

UCH-FC
DOC-BMCM
E41
C11



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS QUE REGULAN LA ACTIVACIÓN E INDUCCIÓN
DEL *HOMING* EN LOS LINFOCITOS T POR CÉLULAS DENDRÍTICAS**

TESIS ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE

EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS

PARA OPTAR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR Y NEUROCIENCIAS

FACULTAD DE CIENCIAS

POR

RAÚL ANDRÉS ELGUETA REBOLLEDO

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO ROSEMBLATT

CO-DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA ROSA BONO

Santiago – Chile
2007



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

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

RAÚL ANDRÉS ELGUETA REBOLLEDO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de Septiembre de 2007.

Director de Tesis:
Dr. Mario Rosemblatt

Co-Director de Tesis
Dra. María Rosa Bono

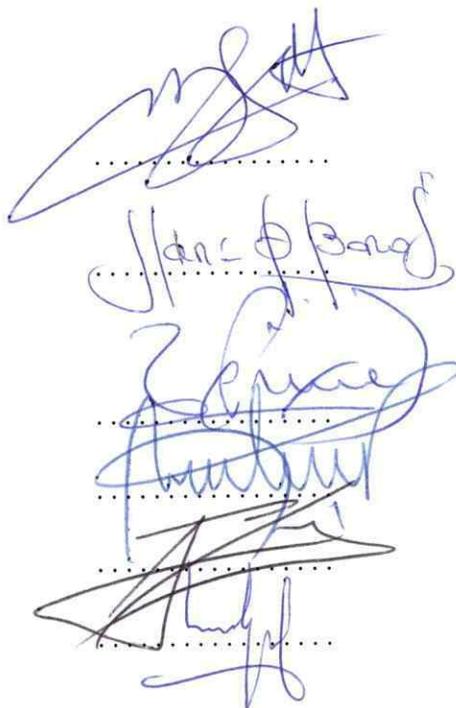
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marco Tulio Nuñez

Dr. Alexis Kalergis

Dr. Flavio Salazar

Dr. Ulises Vergara





A mis dos grandes amores, Rosa Rebolledo y Evelyn Pardo



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo agradecer a los Drs. Mario Roseblatt y María Rosa Bono por haberme recibido en su laboratorio, por formarme como científico y permitirme desarrollar este hermoso proyecto. Mario y María Rosa siempre me apoyaron, me alentaron para seguir adelante, siempre me dieron buenos consejos y estaré agradecido por siempre de haberlos conocido.

También deseo agradecer a los Drs. Alberto Fierro y Jorge Morales que siempre han estado constantemente sugiriendo ideas durante el desarrollo de esta Tesis.

Quiero agradecer especialmente al Dr. Randolph Noelle quien me permitió realizar una estadía en su laboratorio en Dartmouth Medical School. Gracias por el inmeso apoyo y gestiones.

Quiero agradecer a los Drs. Juan Carlos Sáez y Alexis Kalergis por compartir su experiencia sobre las uniones en hendiduras en el sistema inmune.

Agradezco a los integrantes de la comisión por la buena disposición y voluntad que siempre han manifestado, por sus aportes al progreso de mi tesis, el gran interés que han mostrado por mi trabajo, como también por haber revisado con diligencia y dedicación esta tesis.

A mis compañeros de Laboratorio, a esa "Familia Inmuno" en donde uno crece con los compañeros que nos dejaron y a los nuevos que se integran. Daniela Sauma compañera y buena amiga. A Valeska Simon por su alegría y sabiduría. A Fernando Sepúlveda quien estuvo en el comienzo de este proyecto. No puedo dejar de mencionar a Felipe Vilches quien siempre pudo llevar las tareas encomendadas. A Pablo "Fashion"



Vargas siempre tratando de aportar con sus conocimientos. Además, quiero agradecer a Paula Michea, Alejandra Gleisner, Gonzalo Ureta, Fabiola Osorio, Jocelyn Neira y Jennifer Alfaro, la generación de los ochenta del "lab inmuno" y a la "nueva ola" Paz Reyez, Paola Solanes, Carolina Alarcón, Jaimillo De Calisto y Pablillo Espejo. Al personal Técnico del laboratorio Evita "los problemas" y Pamela Palma, sin ellas el laboratorio entra en caos. Quiero dar gracias especialmente a un amigo que encontré aquí a Leonardo Vargas, siempre estuvo al lado mío durante este proceso y estará por siempre en mi corazón.

No puedo dejar de agradecer al Dr. Manuel Santos quien siempre me incentivó a seguir en el camino de la Ciencia y entrar a este programa de Doctorado.

También quiero darle las gracias a todos mis amigos, Daniel Muñoz, Felipe Riveros, Gloria González, Raquel Ibáñez, Karina Alviña, quien me cobijó en NY, Andrés Norambuena y la "Anto", la Sole, Cristóbal Ruiz y la "Cony".

Me siento afortunado por la familia que tengo, mi "viejita linda" Rosa Rebolledo me faltarían palabras para poder agradecerle todo ese apoyo incondicional, a mis hermanos Francisco y Rafael, siempre preocupados por mí. A mi tío "Mono" y a la tía "Mona" siempre orgullosos de mí y preocupados de mí acontecer.

Este último párrafo lo dejo especialmente a mi Bello Rocío del Amanecer, Evelyn Pardo, quien ha estado conmigo desde el inicio de este proceso, con su compañía, amor y entrega me dio la energía necesaria en los momentos más difíciles y el regocijo en los momentos de dicha, gracias por ese apoyo incondicional.



Agradezco el Fundamental Apoyo Financiero de:

Beca de Financiamiento de Tesis de Doctorado de la Vicerrectoría Académica,
Universidad de Chile.

Proyectos FONDECYT Regulares 1060834 y 1060253

Becas de CONICYT Término de Tesis

Beca MECESUP para estudio de Doctorado

Beca MECESUP para pasantías al extranjero

MILLENIUM INSTITUTE FUNDAMENTAL AND APPLIED BIOLOGY (MIFAB)

Todas estas Instituciones, a través de su apoyo financiero, hicieron posible el desarrollo de esta tesis y me permitieron al mismo tiempo dar lo mejor de mí en el programa de doctorado.



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de <i>homing</i> tejido específico a mucosa intestinal y a piel.....	8
Figura 2. Enzimas involucradas en la síntesis del ácido retinoico.....	9
Figura 3. IL-4 aumenta la expresión de CCR9 en los LT CD4 ⁺ activados con CD-LNM.....	35
Figura 4. IL-4 reduce la expresión de CD62L en los LT CD4 ⁺ activados con CD-LNM.....	36
Figura 5. IL-4 aumenta la expresión de CCR9 y reduce la expresión de CD62L en los LT CD4 ⁺ activados con CD-LNP.....	37
Figura 6. IL-4 no actúa directamente sobre los LT CD4 ⁺ para inducir el aumento en la expresión de CCR9.....	40
Figura 7. La contribución de IL-4 al aumento de CCR9 en LT CD4 ⁺ es mediada por las CD-LNM.....	41
Figura 8. IL-4 no afecta la expresión de $\alpha 4\beta 7$ en LT CD4 ⁺ activados por las CD-LNM <i>Il4ra</i> ^{-/-}	42
Figura 9. IL-4 no afecta el grado de activación en LT CD4 ⁺ activados por las CD-LNM <i>Il4ra</i> ^{-/-}	43
Figura 10. Los LT CD4 ⁺ activados con CD-LNM de ratones <i>Il4ra</i> ^{-/-} migran escasamente a la mucosa intestinal.....	45
Figura 11. IL-4 regula la expresión de CCR9 en los LT CD4 ⁺ <i>in vivo</i>	47
Figura 12. LT CD4 ⁺ activados con CD-LNM wt migran eficazmente hacia la mucosa intestinal de ratones <i>Il4ra</i> ^{-/-}	48



Figura 13. CD-LNM *Il4ra*^{-/-} inducen pobremente CCR9 en LT CD4⁺ DO11.10⁺ en LNM de ratones BALB/c.....51

Figura 14. Expresión de CCR9 en LT CD4⁺ DO11.10⁺ en LNM de ratones *Il4ra*^{-/-} inmunizados con la proteína OVA más CFA.....52

Figura 15. IL-4 aumenta la expresión del mRNA de RALDH2 en CD-LNM de ratones ANDxB10.BR.....55

Figura 16. IL-4 no aumenta la expresión del mRNA de RALDH2 en CD-LNM de ratones *Il4ra*^{-/-} o controles.....56

Figura 17. Citral reduce la expresión de CCR9 en LT activados en presencia de IL-4.....58

Figura 18. CDs forman UH con LT CD4⁺ durante la presentación de antígenos..... 61

Figura 19. Las CDs y LT CD4⁺ expresan conexina 43, subunidad de la UH.....62

Figura 20. El bloqueo de las UH inhibe la expresión de CD69 en los LT CD4⁺.....65

Figura 21. El bloqueo de las UH mantiene la expresión de CD62L en los LT ...66

Figura 22. La inhibición de las UH reduce la secreción de IL-2 en LT CD4⁺.....67

Figura 23. La inhibición de las UH afecta la proliferación de los LT CD4⁺.....68

Figura 24. Los inhibidores de las UH no afectan directamente la activación de los LT CD4⁺.....70

Figura 25. Los inhibidores de las UH no afectan el fenotipo de las CDs durante los co-cultivos.....71



ABREVIATURAS

2-ME	:	2-Mercaptoetanol
AR	:	Ácido Retinoico
Ba	:	Bazo
BGA	:	<i>β-Glicirretinoic Acid</i>
CFA	:	Adyuvante Completo de Freund
CDs	:	Célula Dendrítica
CD-LNM	:	Células Dendríticas de linfonodo mesentérico
CD-LNP	:	Células Dendríticas de linfonodo periférico
CD-PP	:	Células Dendríticas de Placas de Peyer
CFSE	:	Succimidil éster-diacetato de carboxifluoreceína
CLA	:	<i>Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen</i>
CTACK	:	<i>Cutaneous T cell-Attracting Chemokine (CCL27)</i>
DMEM	:	<i>Dulbecco's modified Eagle's media</i>
DMPC	:	Dimetilpirocarbonato
EDTA	:	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
ELISA	:	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	:	Suero fetal bovino
FITC	:	Isotiocianato de Fluoresceína
HBSS	:	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HEV	:	<i>High Endothelial Venules</i>

