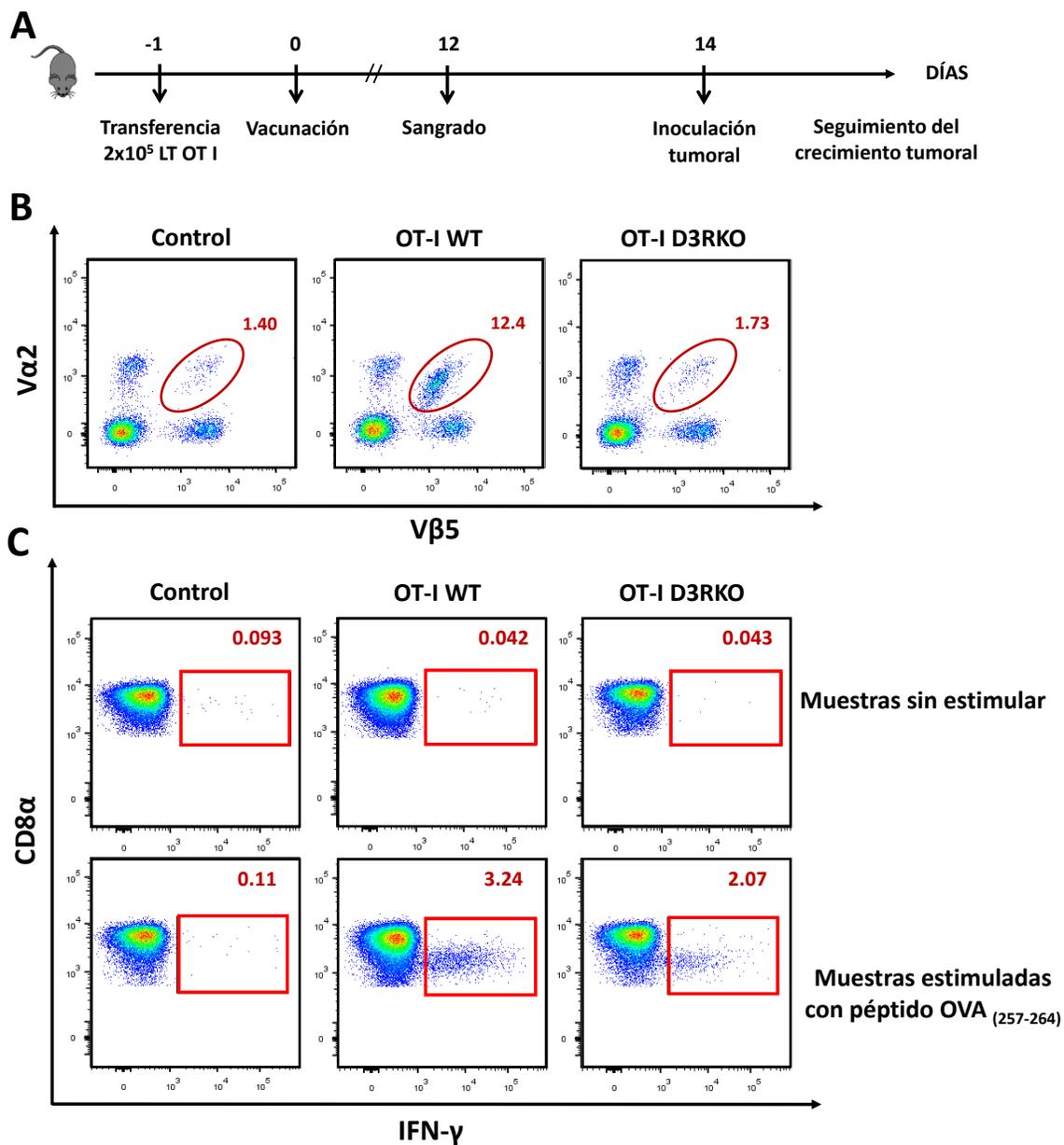
II.1 Evaluar el papel del D3R expresado en linfocitos T CD8⁺ en la expansión clonal y la formación de un perfil citotóxico *in vivo* en el contexto de una respuesta antitumoral.

Los resultados obtenidos en la sección anterior mostraron que los linfocitos OT I D3RKO producen menores porcentajes de IFN- γ y TNF- α al mismo tiempo que cuentan con una menor expresión de CD25, deficiencias que son revertidas al incorporar al cultivo IL-2, promoviendo la generación de un perfil similar al dado en el genotipo WT. Sin embargo, al evaluar *in vitro* la citotoxicidad no se observaron diferencias entre los linfocitos OT I WT y OT I D3RKO independiente si estos últimos fueron activados en ausencia o presencia de IL-2. Por lo anterior, se utilizó un modelo *in vivo* donde los animales fueron inmunizados mediante vacunas de ADN y así determinar en un contexto fisiológico, la existencia de diferencias en la producción de citoquinas como el IFN- γ y/o proliferación entre ambos genotipos.

Como especifica la figura 4A, se transfirieron de forma intravenosa linfocitos OT I WT o OT I D3RKO a ratones C57BL/6 CD45.2^{+/+}, 24 h después los animales fueron vacunados de forma intradérmica con el plásmido pVAX-OVA que codifica para la proteína OVA. Luego de doce días, tiempo en el cual la respuesta efectora se encuentra en su punto más alto, se tomaron muestras de sangre para determinar la expansión clonal y la producción de IFN- γ , estimulando *ex vivo* con el péptido OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎ y mantenido una porción de la muestra sin estimular como control.

A diferencia de los ensayos *in vitro*, la proliferación *in vivo* si muestra diferencias entre ambos genotipos (Figura 4B), presentado los linfocitos OT I D3RKO una expansión mucho menor respecto a lo generado por los linfocitos OT I WT, sugiriendo que *in vivo* la estimulación del D3R incide en el comportamiento proliferativo. En cuanto a la producción

de IFN- γ (Figura 4 B y D) se observa un menor número de linfocitos OT I D3RKO productores de esta citoquina, lo cual puede estar relacionado con el número de células que este genotipo generó.