IL-4	:	Interleuquina 4
<i>Il4ra -/-</i>	:	Ratones deficiente en la cadena α del receptor de IL-4
IEL	:	Linfocitos intraepiteliales
IH	:	Indice de <i>homing</i>
IMDM	:	<i>Iscoe's Modified Dulbecco's Medium</i>
IMF	:	Intensidad Media de Fluorescencia
LNM	:	Linfonodo mesentérico
LNP	:	Linfonodo periféricos
LP	:	Lámina Propia del Intestino delgado
LT	:	Linfocito T
MHC-II	:	Complejo principal de histocompatibilidad de clase II
MACS	:	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MadCAM-1	:	<i>Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1</i>
MDC	:	<i>Macrophage-Derived Chemokine (CCL22)</i>
MIP3 α	:	<i>Macrophage Inflammatory Protein-3a (CCL20)</i>
NK	:	Natural Killer
OLS	:	Órgano Linfoide Secundario
OVA	:	Ovalbúmina
PBS	:	Tampón Fosfato Salino
PCC	:	Citocromo c de Palomo
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	:	Ficoeritrina

PNAd	:	<i>Peripheral Lymph-Node Addressins</i>
PP	:	Placas de Peyer
RALDH2	:	Retinaldeído Deshidrogenasa
RNA	:	Ácido ribonucleico
RT	:	Transcriptasa reversa
TARC	:	<i>Thymus and Activation-Regulated Chemokine (CCL17)</i>
TCR	:	Receptor de Linfocito T
TECK	:	<i>Thymus Expressed Chemokine (CCL25)</i>
Th1/Th2	:	T helper 1/ T helper 2
TRITC	:	Isotiocianato de tetrametilrodamina
UH	:	Uniones en Hendidura

RESUMEN

La literatura muestra la importancia de las células dendríticas (CDs) en la activación, la polarización y en la inducción del *homing* de los linfocitos T (LT). El *homing* es determinado por la expresión diferencial de moléculas de adhesión en los diferentes subgrupos de LT. Uno de los modelos mejor estudiado de *homing* es la migración de los LT hacia la lámina propia y compartimiento intraepitelial del intestino delgado. Para que esta migración ocurra los LT deben expresar el receptor de quimioquina 9 (CCR9) y la integrina $\alpha 4\beta 7$ (que se unen a CCL25 y MAdCAM-1, respectivamente). Además resultados de otros investigadores han demostrado que el ácido retinoico (AR) producido por la CDs de la mucosa intestinal es capaz de inducir CCR9 y $\alpha 4\beta 7$ en los LT, confiriéndoles a estas células la capacidad de migrar al epitelio intestinal.

Hasta el momento no se ha evaluado otras señales solubles o de contacto, producidas por las CDs que estarían regulando el *homing* de los LT hacia la mucosa intestinal. El objetivo de esta tesis es determinar el mecanismo por el cual las células dendríticas regulan la activación y el *homing* hacia la mucosa gastrointestinal en los linfocitos T.

En esta tesis demostramos que LT activados con CDs de LNM en presencia de IL-4 muestran una mayor expresión de CCR9, comparados a LT activados en ausencia de esta citoquina. IL-4 actúa a través de las CDs, ya que

IL-4 no induce la expresión de CCR9 en los LT durante la activación de estas células con anticuerpos anti-CD3 más anti-CD28 en ausencia de CDs. Además LT activados con CDs deficientes de la cadena α del receptor de IL-4 (Il4ra^{-/-}) en presencia o ausencia de IL-4 no induce la expresión de CCR9. Por otra parte, investigamos la relación entre IL-4 y la enzima involucrada en la síntesis del AR (RALDH2) en el fenómeno de *homing*. Nuestros resultados muestran que IL-4 incrementa la expresión del mRNA de RALDH2 en CDs de LNM en ratones C57BL6. Sin embargo, IL-4 no afecta los niveles de mRNA de RALDH2 en CD-LNM de ratones BALB/c sugiriendo que los mecanismos de IL-4 para inducir CCR9 en los LT en ambas cepa de ratón son distintos.

Debido al estrecho contacto celular producido durante la presentación de antígenos entre las CDs y los LT, en este trabajo evaluamos la formación de las uniones en hendidura (UH) entre estas poblaciones celulares, y el rol funcional de estas estructuras juegan en la activación del LT. El estado funcional de las UH se evaluó en co-cultivos de CDs y LT en presencia del antígeno específico, mediante la microinyección de amarillo Lucifer en CDs y transferencia a LT. Encontramos que las CDs se encontraban acopladas a los LT, fenómeno que se bloqueó con inhibidores de las UH. Dicha interacción tiene un correlato funcional ya que su bloqueo inhibió la activación y proliferación de los LT. Nuestros resultados además muestran que los inhibidores de las UH no afectan la maduración de las CDs en los co-cultivos, ni tampoco afecta la activación de

los LT cuando se activan en ausencia de CDs, sugiriendo que las UH formadas entre las CDs y los LT son esenciales para la activación linfocitaria.

En conclusión, hemos demostrado que IL-4 induce a través de las CDs la expresión de CCR9 en los LT CD4⁺ y que la formación de las UH funcionales entre CDs y LT, durante la presentación antigénica es importante en la activación de los LT.

ABSTRACT

Data from the literature clearly demonstrate that dendritic cells (DCs) play an important role on the activation, polarization and the induction of *homing* of T cells. T cell *homing* is determined by the differential surface expression of adhesion molecule in different sub-groups of T cells. One of the better-studied *homing* models is the one related to T cell migration to the lamina propria and intraepithelial compartment of the small intestine. Migration to these compartments requires that T cells express on their membranes both, Chemokine Receptor 9 (CCR9) and the integrin $\alpha 4\beta 7$ that bind to CCL25 and MAdCAM-1, respectively. Furthermore, data from the literature shows that retinoic acid (RA) produced by DCs from small intestine is able to induce CCR9 and $\alpha 4\beta 7$ on CD4 T cells, conferring to these cells the capacity to migrate to small intestine. Other soluble or contact signals produced by DCs that could regulate T cell *homing* to the small intestine have not been evaluated yet.

The main objective of this thesis is to identify the mechanisms by which DCs from mesenteric lymph nodes (MLN) induce T cell *homing* towards the small intestine.

We demonstrate that T cells activated with DCs from MLN in the presence of IL-4 show a greater surface expression of CCR9 compared to T cells activated in absence of this cytokine. IL-4 acts through DCs, since the increase in CCR9 expression is not seen when T cell are polyclonally activated

with anti-CD3 plus anti-CD28 antibodies in absence of DCs. As a consequence of this, T cells activated with DCs from knockout mice for the alpha chain of the IL-4 receptor (*Il4ra-/-*) do not induce the CCR9 expression. On the other hand, we also investigated the relation between IL-4 and the enzyme RALDH2 -one of the enzymes involved in RA synthesis- in the *homing* phenomenon. Our results show that IL-4 increases RALDH2 gene expression on DCs from MLN from C57BL6 mice. Nevertheless, IL-4 does not affect the levels of RALDH2 gene on DC-MLN from BALB/c mice, suggesting that the mechanisms involving the induction of CCR9 by IL-4 on T cells in both mouse strains are different.

Due to the close cellular contact produced between DCs and T cells during the antigen presentation, in this work we evaluated gap junction (GJ) formation between these two cell populations, as well as the functional role these structures may play on T cell activation. The functional state of GJ was evaluated in co-cultures of DCs and T cells in the presence of the specific antigen, by means of the Lucifer yellow microinjection in DCs and transference to T cell. We found that DCs and T cells are coupled, phenomenon that was blocked by GJ inhibitors. This interaction has a functional correlate since GJ inhibitors also blocked T cell activation and proliferation. Our results show that the GJ inhibitors do not affect DC maturation, nor they affects T cell activation when these cells are they polyclonally activated in the absence of DCs, suggesting that GJ formed between DCs and T cells are essential for the lymphocyte activation.

In conclusion, we have demonstrated that IL-4 induces CCR9 expression on CD4⁺ T cells through MLN DCs, and that the GJ formation between DCs and T cells, during the antigenic presentation is important in T cell activation.

INTRODUCCIÓN

Una de las características esenciales de la respuesta inmune es la compartamentalización del encuentro del linfocito T (LT) con su antígeno específico (Von Andrian y Mackay, 2000). Este encuentro se desarrolla en los órganos linfoides secundarios (OLS) donde las células dendríticas (CDs), células presentadoras profesionales de antígenos, presentan los antígenos a los LT vírgenes (Banchereau y col., 2000). Las CDs capturan y procesan los antígenos en los sitios de entrada de los patógenos para luego migrar hacia los OLS y presentarlos en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) a los LT CD4⁺ (Banchereau y col., 2000) y a los linfocitos T CD8⁺ (LT citotóxico) en el contexto de MHC-I (Larsson y col., 2001). Dependiendo de su estado de maduración, promueven o suprimen la respuesta inmune de los LT (Vlad y col., 2005). Al respecto, si la CD capta antígenos en un contexto inflamatorio, como por ejemplo una infección microbiana, esta célula entra en la fase terminal de maduración activando a los LT vírgenes para convertirlos posteriormente en LT efectores, iniciando de este modo la respuesta inmune (Levings y col., 2005), así los LT CD4⁺ efectores secretarán citoquinas efectoras tales como interferón- γ (IFN- γ) e interleuquina-4 (IL-4) dependiendo del compromiso de diferenciación que adquirieron, es decir, si tienen fenotipo T *helper* 1 o 2, respectivamente, mientras que los linfocitos T CD8⁺ se encargarán, entre otras cosas, de eliminar células infectadas por

patógenos intracelulares (Kaech y col., 2002). Por otro lado, en un estado no inflamatorio, las CD8 inmaduras o semimaduras tienen un papel distinto en la regulación del sistema inmune ya que promueven tolerancia. Debido a la importancia que tienen las CD8 en la regulación de diversos procesos en los LT, en esta tesis evaluamos el efecto de señales solubles o de contacto producidas durante esta interacción en los eventos inducidos en el LT.

FACTORES SOLUBLES QUE REGULAN EL *HOMING*

Quimioquinas y *homing* tejido específico.

Una vez que el LT es activado, éstos salen de los OLS y migran preferentemente hacia los tejidos periféricos (tejidos terciarios no linfoides) lugar de entrada del patógeno, mejorando así la probabilidad de encontrarse con el antígeno (Von Andrian y Mackay, 2000). Para esto, el LT debe interactuar con las células del endotelio de las vénulas postcapilares del tejido al cual están destinados, este proceso se denomina adhesión leucocitaria (Campbell y col., 2003).

El modelo de adhesión leucocitaria consta de cuatro etapas: a) reconocimiento y rotación sobre el endotelio, b) activación, c) adhesión firme y d) transmigración. El desarrollo de este proceso permite seleccionar los linfocitos que ingresan en los distintos tejidos. Los receptores de quimioquinas presentes en los LT cumplen un papel esencial al interactuar con las quimioquinas presentes en la superficie apical del endotelio, ya que esta

interacción induce una mayor avidéz y aumento de la afinidad de las integrinas presentes en el LT, permitiendo así la selección del LT que ingresa al tejido (Campbell y col., 2003).

Las quimioquinas son proteínas de bajo peso molecular (8 a 14 kDa) con propiedades quimioattractantes que se localizan en la superficie del endotelio vascular unidas a proteínas de matriz extracelular, que regulan el tráfico leucocitario a través de la interacción con receptores del tipo siete segmentos de transmembrana acoplados a proteína G (Sallusto y col., 2000, Zlotnik y Yoshie, 2000). Hoy en día es claro que las quimioquinas y sus receptores juegan un papel fundamental en el desarrollo, homeostasis y función del sistema inmune (Campbell y col., 2003).

Hasta el momento se han descrito más 40 quimioquinas distintas que se clasifican en cuatro familias, en base a su estructura de acuerdo a la configuración de determinados residuos de cisteína ubicados en el extremo N-terminal: CC-, CXC, C- y CX₃C- (Sallusto y col., 2000, Zlotnik y Yoshie, 2000). Varias evidencias indican que las quimioquinas y sus receptores dirigen la migración de los LT hacia determinados tejidos, este proceso es denominado *homing* tejido específico (Luster, 2001, Moser, 2001, Campbell y col., 2003). Es así como durante la activación de los LT en los OLS, los LT efectores, adquieren un patrón específico de moléculas de adhesión y receptores de quimioquinas, denominados receptores de *homing* tejido específico, que les permite ingresar a determinados tejidos periféricos (Campbell y col., 2003).

Existen tres modelos bien caracterizados de *homing* tejido específico. El primero es el modelo de *homing* a OLS, en donde se ha demostrado que la migración a linfonodos y placas de Peyer de LT vírgenes depende de la expresión de CD62L (L-selectina) y del receptor de quimioquina CCR7, los que reconocen a sus ligandos PNAd (Peripheral Lymph-nodes Addressins) y las quimioquinas CCL19 y CCL21, respectivamente. Estas últimas son expresadas constitutivamente por células del endotelio vascular de tipo columnar (HEV) (Campbell y Butcher, 2000, Von Andrian y Mackay, 2000). Sin embargo, la migración de LT a placas de Peyer requiere además de la expresión de la integrina $\alpha_4\beta_7$ en el LT, cuyo ligando es MadCAM1 (Von Andrian y Mackay, 2000). Debido a que el bazo carece de HEV, ninguna de estas moléculas estaría involucrada necesariamente en la migración de los LT a este órgano, sin embargo, se ha demostrado que CCR7 y CXCR5 (receptor para la quimioquina CXCL13) serían necesarios para la navegación a este órgano en los LT y linfocitos B, respectivamente (Von Andrian y Mackay, 2000).

Recientemente, se ha descrito que los LT de memoria central (linfocitos T de memoria que expresan receptores que les permitirían migrar a OLS) (Sallusto y col., 1999, Bjorkdahl y col., 2003) a diferencia de LT vírgenes, poseen un mecanismo de *homing* a linfonodos periféricos independiente de CCR7, mediado por la quimioquina CXCL12 y eventualmente por su receptor CXCR4 (Scimone y col., 2004).

El segundo modelo de *homing* tejido específico es a la piel, en donde un grupo específico de LT activados en los linfonodos asociados a piel (LNP) en condiciones inflamatorias, expresan una molécula denominada CLA (Cutaneous Lymphocyte-Associated Antigen o ligando de E-selectina) y ligando de P-selectina, lo que les permite interactuar con receptor, E-selectina y P-selectina, presente en el endotelio vascular que irriga a la piel (Picker y col., 1990a, Picker y col., 1990b). Además se han descrito dos receptores de quimioquinas que contribuyen al *homing* de los LT a piel. Estos son CCR10 y CCR4, los cuales se unen a CCL17/TARC y CCL27/CTACK respectivamente, presentes en las vénulas postcapilares cutáneas (Fig. 1) (Campbell y col., 1999, Homey y col., 2000, Homey y col., 2002, Dudda y col., 2004). Para la migración homeostática de LT de memoria efectores caracterizados por el fenotipo CD45RA⁻ CD62L⁻ CCR7⁻ (Sallusto y col., 1999) a estos tejidos, sería importante la interacción entre la quimioquina CCL1 (expresada en endotelio cutáneo y piel) y el receptor CCR8 expresado por LT (Schaerli y col., 2004).

El tercer modelo de *homing* tejido específico es hacia mucosa intraepitelial y lámina propia (LP) del intestino delgado (Fig. 1). En este modelo se ha demostrado que los LT activados en las Placas de Peyer (PP) y en el linfonodo mesentérico (LNM), expresan CCR9 (Zabel y col., 1999, Kunkel y col., 2000) y la integrina $\alpha 4\beta 7$ (Holzmann y col., 1989, Berlin y col., 1993), las cuales pueden interactuar con CCL25/TECK (Zaballos y col., 1999) y MAdCAM1

(Streeter y col., 1988) respectivamente, presentes en la superficie del endotelio de las vénulas postcapilar del intestino (Fig. 1).

En general, se ha descrito que la adquisición del potencial de *homing* de los LT efectores ocurre después de la activación en el OLS, y que dependería del microambiente donde ocurre la presentación del antígeno (Kantele y col., 1997, Campbell y Butcher, 2002) y del sitio de entrada del antígeno (Campbell y Butcher, 2002). En este proceso, las CDs jugarían un papel fundamental, debido a que son estas células las que llevan los antígenos desde los tejidos periféricos a los OLS y los presentan a los LT (Campbell y Butcher, 2002). Resultados de nuestro laboratorio y de otros investigadores han demostrado que las células dendríticas de Placas de Peyer (CD-PP) y de linfonodo mesentérico (CD-LNM) inducen en LT CD8⁺ y LT CD4⁺ una alta expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ y del receptor CCR9 e imprimen en estos un potencial de migración hacia la mucosa intestinal (Johansson-Lindbom y col., 2003, Mora y col., 2003, Dudda y col., 2004, Annacker y col., 2005, Dudda y col., 2005, Johansson-Lindbom y col., 2005, Stenstad y col., 2006). Por otro lado, se ha demostrado que células de Langerhans, un tipo de CD que reside en la epidermis y CDs de linfonodo periférico (CD-LNP), inducen en los LT la expresión de los receptores de *homing* a piel y la migración de éstas células a dicho tejido. (Dudda y col., 2004, Dudda y col., 2005, Mora y col., 2005). Estos resultados, confirman el rol esencial de las CDs en el establecimiento del *homing* en los LT (Fig. 1).

Si bien está claramente establecido el rol que tiene las CDs en la inducción de *homing* en los LT, se sabe poco sobre las señales producidas por las CDs que inducen la expresión de los receptores de *homing* en los linfocitos. Recientemente se ha demostrado que el ácido retinoico (AR) un derivado de la vitamina A induce la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ y el receptor CCR9, ambos receptores específicos de *homing* hacia la mucosa intestinal (Fig. 1 y Fig. 2) (Iwata y col., 2004). Además las CD-PP y CD-LNM expresan los mRNA de las enzimas que sintetizan el AR y son capaces de producir dicho compuesto cuando están en presencia de vitamina A (Iwata y col., 2004). Por otro lado, resultados recientes han demostrado que CD-LNP expresan las enzimas que sintetizan el compuesto activo de la vitamina D, el cual induce la expresión del receptor de *homing* a piel CCR10 en LT tratados con interleuquina 12 (IL-12) (Fig. 1) (Sigmundsdottir y col., 2007). Probablemente, además de estos derivados de vitaminas, existan otras moléculas que participen en la regulación de la expresión de los receptores de *homing* en los LT.