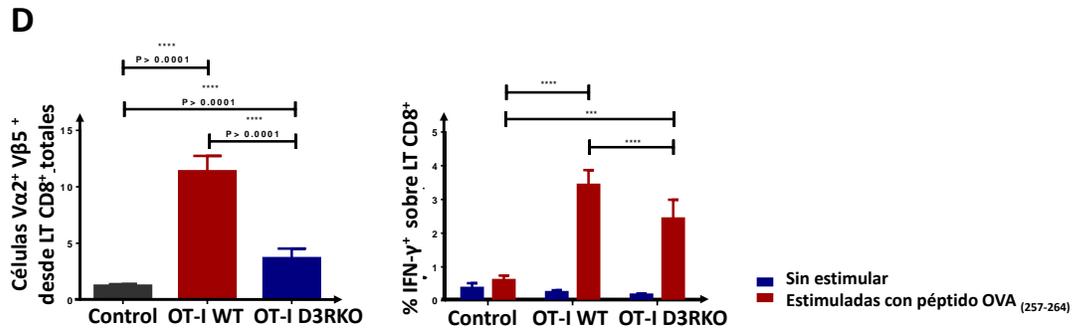


Figura 4: Evaluación *in vivo* de la producción de citoquinas y expansión clonal en linfocitos efectores OT I WT y OT I D3RKO generados mediante vacunación. Se transfirieron 2×10^5 linfocitos OT I WT u OT I D3RKO a ratones C57BL/6. 24 h después los ratones fueron vacunados de forma intradérmica con 40 μ g de pVAX OVA. Doce días posteriores a la vacunación se tomaron muestras de sangre, las cuales fueron estimuladas con el péptido OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎ manteniendo una muestra sin estimular como control. **(A)** Esquema del ensayo. **(B)** Gráfico de puntos representativo de la expansión clonal desarrollada en el grupo control (animales sin transferir ni vacunar), grupo transferido con linfocitos OT I WT y grupo transferido con linfocitos OT I D3RKO. **(C)** Gráfico de punto representativo de la producción de IFN- γ en los tres grupos. **(D)** Cuantificación de expansión clonal, producción de IFN- γ . Las barras corresponden al promedio \pm error estándar, mostrando los datos de tres experimentos juntos considerando un total de 15-17 ratones por grupo. El análisis estadístico se realizó utilizando t test Mann-Whitney no pareado en la evaluación de la expansión clonal y expresión de KLRG-1 y Anova de dos vías en la producción de IFN- γ , considerando **** P < 0.0001, **** P entre 0.0001 a 0.001 y ** P entre 0.01 a 0.05.

Para determinar si los resultados generados se correlaciona con la capacidad citotóxica, todos los grupos fueron desafiados con la línea celular B16 OT I caracterizada por expresar únicamente el péptido OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎. Inoculándose de forma subcutánea 1×10^6 células.

Como se observa en la figura 5, la protección frente al desafío tumor por parte de los linfocitos OT I D3RKO fue deficiente, generando en todos los animales de este grupo tumores de magnitud importante por lo que, tuvieron que ser sacrificados. Lo expuesto se relaciona con lo observado anteriormente ya que, este genotipo presento una menor expansión clonal y una menor producción de citoquinas.

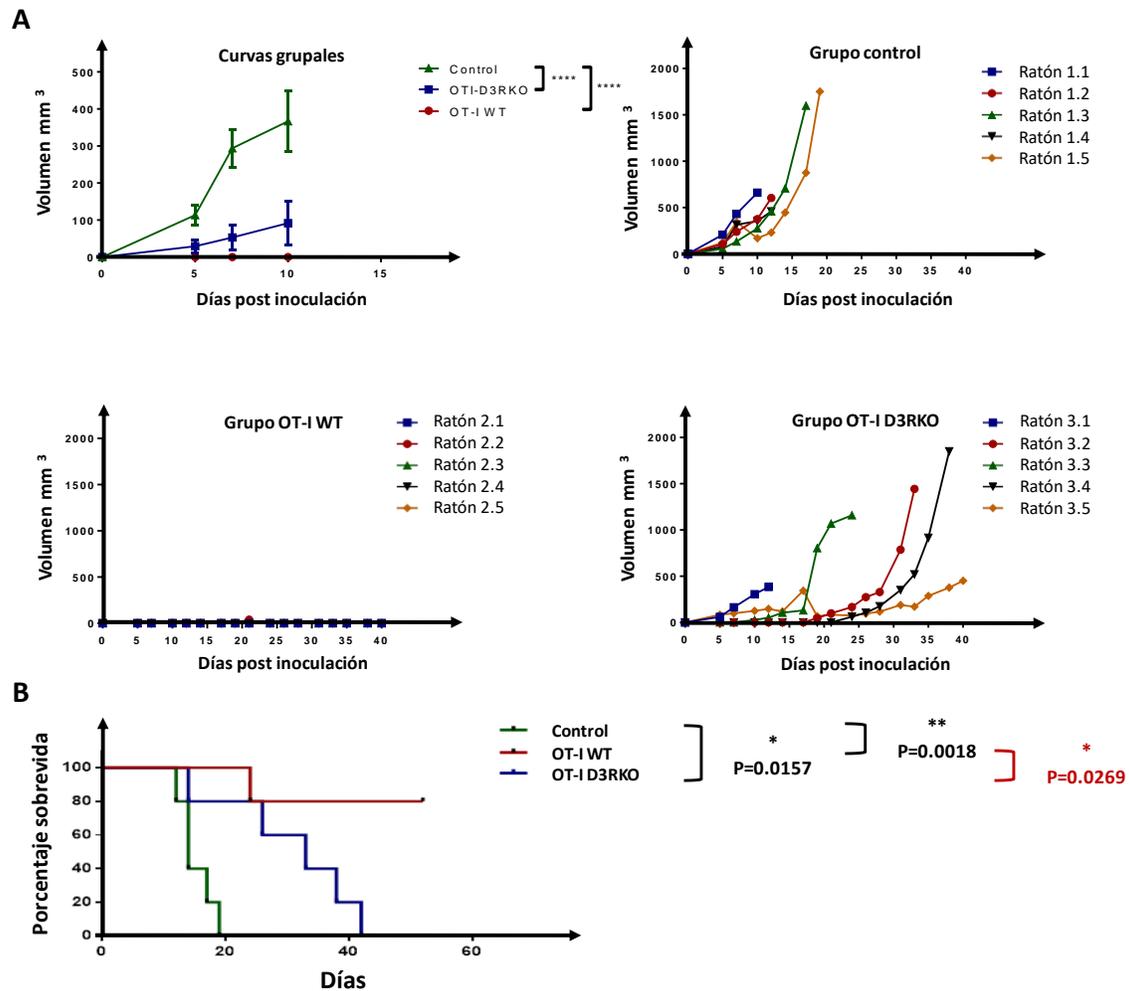


Figura 5: Protección tumoral generada en grupo de ratones transferido con linfocitos OT I WT u OT I D3RKO y vacunados con pVAX-OVA. Se transfirieron 2×10^5 linfocitos OT I WT u OT I D3RKO a ratones C57BL/6. 24 h después fueron vacunados de forma intradérmica con $40 \mu\text{g}$ de pVAX OVA. Luego de 12 días se tomó sangre de todos los ratones y el día 14 se inoculó de forma subcutánea 1×10^6 de células B16 OT I y se monitorio el crecimiento tumoral 3 veces a la semana. **(A)** Curvas grupales del crecimiento tumoral, curva solo del grupo control, grupo OT I WT y grupo OT I D3RKO. **(B)** Curva de sobrevivida. El análisis estadístico se realizó utilizando el test Log-rank (Mantel Cox) considerando significativo un valor de $p < 0.05$. Experimento representativo de dos experimentos independientes.