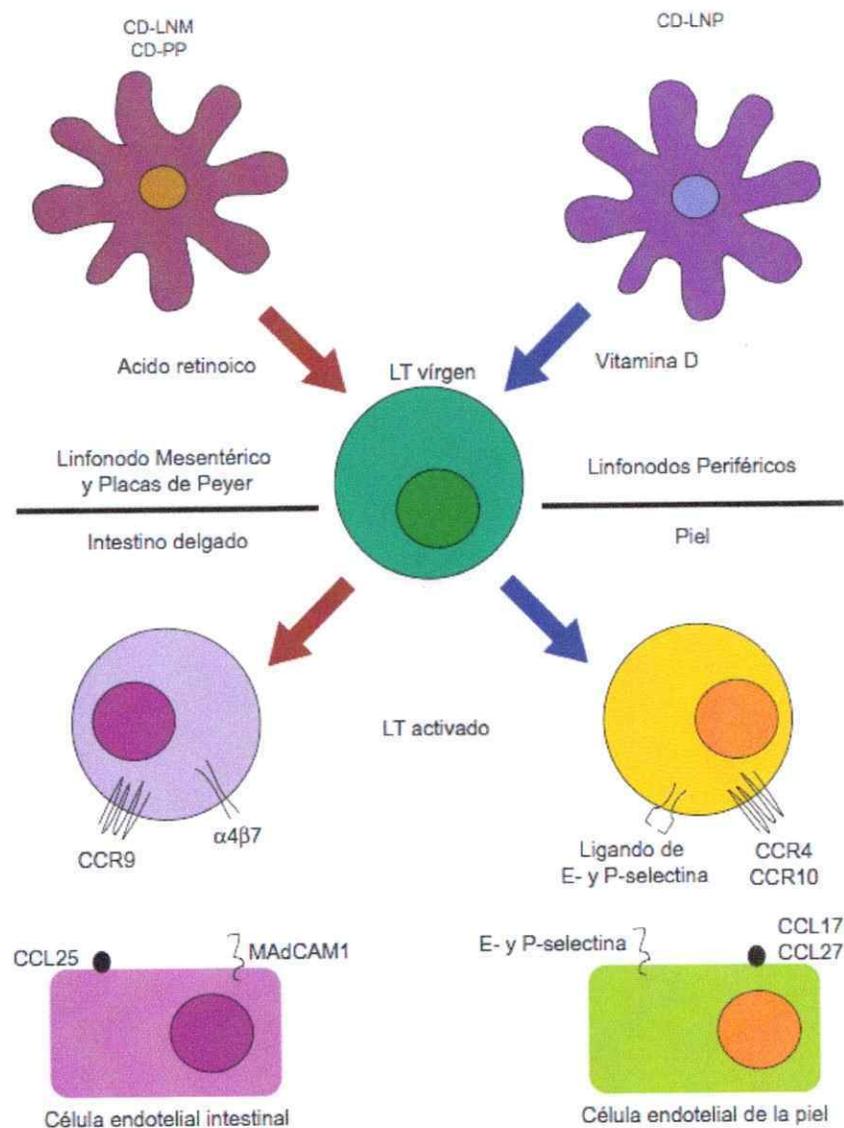


Figura 1. Modelo de *homing* tejido específico a mucosa intestinal y a piel. LT activados adquieren la expresión de $\alpha 4 \beta 7$ y CCR9 para migrar a la mucosa intestinal, cuando son activados con CDs de linfonodo mesentérico o de placas de Peyer. La capacidad de la CDs para inducir el *homing* a mucosa intestinal es mediada por ácido retinoico. Por otra parte, Las CDs de linfonodo periférico, a través de la síntesis del producto activo de la vitamina D, son capaces de inducir la expresión de los receptores de *homing* a piel en los LT.

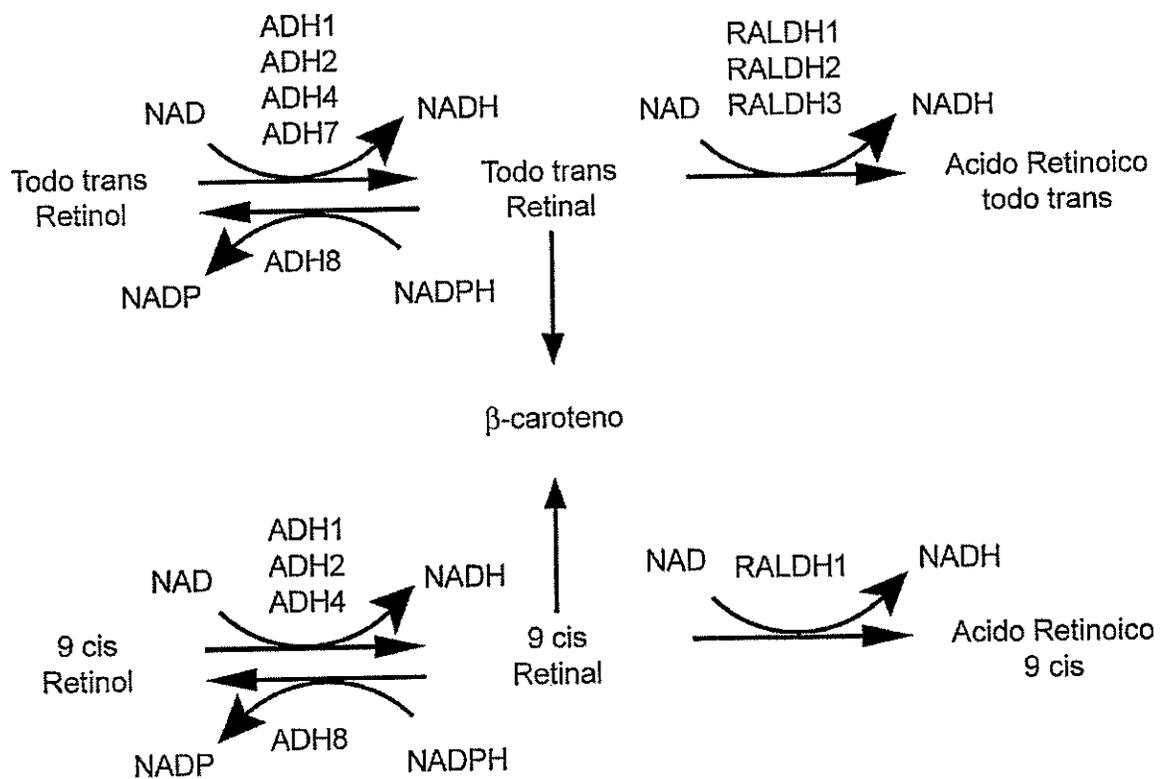


Figura 2. Enzimas involucradas en la síntesis del ácido retinoico.

El papel de interleuquina 4 en la respuesta inmune.

IL-4 es una citoquina producida por LT *helper* 2 de memoria, basófilos, mastocitos, y células NK en respuesta a estímulos de activación (Seder, 1996, Nelms y col., 1999), células que podrían interactuar con las CDs en los tejidos periféricos. Por otro lado, el receptor de IL-4 (IL-4R) puede encontrarse en varias formas, todas compuestas por la subunidad α de 140 KDa del IL-4R (IL-4R α) que une IL-4 con alta afinidad (Kd 20 a 300 pM). El receptor de tipo I de IL-4 se compone de IL-4R α asociado a la cadena γ_c , la cual es compartida además por los receptores de otras citoquinas (Sugamura y col., 1996). Mientras que el receptor de tipo II, está compuesto por IL-4R α y la cadena α del receptor de IL-13. Así, varias funciones de IL-4 pueden ser sustituidas por la acción de IL-13 en ratones KO para IL-4 (Lutz y col., 2002).

Mora y colaboradores han demostrado que IL-4 es capaz de inducir la expresión de CCR9 en LT CD8⁺ (Mora y col., 2005). Además, resultados recientes muestran que las CD-PP, pero no las de bazo, inducen la síntesis de IL-4 por los LT (Everson y col., 1998, Iwasaki y Kelsall, 1999) y que LT de memoria específicos para un antígeno administrado oralmente transfieren instrucciones a las CDs a través de señales que incluyen IL-4 (Alpan y col., 2004). Adicionalmente, la IL-4 puede también causar la disminución y en algunos casos la pérdida total de los receptores de *homing* a piel en los LT (Seneviratne y col., 2005). En conjunto estos resultados sugieren que la IL-4 podría afectar el *homing* de los LT CD4⁺ hacia la mucosa intestinal.

INTERACCIONES CÉLULA-CÉLULA

Uniones en hendidura en el sistema inmune.

Durante la presentación antigénica, el LT y la CD forman un estrecho contacto celular denominado sinapsis inmunológica, en esta estructura se forma el complejo supramolecular, el cual en su porción central se enriquece con moléculas de MHC-II, TCR y proteína quinasa C, mientras que en la región periférica se concentran integrinas y moléculas de adhesión (Monks y col., 1997, Monks y col., 1998, Lanzavecchia y Sallusto, 2000). Se ha propuesto que durante la sinapsis inmunológica existe la formación de uniones en hendidura (UH) (Saez y col., 2000).

Las UH son un tipo de comunicación entre células vecinas que permiten el paso de iones y otras moléculas con un peso molecular de hasta 1 KDa. Están compuestas por conexinas, las cuales son proteínas de cuatro segmentos de transmembrana que oligomeriza dentro de un hemicanal hexamérico denominado conexón. El conexón se expresa en la superficie celular y tiene la capacidad de unirse a otro conexón presente en la célula vecina, formando la UH (Saez y col., 2003, Oviedo-Orta y Howard Evans, 2004).

Existen evidencias sobre la expresión de conexinas y su posible papel en el sistema inmune (Oviedo-Orta y Howard Evans, 2004). Se ha observado que las UH también pueden regular la secreción de citoquinas y la secreción de

inmunoglobulinas en linfocitos (Oviedo-Orta y col., 2000, Oviedo-Orta y col., 2001). Además, se ha observado la formación de UH entre CDs activadas con LPS, INF- γ y TNF- α , son importantes en la maduración de dichas células (Matsue y col., 2006, Corvalan y col., 2007). Sobre la base de estas evidencias, se ha propuesto que las UH tendrían una participación importante en la activación de los LT (Saez y col., 2000, Oviedo-Orta y Evans, 2002, Corvalan y col., 2007).

En resumen, la evidencia apunta a que las CDs determinan el *homing* tejido específico (Johansson-Lindbom et al. 2003; Mora et al. 2003; Dudda et al. 2004), por lo tanto es importante analizar los mecanismos por los cuales las CDs de LNM inducen en forma diferencial y específica la migración de los LT a mucosa intestinal. En esta tesis se analizó el papel que cumple IL-4 en la inducción de los receptores de *homing* hacia la mucosa intestinal en los LT CD4⁺ y el papel que cumplen las UH entre CDs y LT en la activación del linfocito. Demostramos que IL-4 induce en LT CD4⁺ una mayor expresión de la molécula de *homing* a intestino CCR9 y que este efecto se produce a través de las CD-LNM y no directamente sobre el LT. Adicionalmente, establecimos una relación entre el efecto de la IL-4 y el efecto del ácido retinoico (AR) reportado por Iwata y col. (Iwata y col., 2004) ya que encontramos que la IL-4 induce en CD-LNM, pero no en CDs del linfonodo periférico (CD-LNP) un aumento en la expresión del mRNA para RALDH2, una enzima involucrada en la síntesis del

AR en CD-LNM. Así nuestros resultados correlacionan a IL-4, una citoquina presente en el microambiente del intestino y la producción de AR por CD-LNM con la adquisición del potencial del *homing* hacia el intestino de los LT CD4⁺.

Por último, observamos la formación de UH entre CDs y LT, y que la inhibición de las UH en los co-cultivos reduce la activación y proliferación de los LT. Además, los inhibidores de UH no afectan la maduración de las CDs en estos co-cultivos, ni tampoco afecta la activación de los LT cuando se activan con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en ausencia de CDs, sugiriendo fuertemente que las UH formadas entre CDs y LT, durante la presentación antigénica, son importantes para la activación del linfocito T.

HIPÓTESIS

Se ha establecido que la activación de los linfocitos T por parte de las células dendríticas de linfonodo mesentérico es esencial para la inducción del *homing* de los linfocitos a mucosa intestinal y que la activación requiere del contacto célula-célula además de la acción de factores solubles. En base a estos antecedentes, en este proyecto se propone la hipótesis siguiente:

“La inducción del *homing* en los linfocitos T a la mucosa intestinal por parte de la célula dendrítica, es favorecido por la acción de la Interleuquina 4, mientras que la activación depende de la formación de las uniones en hendiduras.”

OBJETIVO GENERAL

Determinar el mecanismo por el cual las células dendríticas regulan en los linfocitos T la activación y el *homing* hacia la mucosa intestinal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el rol de Interleuquina 4 en la inducción de los receptores de *homing* a mucosa intestinal en los LT CD4⁺ *in vitro*.
2. Identificar el tipo celular sobre el cual Interleuquina 4 está actuando para modular la expresión de los receptores de *homing* a mucosa intestinal en los LT CD4⁺.
3. Evaluar el rol de Interleuquina 4 en la inducción de los receptores de *homing* a mucosa intestinal en los LT CD4⁺ *in vivo*.
4. Determinar el mecanismo molecular por el cual Interleuquina 4 regula la expresión de los receptores de *homing* a mucosa intestinal en los LT CD4⁺.
5. Investigar el papel funcional de la formación de uniones en hendidura entre las células dendríticas y los linfocitos T durante la activación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales e Inmunizaciones

Se utilizaron ratones transgénicos para el TCR "AND" ($V\alpha 11^+V\beta 3^+$), background H-2^b (Kaye y col., 1989) los cuales se cruzaron con la cepa B10.BR (H-2^k), derivándose la cepa híbrida "ANDXB10.BR" ("ANDXB10.BR") cuyos LT (>95% $CD4^+V\alpha 11^+$) reconocen específicamente el péptido C-terminal del citocromo c de paloma (PCC_{87-104}) presentado en el contexto de la molécula MHC-II I-E^k. También se usaron ratones Balb/c (H-2^d), ratones knockout para la cadena alfa del receptor de IL-4 (*Il4ra*^{-/-}) en un background H-2^d (Noben-Trauth y col., 1997) y ratones DO11.10 (H-2^d) transgénicos para el TCR cuyos LT $CD4^+$ reconocen un péptido de ovoalbúmina ($OVA_{323-339}$) presentado en el contexto de la molécula MHC-II I-A^d (Murphy y col., 1990). Todas las cepas fueron adquiridas en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) y posteriormente mantenidas en un vivero libre de patógenos en la Fundación Ciencia para la Vida.

En algunos experimentos se inmunizaron ratones Balb/c y *Il4ra*^{-/-} con 1mg de proteína ovoalbúmina en PBS más adyuvante completo de Freund (CFA) en una razón 1:1 en un volumen total de 200 μ l, vía i.p (Johansson-Lindbom y col., 2003). En los ensayos de migración competitiva los ratones Balb/c y *Il4ra*^{-/-} se inmunizaron vía intragástrica usando jeringas de alimentación de 18 G (Thomas Cientific, USA) con 500 μ g de proteína OVA en

500 µl de PBS (Chen y col., 1997). Los protocolos de experimentación en animales se hicieron en acuerdo con las disposiciones del comité de Ética, Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Anticuerpos

Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales comerciales adquiridos en Pharmingen (USA). Conjugados a FITC (Isotiocianato de Fluoresceína): I-A/I-E clon 2G9 (reconoce haplotipos H-2^{b,d,k,p,q}) (Becker y col., 1992, Razi-Wolf y col., 1992), TCR V α 11 clon RR8-1 (Jameson y col., 1991), CD80/B7.1 clon 16-10A1 (Razi-Wolf y col., 1992), CD86/B7.2 clon GL1 (Hathcock y col., 1993). Conjugados a Ficoeritrina (PE): CD62L (L-selectina) clon MEL-14 (Gallatin y col., 1983), CD69 clon H1.2F3 (Yokoyama y col., 1988), CD11c clon N418 (Metlay y col., 1990), CD40 clon 3/23 (Hasbold y col., 1994), integrina α 4 β 7 heterodímero clon DAKT32 (Andrew y col., 1994), anti-rat IgM clon G53-238 y los controles de isotipo rat IgG2a, κ clon R35-95. Conjugados Cychrome: CD44 clon IM7 (Budd y col., 1987). Conjugados PE-Cy5: CD4 clon RM4-5 (Wu y col., 1991). También se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales purificados: I-A/I-E clon 2G9. anti-I-E^k clon 17-4-4S (Ozato y col., 1980), anti-I-A^d clon 34-5-3 (Ozato y col., 1982).

El anticuerpo conjugado FITC o PE-Cy5 anti-TCR DO11.10 clon KJ1-26 (Haskins y col., 1983) fue adquirido en Caltag (USA). Los anticuerpos purificados anti-CCR9 clon 5F2 (Pabst y col., 2004) y su control de isotipo rat

IgM clon MAC 158 fueron facilitados por el Dr. Michael Briskin (Millennium Pharmaceutical, Boston, MA, USA). Los anticuerpos monoclonales purificados anti-CD3 clon 145-2C11 (Leo y col., 1987) y anti-CD28 clon PV-1 (Gross y col., 1990) fueron donados por el Dr. Randolph Noelle (Dartmouth Medical School). El anticuerpo policlonal anti-conexina 43 y el suero preinmune fueron donados por el Dr. Juan Carlos Saez (Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile). El anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo conjugado a FITC se obtuvo de DakoCytomation (Dinamarca).

Péptidos y otros reactivos

El péptido PCC₈₇₋₁₀₄ (KKAERADLIAYLKQATAK) y el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ (ISQAVHAAHAEINEAGR) fueron sintetizados en New England Peptide (USA). El péptido inhibidor de unión en hendiduras 1848 (CNTQQPGCENVCY, P.M. 1458.62) y el péptido control 1849 (SRPTEKTIF, P.M. 1078.23) fueron sintetizados en el Albert Einstein Collage of Medicine.

Otros reactivos utilizados en esta tesis fueron: Proteína OVA (Worthington Biochemical Corporation, NJ, USA) Colagenasa D, DNAsa libre de RNAsa (Roche, Mannheim, Alemania); Acido Retinoico, Citral, DNAsa-I, Oleimida, Amarillo Lucifer, ácido β -glicirretínico (BGA, Sigma-Aldrich, CA, USA); penicilina, estreptomycin, 2-mercaptoetanol (2-ME), tampón de reacción TRIS-HCl, MgCl₂, dNTPs y DNA polimeraza (todos de Invitrogen, Brasil); MACS anti-CD11c (clon N418), MACS anti-CD4 (L3T4), MACS anti-rata IgG y MACS anti-

mouse IgG (todos de Miltenyi Biotec, Alemania); Trizol Reagent (GIBCO BRL, Amenania); cloroformo, isopropanol y etanol 75% (todos de Merck, Darmstadt, Alemania); DMPC (Sigma Chemical, CO, USA); Agarosa 0,8%, Agarosa 2% y bromuro de etidio (todos de W&Z Winkler, Santiago, Chile); tampón de reacción, RNasin®, M-MLV RT (todos de Promega, Madison, WI, USA); Tween 20 (Sigma, St. Louis, USA); TMB Reagent, citoquina recombinante IL-4 (BD PharMingen, USA); Calceina AM, 5-6-succimidil éster-diacetato de carboxifluoreceína (CFSE) y 6-isotiocianato-tetrametilrodamina (TRITC) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

Aislamiento de células dendríticas

Las CDs se aislaron desde linfonodo mesentérico (LNM), linfonodos periféricos (LNP) (ganglios linfáticos axilares, braquiales e inguinales), y bazo de ratones ANDxB10.BR, Balb/c y *Il4ra*^{-/-} inyectados con el melanoma que secreta la citoquina Flt3-L donadas por el Dr. Hide Ploegh, Harvard Medical School, Boston, USA (Shi y col., 1999). Este protocolo permite una expansión homogénea de CDs en todos los OLS (Ruedl y col., 1996, Pulendran y col., 1997). Brevemente, ratones entre 8-16 semanas se inyectaron s.c en el dorso con 1×10^7 células de melanoma murino B16 transfectadas con el gen de la citoquina Flt3-L. Dos semanas después los ratones se sacrificaron y se colectaron los órganos linfoides secundarios, los cuales se disgregaron y se incubaron en 5 ml volumen final de IMDM + 10% FBS (Gibco BRL), suplementado con 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin, 50 µM 2-Me y

1200 UM/ml Colagenasa-D (Boehringer Mannheim) + 400 UK/ml DNAsa-I (Boehringer Mannheim) durante 45 min a 37°C con agitación suave. Posteriormente, los tejidos se pasaron a través de un tamiz metálico (90 µm) (RGM, Santiago, Chile), y se lavaron en un volumen final de 10 ml de IMDM + 10% FBS centrifugando a temperatura ambiente a 500 x g por 5 min. Luego, las células se lavaron con 10 mL de tampón MACS (PBS + 2 mM EDTA + 5% FBS) centrifugando a 500 x g por 5 min a 4°C y el pellet se resuspendió por cada 10⁸ células mononucleares en 500 µL de tampón MACS y se incubaron con 30 µL de microesferas anti-CD11c (clon N418) por 10 minutos a 4°C con agitación rotatoria (Clausen y col., 1998). Posteriormente, las células se lavaron con 12 mL de tampón MACS, se resuspendieron a 1x10⁸ células en 1 mL de tampón MACS y se aislaron usando un magneto (VarioMACS®) y columnas de selección positiva LS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Alemania). Se colectó la fracción positiva, la cual contiene células dendríticas con una pureza de ≥95% medido como el porcentaje de células CD11c⁺ por citometría de flujo.