II.2. Evaluar el papel del D3R expresado en linfocitos T CD8⁺ en su recirculación hacia órganos linfoides secundarios *in vivo*.

Los ensayos *in vivo* sugieren que los linfocitos OT I D3RKO se expanden con menor éxito y promueven una respuesta antitumoral más débil que los OT I WT. Para descartar que estos efectos sean consecuencia de patrones migratorios deficientes por parte del genotipo D3RKO, se evaluó *in vivo* la migración de ambos linfocitos. Para lo anterior ratones B6SJL-PTPRCCD 45.1^{+/+} fueron cotransferidos con 1×10^6 de linfocitos OT I WT CD45.1^{+/+} CD45.2^{+/+} y 1×10^6 linfocitos OT I D3RKO CD45.2.2^{+/+} y 24 h después los animales fueron sacrificados evaluándose bazo, nódulo linfático (NL) mesentérico e inguinal. En todos los casos se estudió la expresión de CCR7, el cual corresponde a un receptor de quimioquinas y de L-selectina CD62L. El primero de ellos es altamente expresado en linfocitos vírgenes y la interacción con su ligando orquesta el inicio de la respuesta inmune (Moschovakis et al. 2018), controlando a través de su señalización la migración de las células del sistema inmune a los órganos linfoides secundarios y su posicionamiento (Förster, Davalos-Misslitz, and Rot 2008). Mientras que CD62L es expresada en linfocitos TCD8⁺ vírgenes cuyo ligando se encuentra en la vénula del endotelio alta y es crítico para la localización de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes en el nódulo linfático (Nolz, Starbeck-Miller, and Harty 2011).

Los resultados obtenidos señalan que ambos genotipos migran con eficiencias similares a bazo, nódulo linfático mesentérico e inguinal (Figura 6 B-C), no presentándose diferencias en la IMF de CCR7 ni en CD62L (Figura 7C), lo que sugiere que las diferencias en expansión clonal dadas en el experimento anterior no se deben a diferencias en la migración.

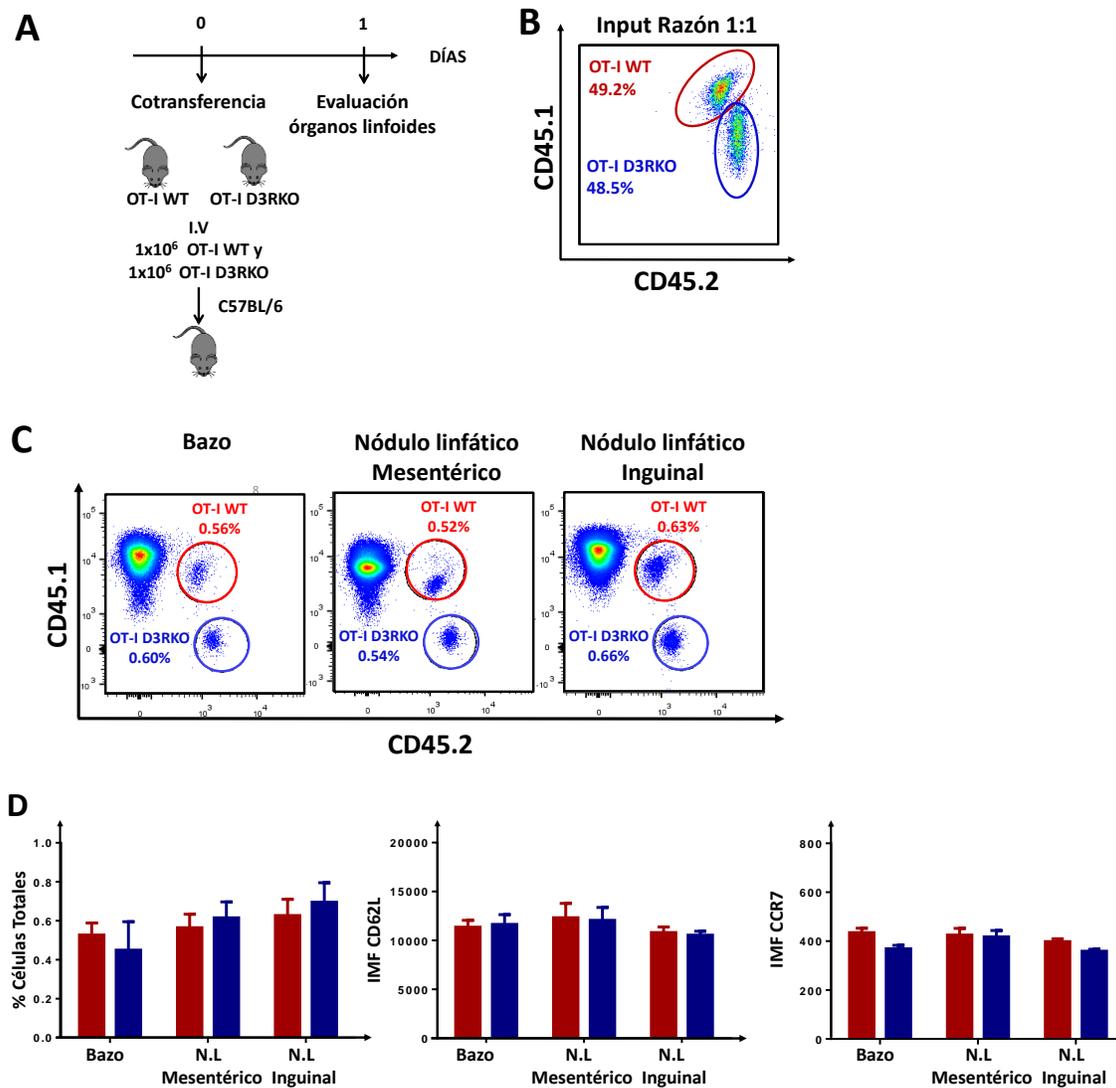


Figura 6: Evaluación de patrones de migración mediante la detección de linfocitos OT I WT y OT I D3RKO cotransferidos. Ratones B6SJL-PTPRCCD 45.1^{+/+} fueron cotransferidos con 1×10^6 de linfocitos OT I WT CD45.1.2 y 1×10^6 linfocitos OT I D3RKO CD45.2.2 y sacrificados 24 h después para evaluar órganos linfoides secundarios. **(A)** Diseño experimental. **(B)** Input de proporción 1:1 de linfocitos OT I WT /D3RKO cotransferidos. **(C)** Gráfico de puntos representativo de los linfocitos de cada genotipo detectados en bazo, nódulo linfático mesentérico e inguinal. **(D)** Cuantificación de la IMF del marcador CD62L y CCR7. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar, mostrando los datos de un experimento representativo de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando Mann-Whitney t test no pareado. * $P < 0.05$.

DISCUSIÓN

Durante las últimas décadas una serie de estudios han mostrado que la dopamina es un neurotransmisor clave en la comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso pudiendo regular tanto la función como la diferenciación de las células inmunes. (Gonzalez et al. 2013; Pacheco 2017; Pacheco et al. 2014; Pinoli and Marino 2017). Sin embargo, el rol que posee el receptor con mayor afinidad por la dopamina, es decir, el D3R, en los linfocitos T CD8⁺ no se ha estudiado en profundidad.

Los antecedentes generados en este trabajo señalan que, al realizar la diferenciación *in vitro* de los linfocitos T CD8⁺, el genotipo D3RKO no cuenta con defectos en su comportamiento proliferativo (Figura 2 B-C) pero, desarrolla un perfil efector menos eficiente, reflejado en la obtención de un menor número de linfocitos OT I D3RKO productores de IFN- γ y TNF- α (Figura 1B). Estos resultados siguen la misma línea de lo reportado en linfocitos T CD4⁺ donde la expresión del D3R no afecta su proliferación pero contribuye a su diferenciación hacia un perfil efector Th1 ya que, linfocitos T CD4⁺ que carecen del D3R son menos productores de IFN- γ respecto al genotipo WT (Contreras et al. 2016). Lo anterior podría deberse a que, como se ha descrito, la dopamina puede ser sintetizada y liberada por células T y otras células del sistema inmune, mediando su efecto a través de los DAR de forma autocrina o paracrina (Arreola et al. 2016; Sarkar et al. 2010). Respecto a esto Cosentino y colaboradores reportaron la presencia del precursor de dopamina L-DOPA y de dopamina en linfocitos T CD4⁺ efectores y reguladores, estos últimos cuentan además con ARNm de tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la velocidad de la síntesis de catecolaminas (Cosentino et al. 2010). Mientras que Josefsson y su grupo detectaron mediante ensayos de electroforesis capilar altamente sensible que, al incubar células T con L-DOPA, el contenido intracelular de dopamina aumenta (Josefsson et al. 1996). Aunque aún no se ha reportado la producción de este

neurotransmisor por parte de los linfocitos T CD8⁺, la información señalada permite sugerir que, los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* pueden ser consecuencia de la estimulación del D3R mediante la dopamina producida por estos linfocitos, sin embargo, es necesario realizar otros ensayos que permitan confirmar o descartar este punto.

La diferenciación *in vitro* además mostró que los linfocitos OT I D3RKO cuentan con una menor expresión de CD25 respecto al genotipo WT (Figura 1D) pero que tanto esta como las demás deficiencias señaladas en los linfocitos OT I D3RKO son revertidas al incorporar IL-2 al cultivo, rescatando la producción de IFN- γ , TNF- α y la expresión de CD25 en los linfocitos OT I D3RKO (Figura 1C-E-F y G). A pesar que los ensayos realizados en esta tesis por citometría de flujo no muestran que los linfocitos OT I D3RKO cuenten con deficiencias importantes en la producción de IL-2 respecto a los linfocitos OT I WT, resultados obtenidos mediante la técnica ELISA por el grupo del Dr. Pacheco, han indicado que los linfocitos T CD8⁺ WT activados secretan mayores niveles de IL-2 que los linfocitos T CD8⁺ D3RKO, sugiriendo que la deficiencia de D3R en estas células perjudica la producción de los niveles de IL-2 suficientes para promover la formación eficientemente de su perfil efector. De acuerdo a esta idea, se ha reportado que IL-2 es altamente relevante en la activación (Cho et al. 2013) y diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes hacia un perfil efector (Mittrücker et al. 2014).

Una producción insuficientes de IL-2 gatillaría en el genotipo D3RKO la menor expresión de CD25 ya que, como se ha descrito que al ocurrir la estimulación del TCR por parte del antígeno es promovida la producción de IL-2, el aumento de esta interleuquina amplifica y prolonga la expresión de CD25, promoviendo la retroalimentación positiva de su propio receptor de alta afinidad (Kim, Kelly, and Leonard 2001). La regulación positiva de la expresión de CD25 es un mecanismo que permite mantener la señalización de IL-2

(Malek and Castro 2010). De acuerdo a esto, resultados no publicados del laboratorio de Neuroinmunología han mostrado que el promotor del D3R posee sitios de unión a NF-AT y AP-1, dos factores de transcripción que se activan tras la estimulación del TCR. Esto sugiere que D3R tendría una relevancia tempranamente después de la activación de células T, tal como es la producción de IL-2 y la expresión de CD25.

En su conjunto los resultados obtenidos bajo experimentos *in vitro* permiten sugerir que los linfocitos OT I D3RKO como consecuencia de la baja expresión de CD25 no logran producir niveles suficientes de IL-2, y por lo tanto, no logran adquirir exitosamente un perfil efector, resultando en una menor producción de IFN- γ y TNF- α respecto a los linfocitos OT I WT. Esta conclusión es reforzada por los experimentos de rescate de función, puesto que al agregar IL-2 al medio los linfocitos OT I D3RKO se recuperan y producen citoquinas en niveles similares a los linfocitos OT I WT, descartado al mismo tiempo, posibles deficiencias en la captación de IL-2.

En un contexto fisiológico los resultados señalan que la presencia del D3R promueve la formación de un mayor número de linfocitos productores de IFN- γ , al mismo tiempo que su expansión clonal es mucho más potente respecto a los linfocitos OT I que carecen de este receptor (Figura 4D). Esto sugiere un rol del D3R en la adquisición del perfil citotóxico por los linfocitos T CD8⁺, cuya estimulación de acuerdo a diferentes estudios puede estar ocurriendo por varias vías. Una de ellas es la captación de la dopamina directamente desde el plasma, cuya concentración en voluntarios sanos, se ha reportado que fluctúa entre 10.2 ± 0.9 pg/mL (Pacheco et al. 2009; Saha et al. 2001). Otra fuente periférica importante de este neurotransmisor es la inervación simpática tanto de órganos linfoides primarios (timo y medula ósea) como a órganos linfoides secundarios (nódulos linfáticos y el bazo) (Jung et al. 2017; Kuol et al. 2018; Pacheco et al. 2014) donde son almacenadas grandes cantidades de dopamina (Watanabe et al. 2006)

sugiriendo una regulación mediada por esta tanto en células T en reposo como en activación (Pacheco et al. 2009). Aunque no se ha reportado en linfocitos T CD8⁺, una tercera vía de estimulación del D3R podría estar ocurriendo en la presentación antigénica, como se ha descrito para el caso de células T CD4⁺ por Nakato y colaboradores. Con respecto a esto, células dendríticas generadas a partir de monocitos humanos almacenan y liberan dopamina al ocurrir la interacción con los linfocitos T CD4⁺ vírgenes, promoviendo la formación del perfil Th2 (Nakano et al. 2009).