Aislamiento de linfocitos T

Como fuente de LT CD4⁺ vírgenes se utilizaron timocitos de ratones ANDxB10.BR y DO11.10 depletados de células presentadoras. Para esto, los timos se disecaron, disgregaron y pasaron por una malla metálica de 90 µm. Para eliminar las células presentadoras, las células se resuspendieron a 10⁸ por

mL de DMEM + 2% FBS y se incubaron con un anticuerpo anti-I-E^k o anti-I-A^d (PharMingen, USA) (5 µg/mL) respectivamente, por 30 minutos a 4°C con agitación rotatoria. Posteriormente, se lavaron dos veces con 5 mL de tampón MACS, se incubaron con 20 µL de microesferas anti-IgG de ratón por cada 10⁸ células en 1 mL de tampón MACS por 10 minutos a 4°C con agitación rotatoria. Luego, se lavaron las células con 10 mL de tampón MACS y se resuspendieron en tampón MACS para recolectar la fracción negativa enriquecida en LT CD4⁺ con un magneto (VarioMACS®) y columnas de selección LS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Alemania). Las células así purificadas, corresponden a >75% de LT CD4⁺ maduros, de los cuales más del 90% expresa la cadena transgénica Vα11 para ANDxB10.BR y Vβ13 para DO11.10 (Kaye y col., 1989, Murphy y col., 1990) y un fenotipo de LT vírgenes (L-Selectina^{hi}/CD44^{-low}) (Ortega y col., 1984, Budd y col., 1987).

En algunos experimentos se obtuvieron LT CD4⁺ a partir de bazo de ratones DO11.10. Para esto se disecó el bazo, se perfundió con 10 mL de medio IMDM + 10% FBS (Gibco BRL), suplementado con 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina, y 50 µM 2-ME. Los glóbulos rojos se lisaron utilizando una solución de lisis (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 10mM, Na₂EDTA 0,1 mM, pH 7,2–7,4) e incubación por 5 minutos a temperatura ambiente. Los LT CD4⁺ se aislaron por selección positiva. Para ésto las células del bazo se lavaron con 10 mL de tampón MACS a 4°C y se incubaron por 15 minutos a 4°C con agitación rotatoria con 10 µL de microesferas anti-CD4 (L3T4) por cada

10^7 células mononucleares diluidas en 100 μ L de tampón MACS (Gessner y col., 1993). Posteriormente, las células se lavaron con 10 mL de tampón MACS, se resuspendieron a 1×10^8 células/mL de tampón MACS y se aislaron usando un magneto (VarioMACS®) y columnas de selección positiva LS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Alemania). De este modo, se purificó una fracción de linfocitos T $CD4^+$ con una pureza de $\pm 85\%$ medido por el porcentaje de células $CD4^+/DO11.10^+$ por citometría de flujo.

Co-cultivos de CDs y LT

Para la mayoría de los experimentos, las CDs ($0,2 \times 10^6$ células/mL) y los LT (1×10^6 células/mL) se cultivaron a una razón de 1:5 en IMDM + 10% FBS suplementado con 50 μ M de 2-ME, 50 μ g/mL de gentamicina y 0,5 μ g/mL de anfotericina-B (Fungizona®) a 37°C (5% CO_2). Para la activación de los LT obtenidos de ratones ANDxB10.BR se usó el péptido PCC₈₇₋₁₀₄ y para los LT purificados a partir de ratones DO11.10 se utilizó el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉, en ambos casos a una concentración final de 5 μ M. A partir del tercer día de co-cultivo, se les cambió la mitad del medio por medio completo fresco. Las células se cultivaron por 5 días, luego de los cuales se colectaron para el análisis por citometría de flujo (Picker y col., 1993a, Picker y col., 1993b).

En algunos experimentos los co-cultivos se realizaron en presencia de distintas dosis (0, 50 y 100 U/mL) de IL-4 con o sin 10 μ M de citral según se indica. En otros experimentos, los co-cultivos se realizaron por 16 a 20 hrs en

presencia de los inhibidores de UH Oleimida 100 μM , péptido 1848 200 μM o el péptido control 1849 200 μM luego de lo cual se recolectaron los sobrenadantes para el análisis de IL-2 y se analizó por citometría de flujo la expresión del marcador de activación CD69. Además se realizaron co-cultivos en presencia o ausencia de los inhibidores de las UH por 3 a 5 días, para evaluar la expresión de CD62L y la proliferación de los LT mediante citometría de flujo.

La activación policlonal de los LT purificados a partir de ratones ANDxB10.BR se realizó en pozos cubiertos con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-CD3 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-CD28. Después de 3 días de co-cultivos, las células se transfirieron a nuevos pocillos y se cultivaron por 2 días adicionales.

Ensayos de Acoplamiento Heterocelular

Para éste tipo de ensayo, las CDs ($2,5 \times 10^6$) purificadas de bazo se co-cultivaron con LT (5×10^6) por 2 a 24 hrs. Las comunicaciones por UH entre CDs y LT se evaluó con la microinyección de Amarillo Lucifer (5% de amarillo Lucifer en 150 mM LiCl) con un micropipeta de vidrio en las CDs de bazo hasta que las células se vieron brillantes y luego de 1 min se observó la transferencia de este colorante a los LT (Eugenin y col., 2003). El índice de acoplamiento se calculó como la razón del número de veces en que observamos transferencia de colorante desde la CD microinyectada a lo menos 2 LT, dividido por el total de células inyectadas en cada experimento, multiplicado por 100. En todos los experimentos, el acoplamiento heterocelular se analizó en base a un mínimo de

10 microinyecciones celulares. La transferencia del colorante se observó en un microscopio invertido, el cual está equipado con una lámpara de xenón y un filtro Nikon B (longitud de onda de excitación 450-490 nm, longitud de onda de emisión 520 nm). Para la evaluación de la transferencia del colorante se realizaron experimentos en paralelo en presencia de BGA 100 μ M, el péptido 1848 y el péptido control 1849 (ambos 200 μ M).

Citometría de flujo

CDs recién aisladas, LT vírgenes, y/o LT obtenidos de los co-cultivos se colectaron y se incubaron durante 30 min a 4°C en la oscuridad con las diferentes combinaciones de anticuerpos (conjugados directamente a fluorocromo) diluidos en DMEM + 2% FBS. En los casos en que se usó como primer anticuerpo un mAb purificado, éste se lavó una vez con DMEM + 2% FBS y posteriormente se incubó con un segundo anticuerpo conjugado con un fluorocromo. En los casos en que se utilizó simultáneamente tanto anticuerpos purificados como conjugados directamente a fluorocromo, estos últimos se adicionaron en la etapa final del marcaje. Todos los anticuerpos se usaron en diluciones apropiadas las cuales fueron determinadas previamente por citometría de flujo. Después de incubar con los anticuerpos marcados se hizo un lavado final, las células se resuspendieron en PBS + 2% FBS y se determinó la fluorescencia usando un citómetro de flujo y el programa Cellquest (FACScan Becton & Dickinson, USA). Los análisis se realizaron utilizando una región

FSC/SSC y posteriormente se restringieron específicamente a LT CD4, o CDs usando las regiones CD4/V α 11+, CD4/DO11.10+ o CD11c+ respectivamente. En todos los experimentos de citometría de flujo se utilizaron los respectivos controles de isotipo. Con el fin de bloquear la unión a través de receptores Fc, en la mayoría de los marcajes las células se incubaron previamente con un anticuerpo anti-CD16/CD32 (Fc-Block[®]).

Ensayos de *homing*

Con el fin de comparar *in vivo* las propiedades migratorias de los LT activados con CD-LNM de ratón BALB/c versus LT activados con CD-LNM de ratón *Il4ra*^{-/-}, se realizaron ensayos de *homing* según el protocolo previamente descrito (Mora y col., 2003). Brevemente, 15x10⁶ de LT activados con CD-LNM de ratón *Il4ra*^{-/-} se resuspendieron en 1 mL de DMEM + 2% FBS suplementado con HEPES 20 mM y 1,8 μ g/mL de TRITC (fluorescencia en rojo). Por otro lado, 10x10⁶ LT activados con CD-LNM de ratón BALB/c se resuspendieron en 1 mL de DMEM + 2% FBS suplementado con HEPES 20 mM y 1 μ g/mL de Calceína AM (fluorescencia en verde). En ambos casos las células se incubaron por 20 min a 37°C con agitación rotatoria. Luego del marcaje, el exceso de colorante se eliminó depositando las células marcadas sobre 1 mL de FBS y se centrifugaron por 10 minutos a 400 x g a 4°C (aceleración/desaceleración igual a 1). Posteriormente, se mezclaron 10x10⁶ células marcadas con Calceína con 10x10⁶ marcadas con TRITC, se centrifugaron y se resuspendieron en 200 μ L

de PBS. La suspensión celular fue inyectada por la vena de la cola a ratones receptores *Il4ra-/-* o BALB/c. Una alícuota de la suspensión celular se analizó mediante citometría de flujo con el fin de calcular la razón de células inyectadas (verdes *versus* rojas) para así poder corregir la razón de células marcadas presentes en los tejidos (Índice de *Homing*).

Luego de 48 horas se sacrificaron los ratones y se disecaron los linfonodos periféricos (LNP), bazo, linfonodo mesentérico (LNM), placas de Peyer (PP), lámina propia (LP) y tejido epitelial del intestino delgado. LNP, bazo, LNM y PP se disgregaron mecánicamente y se pasaron a través de una malla metálica de 90 μ m. Para bazo se agregó un paso de lisis de glóbulos rojos. La purificación de los linfocitos de LP y del tejido epitelial del intestino delgado se realizó utilizando un protocolo previamente descrito (Masopust y col., 2001). Brevemente, luego de disecar las PP, el intestino delgado se lavó con HBSS y se cortó longitudinalmente en trozos de aproximadamente 0,5 cm. Para la extracción de los linfocitos intraepiteliales (IEL), los tejidos se resuspendieron en IMDM suplementado con 2% FBS, 20 μ g/mL de gentamicina y 20 mM de HEPES y se agitaron a 120 rpm por 30 min a 37°C. Luego, los trozos de intestino se agitaron vigorosamente en forma manual por tres ciclos de 15 segundos y se recolectó la fase líquida pasada por una malla metálica de 90 μ m, la cual contiene los IEL. Posteriormente, para liberar los linfocitos de la lámina propia del intestino delgado, los trozos de intestino se digirieron por 45 minutos a 37°C con 1 mg/mL de Colagenasa-D y 0,2 mg/mL de DNAsa I

disueltos en RPMI suplementado con 2% FBS, 20 µg/mL de gentamicina y 20 mM de HEPES. Luego de la digestión, los trozos de intestino se pasaron a través de una malla de 90 µm y se recibieron en IMDM suplementado con 2% FBS, 20 µg/mL de gentamicina y 20 mM de HEPES. Tanto linfocitos IEL como de la LP se separaron de las células epiteliales centrifugandolos en una gradiente de densidad de Percoll al 44/67%. Para esto las células se resuspendieron en 4 mL de Percoll al 44% y cuidadosamente se agregaron en la parte inferior 2,3 mL de Percoll 67%. Las gradientes se centrifugaron a 600 x g por 20 minutos a temperatura ambiente (aceleración/desaceleración de 1). Posteriormente, los linfocitos purificados se lavaron con HBSS + 2% FBS.