Bajo el contexto de un desafío tumoral se evaluó la protección desarrollada por ambos genotipos. La respuesta inmune antitumoral implica la captura y procesamiento de los antígenos tumorales por parte de las células dendríticas, las que luego migraran a los nódulos linfáticos para presentar el complejo MHC-I/péptido a los linfocitos T CD8⁺ promoviendo su activación y diferenciación a linfocitos T citotóxicos (Figueroa et al. 2017; Martini et al. 2010) para la eliminación de la células blanco. Respecto a esto, Saha y colaboradores reportaron que la concentración plasmática de dopamina en pacientes con cáncer de pulmón alcanza 48.6 ± 5.1 pg/mL, mientras que en voluntarios sanos alrededor de 10.2 ± 0.9 pg/mL. Además, mediante ensayos *in vitro* observaron que concentraciones tan altas de dopamina inhiben la proliferación y citotoxicidad en células T tanto en células de pacientes como de voluntarios sanos, atribuyendo esta respuesta a la estimulación del D1R (Saha et al. 2001). Por otra parte, utilizando modelos murinos se ha descrito que el D2R tendría un importante rol en la angiogénesis tumoral. La evaluación en animales que carecen de este receptor indica que al ser desafiados con sarcoma murino o melanoma, presentan un aumento del tamaño tumoral, de la densidad de los microvasos y de la permeabilidad respecto a ratones WT (Lan et al. 2017).

En cuanto al rol del D3R, Pacheco y colaboradores han mostrado que la inhibición de este receptor en células dendríticas mejora la presentación cruzada de antígenos a los

linfocitos T CD8⁺ favoreciendo la inmunidad antitumoral (Figueroa et al. 2017). Nuestros resultados sugieren que la carencia del D3R en los linfocitos T CD8⁺ genera una menor cantidad de IFN- γ , cuya relevancia radica en que esta citoquina promueve la expresión del MHC-I en la superficie tumoral, lo que favorece la generación de la respuesta antitumoral tumoral al aumentar la visibilidad de las células blanco (Bhat et al. 2017; Rodríguez et al. 2007; Schoenborn and Wilson 2007). Sin embargo, la modulación por parte del sistema nervioso en la inmunidad anti tumoral aun no es entendida en su totalidad (Kuol et al. 2018), por lo que no es posible atribuir la deficiente protección antitumoral de los linfocitos OT I D3RKO solo a la posible baja en la expresión del MHC-I. Por lo tanto, para poder tener una mejor visión de los mecanismos por los cuales la dopamina regula la respuesta antitumoral, es necesario evaluar en mayor profundidad el rol de la expresión de D3R por ejemplo, en la producción de moléculas citotóxicas como granzimas y perforinas, las cuales representan una de las principales rutas citolíticas de eliminación de células blanco por parte de los linfocito T citotóxicos (Bremer 2013).

Por último, los ensayos *in vivo* mostraron que los linfocitos OT I D3RKO proliferan menos respecto a los OT I WT (Figura 4B y D). Ya que se desconocía si esto era el reflejo de una expansión menos eficiente o si se debía a deficiencias en los patrones migratorios, se realizaron ensayos de migración considerando ambos genotipos y se evaluó la expresión de marcadores claves para la vigilancia linfocitaria, tales como CCR7 y CD62L (Figura 6). Los resultados mostraron que ambos genotipos migran con igual eficiencia y que ambos expresan niveles similares de moléculas de homing para recircular por órganos linfoides secundarios. Sin embargo, esto difiere de los resultados obtenidos previamente por Watanabe y colaboradores, quienes encontraron que la inyección de agonistas del D3R en la cavidad peritoneal favorece su llegada hacia este sitio (Watanabe et al. 2006). Además, cuando inyectaron un antagonista para D3R (U-99194A)

intraperitonealmente, estos autores observaron una disminución de la infiltración de células T CD8⁺ en los nódulos linfáticos inguinales (Watanabe et al. 2006). Sin embargo, a altas concentraciones U-99194A también es un antagonista del D2R, el cual también se expresa en células linfoides y ejerce efectos muy diferentes a D3R (Pacheco et al. 2014). Por lo tanto, es posible que los resultados observados mediante las aproximaciones farmacológicas utilizadas en dicho estudio, sean consecuencias de la estimulación/inhibición de varios blancos moleculares y en varios tipos celulares. Por el contrario, en los experimentos realizados en esta tesis se utilizaron animales WT cargados con linfocitos T CD8⁺ que carecen genéticamente del D3R. Además, no solo se evaluó la migración en nódulos linfáticos inguinales, sino que también en nódulo linfático mesentérico y en bazo, replicándose los mismos resultados en todos los órganos analizados. Por lo tanto, las evidencias obtenidas en esta tesis entregan datos más claros y más robustos que los obtenidos mediante aproximaciones farmacológicas (Watanabe et al. 2006), y sugieren que D3R expresado en células T CD8⁺ no tiene relevancia en la migración homeostática de estas células hacia los órganos linfoides secundarios.