Se analizó por citometría de flujo la razón de LT calceína⁺ / LT TRITC⁺ en cada tejido. El Índice de *Homing* (IH) se calculó utilizando la siguiente ecuación:
$$IH = \frac{[LT \text{ calceína}^+]_{\text{tejido}}}{[LT \text{ TRITC}^+]_{\text{tejido}}} : \frac{[LT \text{ calceína}^+]_{\text{inyectado}}}{[LT \text{ TRITC}^+]_{\text{inyectado}}}$$
 El cálculo del IH hace los experimentos independientes de: i) el número de células inyectadas en cada ratón, ii) la razón TRITC/ calceína o Calceína/TRITC inyectada, y iii) de cualquier factor de dilución que pueda ser variable entre cada animal (tamaño de órganos linfoides, volumen de sangre, etc). Esto permite hacer comparables los resultados obtenidos entre un animal y otro (Mora y col., 2003).

Ensayo de proliferación *in vitro* e *in vivo*

Para los ensayo de proliferación *in vitro* se utilizaron LT CD4⁺ purificados a partir de timo de ratones ANDxB10.BR marcados con el colorante CFSE. Los LT se lavaron 2 veces con 10 ml de PBS y se marcaron con CFSE 5 μ M por 10 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 2 veces con 10 ml de medio IMDM+ 10% FBS. Estas células ($0,8 \times 10^6$ por pozo) se co-cultivaron con CDs de bazo ($0,2 \times 10^6$ por pozo) en medio IMDM+ 10% FBS + 50 μ g/mL gentamicina + 50 μ M 2-ME + 0,5 μ g de anfotericina-B en presencia de 5 μ M del péptido específico PCC₈₇₋₁₀₄. Los co-cultivos se realizaron en placas de 24-pozos por distintos días. La proliferación de los LT se determinó por citometría de flujo, evaluando la dilución del colorante CFSE a través de los diferentes ciclos de división celular.

Para los ensayos de proliferación *in vivo* se utilizó el protocolo descrito anteriormente (Johansson-Lindbom y col., 2003). Brevemente, para la transferencia adoptiva se utilizaron LT CD4⁺ DO11.10, los cuales se marcaron con 10 μ M de CFSE como se describe anteriormente. Los LT marcados con CFSE se inyectaron i.v en 200 μ L de PBS en ratones BALB/c o *Il4ra*^{-/-}. Al día siguiente, los ratones se inmunizaron i.p con 200 μ L de 1 mg de proteína OVA disuelta en 100 μ L de PBS emulsionada con 100 μ L de CFA. Dos días después de la inmunización, los ratones se sacrificaron y se disecaron bazo, LNM y LP, tal como se describe anteriormente. Se evaluó por citometría de flujo la expresión de los receptores de *homing* durante la proliferación de los LT

marcados con CFSE. En otros experimentos, se realizó transferencia adoptiva de LT CD4⁺ DO11.10⁺ CFSE⁺ en ratones BALB/c. Al día siguiente, 4x10⁶ CD-LNM *Ii4ra*^{-/-} o CD-LNM wt se cargaron con 1 mg de proteína OVA en presencia de 100 ng/mL de LPS por 4 h. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS, para eliminar la proteína remanente y se inmunizaron vía i.p, los ratones BALB/c con 200 µL de la suspensión celular (Dudda y col., 2004). Dos días después de la inmunización, los ratones se sacrificaron y se procedió como se describe anteriormente para la evaluación de la expresión de los receptores de *homing* durante la proliferación de los LT marcados con CFSE.

Preparación de RNA total y RT-PCR

Se extrajo con Trizol RNA total de las células dendríticas purificadas, seguido de una extracción con cloroformo. El RNA se precipitó con isopropanol por 12 horas a -20°C, luego se lavó con 1 mL de etanol 75%, se secó al aire y se resuspendió con H₂O-DMPC. La calidad del RNA se determinó en un gel de agarosa al 0,8% y se cuantificó determinando la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro 6405 UV/Vis (Jenway Limited, Inglaterra). Para evitar posibles interferencias del DNA, se digirieron entre 2 y 3 µg de RNA por 30 minutos a 37°C en un volumen final de 22 µL con 0,5 µL de DNasa-I/RNasa free (1 U/µL), 1 µL de buffer de reacción (200 mM Tris-HCL (pH 8,4), 500 mM KCl) (Invitrogen, Brasil) y 1 µL de MgCl₂ (50 mM). De esta mezcla se utilizaron 11 µL para la transcripción inversa y 11 µL para el control sin transcriptasa inversa.

Para esto, se agregaron 500 pmoles de oligonucleótido poli-dT y se incubó 10 minutos a 70°C. Luego, se agregaron 8 µL de una mezcla de dNTP (1,25 mM), buffer de reacción (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, MgCl 15 mM y 50 mM de DTT), inhibidor de RNasa (RNasin®) y transcriptasa inversa (M-MLV RT). La reacción se realizó en un termociclador (PTC-150 MiniCycler, MJ Research INC, EE.UU.) por 1 hora a 42°C, luego se incubó por 10 minutos a 65°C para inactivar la enzima. La reacción de PCR se realizó con 2 µL de cDNA, y 23 µL de una mezcla de MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 200 µM de cada uno, tampón de reacción (200 mM Tris-HCL (pH 8,4), 500 mM KCl), partidores sentido y antisentido (8 ng/µL de cada uno) y DNA polimerasa (1,25 U). Los partidores usados para la amplificación de RALDH2 (Iwata y col., 2004) y β-actina (Sauma y col., 2004) fueron:

RALDH2 sentido: 5'-GACTTGTAGCAGCTGTCTTCACT-3'

RALDH2 antisentido: 5'-TCACCCATTTCTCTCCCATTTCC-3'

β-actina sentido: 5'-AAATCGTGCGTGACATTAAGG-3'

β-actina antisentido: 5'-CCGATCCACACGGAGTACTT-3'

Las mezclas de reacción se sometieron a diferentes programas de amplificación en un termociclador (PTC-150 MiniCycler, EE.UU.). Para RALDH2 la etapa inicial fue a 94°C por 3 minutos para desnaturar el DNA, luego 29 ciclos con una primera etapa de desnaturación a 94°C por 30 segundos, luego 30

segundos a 60°C para apareamiento y elongación por 60 segundos a 72°C. Finalmente se utilizó una etapa durante 5 minutos a 72°C (Iwata y col., 2004). Para amplificar β -actina se utilizó un programa con una primera etapa de 5 minutos a 94°C, luego 25 ciclos con una primera etapa de desnaturación a 94°C por 30 segundos, luego 45 segundos a 58°C para apareamiento y elongación por 90 segundos a 72°C. Finalmente se utilizó una etapa por 10 minutos a 72°C. Los amplificadores se visualizaron en geles de agarosa al 1,4%, teñidos con bromuro de etidio y las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta. Los geles se fotografiaron utilizando una cámara digital Kodak (DC 120 Digital Camera, GIBCO BRL, USA.).

La cuantificación de las bandas se realizó con el programa Scion Image.

Elisa

La secreción de IL-2 de los linfocitos activados en los co-cultivos se determinó utilizando un kit de ELISA de captura (BD Pharmingen, USA.). Se utilizaron placas de 96 pocillos Immuno-plate Maxisorp (Nunc, USA.) a las que se le agregaron 100 μ L de la dilución sugerida del anticuerpo de captura en NaHCO_3 0,33M, Na_2CO_3 0,66M pH 9,5. Luego de incubar a 4°C toda la noche se lavó la placa 3 veces con PBS + 0,1% Tween 20, y se incubó con PBS + 10% FBS por 1 hora a temperatura ambiente para bloquear la unión inespecífica. Posteriormente, la placa se lavó tres veces con PBS + 0,1% Tween 20, y se agregaron 100 μ L/pozo del estándar de citoquina recombinante

o sobrenadante de activación de los linfocitos T. Las muestras se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad y se lavaron 5 veces con PBS-Tween 20. Luego, las placas se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con 100 μ L de una mezcla de anticuerpo de revelado biotinilado y avidina-peroxidasa disuelto en PBS + 10% FBS. Después de lavar la placa (7 veces con PBS-Tween 20), se agregaron 100 μ L de TMB Substrate Reagent y se incubó por 30 minutos en oscuridad. La reacción se detuvo agregando 50 μ L de H_3PO_4 1 M. La densidad óptica a 450 nm se determinó en un espectrofotómetro Emax Precision Microplate Reader (Molecular Devices, EE.UU.).

Análisis estadístico

A menos que se especifique de otro modo, los datos son presentados como la media \pm SEM. Los porcentajes y la IMF para moléculas de adhesión, marcadores de diferenciación y activación, producción de citoquinas se analizaron usando un test de ANOVA no pareado (análisis de varianza en un sentido con test de comparación múltiple de Bonferroni). Los índices de *homing* se analizaron usando el el 'test de Student de una muestra' versus un índice de *homing* = 1. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si $p < 0,05$. Para los análisis estadísticos y confección de los gráficos se utilizó el software GraphPad PRISM (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

RESULTADOS

OBJETIVO 1

Rol de IL-4 en la inducción de los receptores de *homing* en los LT CD4⁺ *in vitro*.