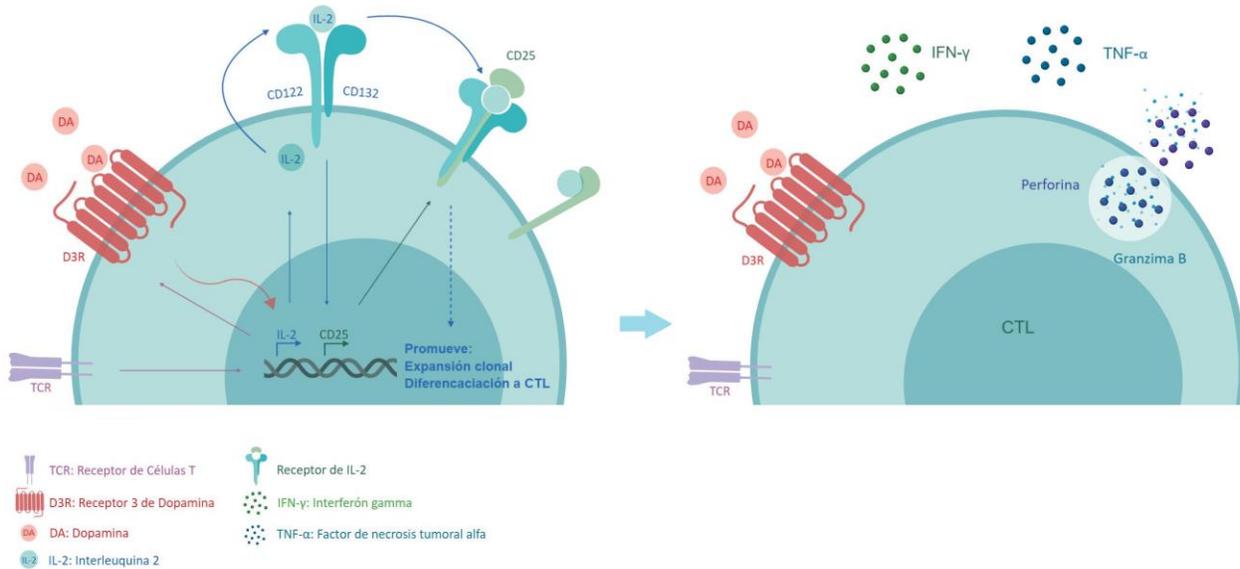


Figura 7: Modelo propuesto. Datos obtenidos previamente en el laboratorio de Neuroinmunología señalan que la presencia del D3R en linfocitos T CD8⁺ promueve la secreción de niveles mayores de IL-2. Análisis previos de nuestro grupo de investigación, aún no publicados, muestran que el promotor de *drd3* (el gen que codifica para D3R) posee sitios de unión a NF-AT y AP-1, dos factores de transcripción que son activados por la estimulación del TCR e inciden por ejemplo en la producción de IL-2. Estos antecedentes y los señalados en esta tesis, nos permiten sugerir que la estimulación inicial del TCR induciría la expresión de D3R. Luego, tanto la señalización desencadenada por D3R como la gatillada por el TCR en conjunto, promoverían una mayor producción de IL-2. Esta a su vez, actuando sobre el receptor heterodimérico $\beta\gamma$, promovería la expresión de CD25, la cadena α del receptor de IL-2. Así, la estimulación de D3R conllevaría por lo tanto a una mayor generación del receptor heterotrimérico $\alpha\beta\gamma$, el cual posee alta afinidad por IL-2, haciendo a los linfocitos T CD8⁺ más sensibles a IL-2. Una mayor sensibilidad a IL-2 conlleva una mayor producción de IL-2, amplificando y prolongando la expresión de CD25, generándose una retroalimentación positiva. La importancia de lo anterior radica en que la IL-2 es altamente relevante en la activación, expansión y diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes a un perfil efector. Esto tiene concordancia con los resultados obtenidos en esta tesis, ya que aquellos linfocitos T CD8⁺ que cuentan con el D3R y que fueron cultivados sin agregar IL-2 de forma exógena al medio de cultivo lograron suplir estas deficiencias alcanzando con igual éxito un perfil citotóxico, por el contrario el genotipo D3RKO en iguales condiciones de cultivo no es capaz de sobreponerse generando porcentajes más bajos de linfocitos productores de IFN- γ y TNF- α .

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos señalan que la carencia del D3R en linfocitos T CD8⁺ resulta en una menor expresión de CD25, y una producción disminuida de IL-2. Esto como consecuencia perjudicaría su diferenciación hacia un perfil efector, lo que se ve reflejado en una menor producción de IFN- γ y TNF- α .

Además, la ausencia del D3R en los linfocitos T CD8⁺ resulta en una reducción del número de células productoras de IFN- γ y una expansión clonal disminuida, lo que conllevaría una menor protección frente a un desafío tumoral y por lo tanto una mayor mortalidad.

Por último, nuestros antecedentes permiten concluir que la expresión del D3R en los linfocitos T CD8⁺ promueve la formación de un perfil citotóxico potenciando el desarrollo de respuestas inflamatorias.

PROYECCIONES

Determinar mediante aproximaciones *in vitro* e *in vivo*, cual sería el mecanismo molecular por el cual la señalización a través de D3R favorece la expresión de CD25 y la potenciación en la producción de IL-2 en células T CD8⁺.

Además, un buen complemento a la presente tesis sería el poder obtener resultados mediante experimentos de pérdida de función (D3RKO) y rescate (IL-2) *in vivo* que permitan confirmar que la carencia de D3R en células T CD8⁺ resulta en una reducción de la producción de IL-2, lo que explicaría posteriormente la menor expansión clonal y la adquisición de una función citotóxica atenuada.

BIBLIOGRAFÍA

- Arreola, Rodrigo et al. 2016. "Immunomodulatory Effects Mediated by Dopamine." *Journal of Immunology Research* 2016.
- Beaulieu, J. M. and R. R. Gainetdinov. 2011. "The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors." *Pharmacological Reviews* 63(1):182–217.
- Bhat, Purnima, Graham Leggatt, Nigel Waterhouse, and Ian H. Frazer. 2017. "Interferon- γ Derived from Cytotoxic Lymphocytes Directly Enhances Their Motility and Cytotoxicity." *Nature Publishing Group* 1–11.
- Boyman, Onur and Jonathan Sprent. 2012. "The Role of Interleukin-2 during Homeostasis and Activation of the Immune System." *Nature Reviews Immunology* 12(3):180–90.
- Bremer, Edwin. 2013. "Targeting of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily for Cancer Immunotherapy." *ISRN Oncol* 2013:371854.
- van den Broek, Theo, José A. M. Borghans, and Femke van Wijk. 2018. "The Full Spectrum of Human Naive T Cells." *Nature Reviews Immunology* 18(June).
- Cano, Georgina, Alan F. Sved, Linda Rinaman, and Bruce S. Rabin. 2001. "Characterization of the Central Nervous System Innervation of the Rat Spleen Using Viral Transneuronal Tracing." 18(September 2000):1–18.
- Cho, J. H. et al. 2013. "Unique Features of Naive CD8⁺ T Cell Activation by IL-2." *The Journal of Immunology* 191(11):5559–73.
- Contreras, Francisco et al. 2016. "Dopamine Receptor D3 Signaling on CD4⁺ T Cells Favors Th1- and Th17-Mediated Immunity." *The Journal of Immunology* 196(10):4143–49.
- Cosentino, Marco et al. 2010. "Autocrine / Paracrine Inhibitory Functional Loop Human CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Selectively Express Tyrosine Hydroxylase and Contain Endogenous Catecholamines Subserving an Autocrine / Paracrine Inhibitory Functional Loop." *October* 109(2):632–42.
- Cruz-Adalia, Aránzazu et al. 2017. "Conventional CD4⁺ T Cells Present Bacterial Antigens to Induce Cytotoxic and Memory CD8⁺ T Cell Responses." *Nature Communications* 8(1):1591.
- Ebbo, Mikaël, Adeline Crinier, Frédéric Vély, and Eric Vivier. 2017. "Innate Lymphoid Cells: Major Players in Inflammatory Diseases." *Nature Reviews Immunology* 17(11):665–78.
- Elgueta, Daniela et al. 2017. "Pharmacologic Antagonism of Dopamine Receptor D3 Attenuates Neurodegeneration and Motor Impairment in a Mouse Model of Parkinson's Disease." *Neuropharmacology* 113:110–23.
- Fehres, Cynthia M., Wendy W. J. Unger, Juan J. Garcia-Vallejo, and Yvette van Kooyk. 2014. "Understanding the Biology of Antigen Cross-Presentation for the Design of Vaccines against Cancer." *Frontiers in Immunology* 5(APR):1–10.
- Figuroa, Claudio et al. 2017. "Inhibition of Dopamine Receptor D3 Signaling in Dendritic

- Cells Increases Antigen Cross-Presentation to CD8+T-Cells Favoring Anti-Tumor Immunity." *Journal of Neuroimmunology* 303:99–107.
- Flores-Santibáñez, Felipe et al. 2015. "CD73-Mediated Adenosine Production Promotes Stem Cell-like Properties in Mouse Tc17 Cells." *Immunology* 146(4):582–94.
- Förster, Reinhold, Ana Clara Davalos-Miszlitz, and Antal Rot. 2008. "CCR7 and Its Ligands: Balancing Immunity and Tolerance." *Nature Reviews Immunology* 8(5):362–71.
- Franz, Dafne et al. 2015. "Dopamine Receptors D3 and D5 Regulate CD4⁺T-Cell Activation and Differentiation by Modulating ERK Activation and CAMP Production." *Journal of Neuroimmunology* 284:18–29.
- Gonzalez, H. et al. 2013. "Dopamine Receptor D3 Expressed on CD4⁺ T Cells Favors Neurodegeneration of Dopaminergic Neurons during Parkinson's Disease." *The Journal of Immunology* 190(10):5048–56.
- Halle, Stephan, Olga Halle, and Reinhold Förster. 2017. "Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo." *Trends in Immunology* 38(6):432–43.
- Josefsson, E., J. Bergquist R. Ekmant, A. Tarkowski, and Clinical Immunology. 1996. "Of These Cells By Induction of Apoptosis." *Science* 140–46.
- Jung, Won Cheol, Jean Pierre Levesque, and Marc J. Ruitenberg. 2017. "It Takes Nerve to Fight Back: The Significance of Neural Innervation of the Bone Marrow and Spleen for Immune Function." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 61:60–70.
- Kaech, Susan M. and Weiguo Cui. 2012. "Transcriptional Control of Effector and Memory CD8⁺ T Cell Differentiation." *Nature Reviews Immunology* 12(11):749–61.
- Kapnick, Senta M., Jane C. Stinchcombe, Gillian M. Griffiths, and Pamela L. Schwartzberg. 2017. "Inducible T Cell Kinase Regulates the Acquisition of Cytolytic Capacity and Degranulation in CD8⁺ CTLs." *The Journal of Immunology* 1601202.
- Kassel, S., J. S. Schwed, and H. Stark. 2015. "Dopamine D₃ Receptor Agonists as Pharmacological Tools." *European Neuropsychopharmacology* 25(9):1480–99.
- Kim, Hyoung Pyo, John Kelly, and Warren J. Leonard. 2001. "The Basis for IL-2-Induced IL-2 Receptor α Chain Gene Regulation: Importance of Two Widely Separated IL-2 Response Elements." *Immunity* 15(1):159–72.
- Kim, Marie T. and John T. Harty. 2014. "Impact of Inflammatory Cytokines on Effector and Memory CD8⁺ T Cells." *Frontiers in Immunology* 5(JUN):1–5.
- Kioussis, Dimitris and Vassilis Pachnis. 2009. "Immune and Nervous Systems: More Than Just a Superficial Similarity?" *Immunity* 31(5):705–10.
- Klein-Hessling, Stefan et al. 2017. "NFATc1 Controls the Cytotoxicity of CD8⁺ T Cells." *Nature Communications* 8(1):511.
- Kuol, Nyanbol, Lily Stojanovska, Vasso Apostolopoulos, and Kulmira Nurgali. 2018. "Crosstalk between Cancer and the Neuro-Immune System." *Journal of Neuroimmunology* 315(December 2017):15–23.

- Kustrimovic, Natasa et al. 2016. "Dopaminergic Receptors on CD4+ T Naive and Memory Lymphocytes Correlate with Motor Impairment in Patients with Parkinson's Disease." *Scientific Reports* 6(September):1–17.
- Laidlaw, Brian J., Joseph E. Craft, and Susan M. Kaech. 2016. "The Multifaceted Role of CD4+ T Cells in CD8+ T Cell Memory." *Nature Reviews Immunology* 16(2):102–11.
- Lan, Yu Long et al. 2017. "The Potential Roles of Dopamine in Malignant Glioma." *Acta Neurologica Belgica* 117(3):613–21.
- Levite, M. 2016. "Dopamine and T Cells: Dopamine Receptors and Potent Effects on T Cells, Dopamine Production in T Cells, and Abnormalities in the Dopaminergic System in T Cells in Autoimmune, Neurological and Psychiatric Diseases." *Acta Physiologica* 216(1):42–89.
- Levite, Mia, Franca Marino, and Marco Cosentino. 2017. "Dopamine, T Cells and Multiple Sclerosis (MS)." *Journal of Neural Transmission* 124(5):525–42.
- Mackie, Phillip et al. 2018. "The Dopamine Transporter: An Unrecognized Nexus for Dysfunctional Peripheral Immunity and Signaling in Parkinson's Disease." *Brain, Behavior, and Immunity*.
- Malek, Thomas R. and Iris Castro. 2010. "Interleukin-2 Receptor Signaling: At the Interface between Tolerance and Immunity." *Immunity* 33(2):153–65.
- Marino, Franca and Marco Cosentino. 2016. "Multiple Sclerosis: Repurposing Dopaminergic Drugs for MS - The Evidence Mounts." *Nature Reviews Neurology* 12(4):188–89.
- Martínez-Lostao, Luis, Alberto Anel, and Julián Pardo. 2015. "How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells?" *Clinical Cancer Research* 21(22):5047–56.
- Martini, Matteo et al. 2010. "IFN- γ -Mediated Upmodulation of MHC Class I Expression Activates Tumor-Specific Immune Response in a Mouse Model of Prostate Cancer." *Vaccine* 28(20):3548–57.
- Masi, Anne, Nicholas Glozier, Russell Dale, and Adam J. Guastella. 2017. "The Immune System, Cytokines, and Biomarkers in Autism Spectrum Disorder." *Neuroscience Bulletin* 33(2):194–204.
- Mittrücker, Hans-Willi, Alexander Visekruna, and Magdalena Huber. 2014. "Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells." *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 62(6):449–58.
- Moschovakis, Georgios L. et al. 2018. "The Chemokine Receptor CCR7 Is a Promising Target for Rheumatoid Arthritis Therapy." *Cellular and Molecular Immunology* (March):1–9.
- Netea, Mihai G. et al. 2016. "Trained Immunity: A Program of Innate Immune Memory in Health and Disease." *Science*.
- Nolz, Jeffrey C., Gabriel R. Starbeck-Miller, and John T. Harty. 2011. "Naive, Effector and Memory CD8 T Cell Trafficking: Parallels and Distinctions." *Immunotherapy* 3(10):1223–33.

- Nowarski, R., N. Gagliani, S. Huber, and R. A. Flavell. 2013. "Innate Immune Cells in Inflammation and Cancer." *Cancer Immunology Research* 1(2):77–84.
- Ou-Yang, C. -w. et al. 2012. "Role of LAT in the Granule-Mediated Cytotoxicity of CD8 T Cells." *Molecular and Cellular Biology* 32(14):2674–84.
- Pacheco, Rodrigo. 2018. "Dopaminergic Stimulation of Myeloid Antigen-Presenting Cells Attenuates Signal Transducer and Activator of Transcription 3-Activation Favouring the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." 9(March):1–16.
- Pacheco, Rodrigo. 2017. "Targeting Dopamine Receptor D3 Signalling in Inflammation." *Oncotarget* 8(5):4–5.
- Pacheco, Rodrigo, Francisco Contreras, and Moncef Zouali. 2014. "The Dopaminergic System in Autoimmune Diseases." *Frontiers in Immunology* 5(MAR):1–17.
- Pacheco, Rodrigo, Carolina E. Prado, Magaly J. Barrientos, and Sebastián Bernales. 2009. "Role of Dopamine in the Physiology of T-Cells and Dendritic Cells." *Journal of Neuroimmunology* 216(1–2):8–19.
- Pavlov, Valentin A. and Kevin J. Tracey. 2012. "The Vagus Nerve and the Inflammatory Reflex - Linking Immunity and Metabolism." *Nature Reviews Endocrinology* 8(12):743–54.
- Pinoli, Monica and Franca Marino. 2017. "Dopaminergic Regulation of Innate Immunity : A Review."
- Porciello, Nicla et al. 2018. "A Non-Conserved Amino Acid Variant Regulates Differential Signalling between Human and Mouse CD28." *Nature Communications* 9(1):1–16.
- Rivera, Amariliz, Mark C. Siracusa, George S. Yap, and William C. Gause. 2016. "Innate Cell Communication Kick-Starts Pathogen-Specific Immunity." *Nature Immunology* 17(4):356–63.
- Roche, Paul A. and Kazuyuki Furuta. 2015. "The Ins and Outs of MHC Class II-Mediated Antigen Processing and Presentation." *Nature Reviews Immunology* 15(4):203–16.
- Rodríguez, Teresa et al. 2007. "Distinct Mechanisms of Loss of IFN-Gamma Mediated HLA Class I Inducibility in Two Melanoma Cell Lines." *BMC Cancer* 7:1–11.
- Rollings, Christina M., Linda V. Sinclair, Hugh J. M. Brady, Doreen A. Cantrell, and Sarah H. Ross. 2018. "Interleukin-2 Shapes the Cytotoxic T Cell Proteome and Immune Environment—sensing Programs." *Science Signaling* 11(526).
- Ross, Sarah H. and Doreen A. Cantrell. 2018. "Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes." *Annu. Rev. Immunol* 36:411–33.
- Saha, Baisakhi, Amal Chandra Mondal, Sujit Basu, and Partha Sarathi Dasgupta. 2001. "Circulating Dopamine Level, in Lung Carcinoma Patients, Inhibits Proliferation and Cytotoxicity of CD4+ and CD8+ T Cells by D1 Dopamine Receptors: An in Vitro Analysis." *International Immunopharmacology* 1(7):1363–74.
- Sarkar, Chandrani, Biswarup Basu, Debanjan Chakroborty, Partha Sarathi Dasgupta, and Sujit Basu. 2010. "The Immunoregulatory Role of Dopamine: An Update." *Brain*,

Behavior, and Immunity 24(4):525–28.

Schoenborn, Jamie R. and Christopher B. Wilson. 2007. “Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses.” 96(07).

Slota, Christina, Alvin Shi, Guobing Chen, Margaret Bevans, and Nan ping Weng. 2015. “Norepinephrine Preferentially Modulates Memory CD8 T Cell Function Inducing Inflammatory Cytokine Production and Reducing Proliferation in Response to Activation.” *Brain, Behavior, and Immunity* 46:168–79.

Spolski, Rosanne, Peng Li, and Warren J. Leonard. 2018. “Biology and Regulation of IL-2: From Molecular Mechanisms to Human Therapy.” *Nature Reviews Immunology*.

Sternberg, Esther M. 2006. “Neural Regulation of Innate Immunity: A Coordinated Nonspecific Host Response to Pathogens.” *Nature Reviews Immunology* 6(4):318–28.

Strange, P. 2002. “Dopamine Receptors.” *Tocris Review No. 15* 1–6.

Strell, Carina et al. 2009. “Divergent Effects of Norepinephrine, Dopamine and Substance P on the Activation, Differentiation and Effector Functions of Human Cytotoxic T Lymphocytes.” *BMC Immunology* 10:1–15.

Tähtinen, Siri et al. 2015. “Favorable Alteration of Tumor Microenvironment by Immunomodulatory Cytokines for Efficient T-Cell Therapy in Solid Tumors.” *PLoS ONE* 10(6):1–20.

Takenaka, Maisa C., Marcia G. Guerreschi, and Alexandre S. Basso. 2017. “Neuroimmune Interactions: Dendritic Cell Modulation by the Sympathetic Nervous System.” *Seminars in Immunopathology* 39(2):165–76.

Takeuchi, Arata and Takashi Saito. 2017. “CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4⁺T Cells, Their Differentiation and Function.” *Frontiers in Immunology* 8(FEB):1–7.

Turner, Jackson S., Matangi Marthi, Zachary L. Benet, and Irina Grigorova. 2017. “Transiently Antigen-Primed B Cells Return to Naive-like State in Absence of T-Cell Help.” *Nature Communications* 8:1–11.

Valbon, Stefanie F., Stephanie A. Condotta, and Martin J. Richer. 2016. “Regulation of Effector and Memory CD8⁺T Cell Function by Inflammatory Cytokines.” *Cytokine* 82:16–23.

Veiga-Fernandes, Henrique and Daniel Mucida. 2016. “Neuro-Immune Interactions at Barrier Surfaces.” *Cell* 165(4):801–11.

Watanabe, Y. et al. 2006. “Dopamine Selectively Induces Migration and Homing of Naive CD8⁺ T Cells via Dopamine Receptor D3.” *The Journal of Immunology* 176(2):848–56.

Waters, Lynnea R., Fasih M. Ahsan, Dane M. Wolf, Orian Shirihai, and Michael A. Teitell. 2018. “Initial B Cell Activation Induces Metabolic Reprogramming and Mitochondrial Remodeling.” *IScience* 5:99–109.

Wrona, Danuta. 2006. “Neural-Immune Interactions: An Integrative View of the

Bidirectional Relationship between the Brain and Immune Systems.” *Journal of Neuroimmunology* 172(1–2):38–58.

Xue, Li et al. 2018. “Associations between D3R Expression in Synovial Mast Cells and Disease Activity and Oxidant Status in Patients with Rheumatoid Arthritis.”

Yan, Yiqing et al. 2015. “Dopamine Controls Systemic Inflammation through Inhibition of NLRP3 Inflammasome.” *Cell* 160(1–2):62–73.

Ye, Congxiu, David Brand, and Song G. Zheng. 2018. “Targeting IL-2: An Unexpected Effect in Treating Immunological Diseases.” *Signal Transduction and Targeted Therapy* 3(1):2.

Zhang, Shuning et al. 2010. “Antigen-Specific Clonal Expansion and Cytolytic Effector Function of CD8 + T Lymphocytes Depend on the Transcription Factor Bcl11b.” *207(8):1687–99.*