Recientemente se ha demostrado que en ratones con gastritis inducida mediante la ingesta de alcohol, se encuentran altos niveles de IL-4 en la mucosa intestinal (Andrade y col., 2006). Además se ha determinado que los LT de memoria provenientes de mucosa gástrica educan a las CD4 a través de IL-4 (Alpan y col., 2004) y que IL-4 también puede causar la disminución de los receptores de *homing* a piel en los LT (Seneviratne y col., 2005). Debido a estas evidencias, hipotetizamos que la IL-4 podría estar involucrada en la inducción de la expresión de los receptores *homing* hacia la mucosa intestinal en los LT CD4⁺. Para responder esta pregunta realizamos experimentos de co-cultivos por 5 días en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de IL-4 entre LT CD4⁺ ANDxB10.BR virgen y CD-LNM, con el péptido específico PCC₈₇₋₁₀₃. Luego de este tiempo, analizamos por citometría de flujo los receptores de *homing* hacia la mucosa intestinal y marcadores de activación en los LT. Como muestra la figura 3, la expresión de CCR9 en los LT CD4⁺ activados por CD-LNM aumenta en presencia de IL-4 de manera dosis dependiente. Por otro lado, no observamos un efecto estadísticamente significativo de IL-4 sobre la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ (Fig. 3). Por otra parte, se analizó la expresión de los marcadores de activación CD62L y CD44 en los LT activados,

demostrando que IL-4 disminuye la expresión de CD62L sin afectar mayormente la expresión de CD44 (Fig. 4).

Estos resultados demuestran que IL-4 aumenta la expresión de CCR9 e induce una mayor activación de los LT como lo muestra la pérdida del marcador CD62L comparado al experimento realizado en ausencia de IL-4. Por otra parte este efecto de IL-4 es independiente del origen de las CDs, ya que el co-cultivo de LT CD4+ con CD-LNP produce el mismo efecto (Fig. 5), aunque con menor eficiencia.

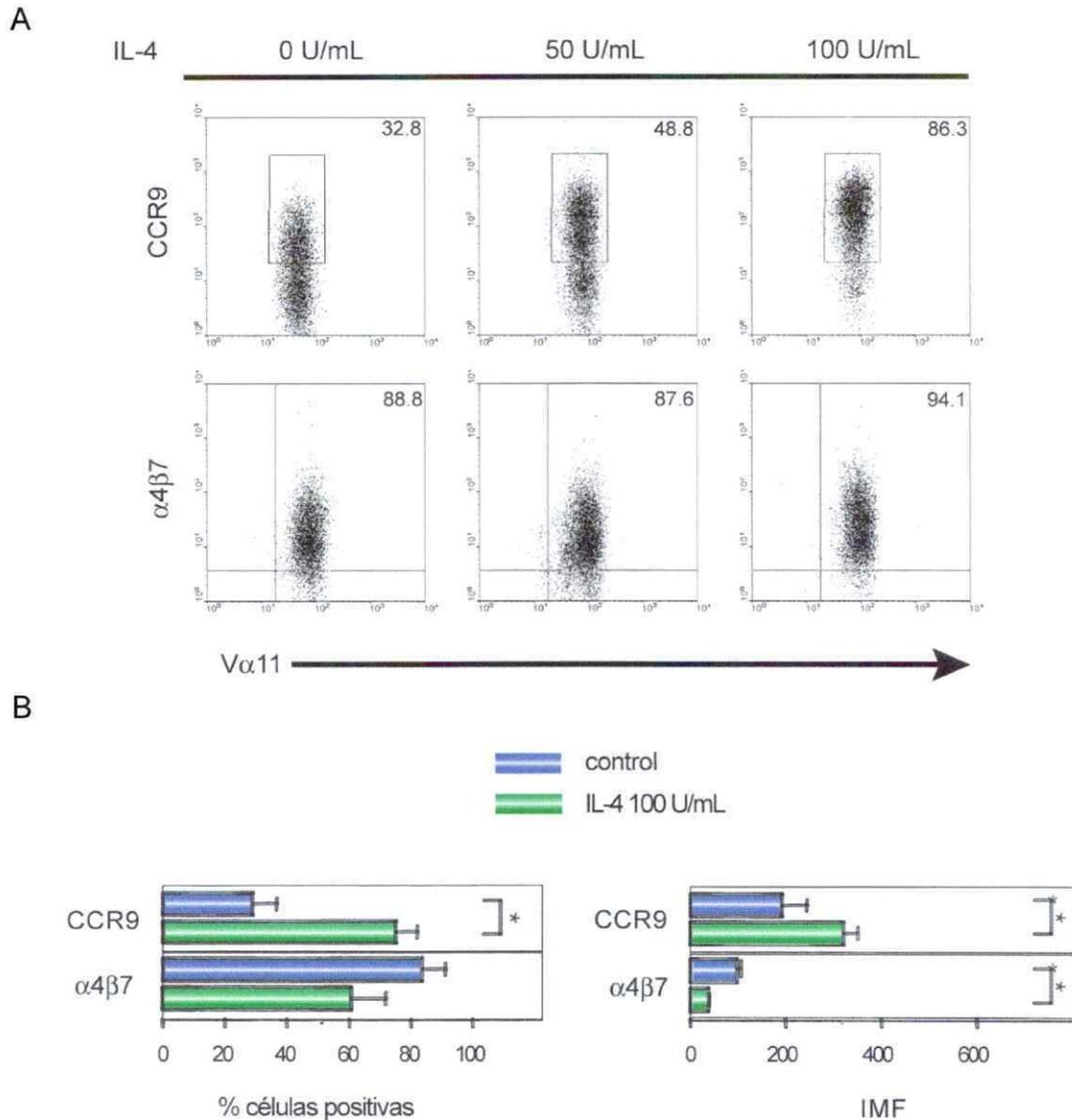
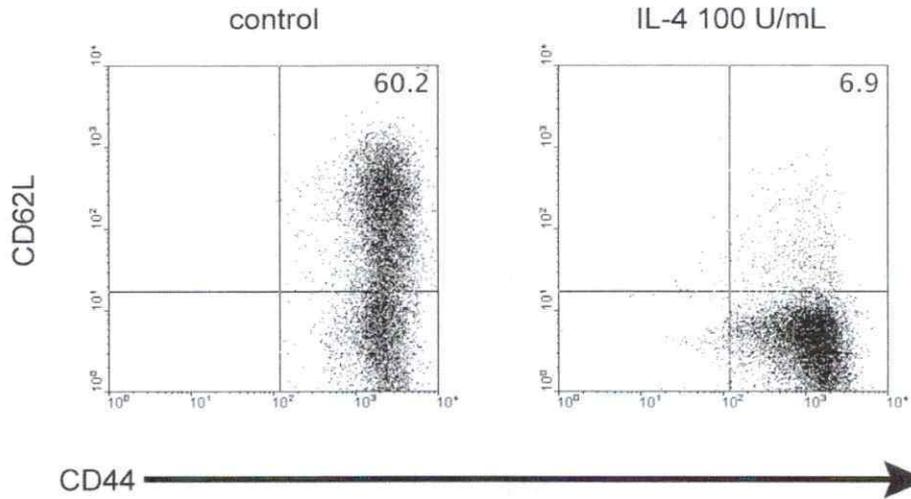


Figura 3. IL-4 aumenta la expresión de CCR9 en los LT CD4⁺ activados con CD-LNM. LT CD4⁺ "ANDxB10.BR" se co-cultivaron con CD-LNM en presencia o ausencia de IL-4. Después de 5 días de co-cultivos la expresión de los receptores de *homing* en los LT fueron analizados por citometría de flujo. **(A)** Gráfico representativo para la expresión de CCR9 (paneles superiores) y $\alpha 4\beta 7$ (paneles inferiores) en LT CD4⁺ activados en presencia de 0, 50 y 100 U/mL de IL-4. **(B)** Cuantificación de los resultados mostrados en A. Promedio \pm d.s. de células doble positivas (panel izquierdo) e intensidad de fluorescencia media (IMF, panel derecho) para CCR9 y $\alpha 4\beta 7$ de los LT activados con CD-LNM (n= 3-4). *p<0.01 entre los LT activados con las CD-LNM en presencia o ausencia de 100 U/mL de IL-4.

A



B

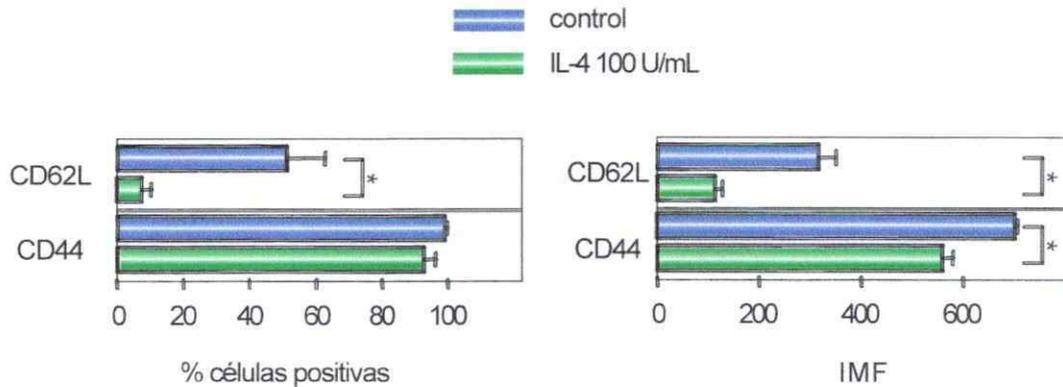


Figura 4. IL-4 reduce la expresión de CD62L en los LT CD4⁺ activados con CD-LNM. LT CD4⁺ "ANDxB10.BR" se co-cultivaron con CD-LNM en presencia o ausencia de IL-4. Después de 5 días de co-cultivos la expresión de los marcadores de activación en los LT fueron analizados por citometría de flujo. (A) Gráfico representativo para la expresión de CD62L y CD44 en los LT CD4⁺ activados en presencia de 0 y 100 U/mL de IL-4. (B) Cuantificación de los resultados mostrados en A. Promedio \pm d.s. de células positivas (panel izquierdo) e intensidad de fluorescencia media (IMF, panel derecho) para CD62L y CD44 de los LT activados con CD-LNM (n= 3-4). *p<0.01 entre los LT activados con las CD-LNM en presencia o ausencia de 100 U/ml de IL-4.

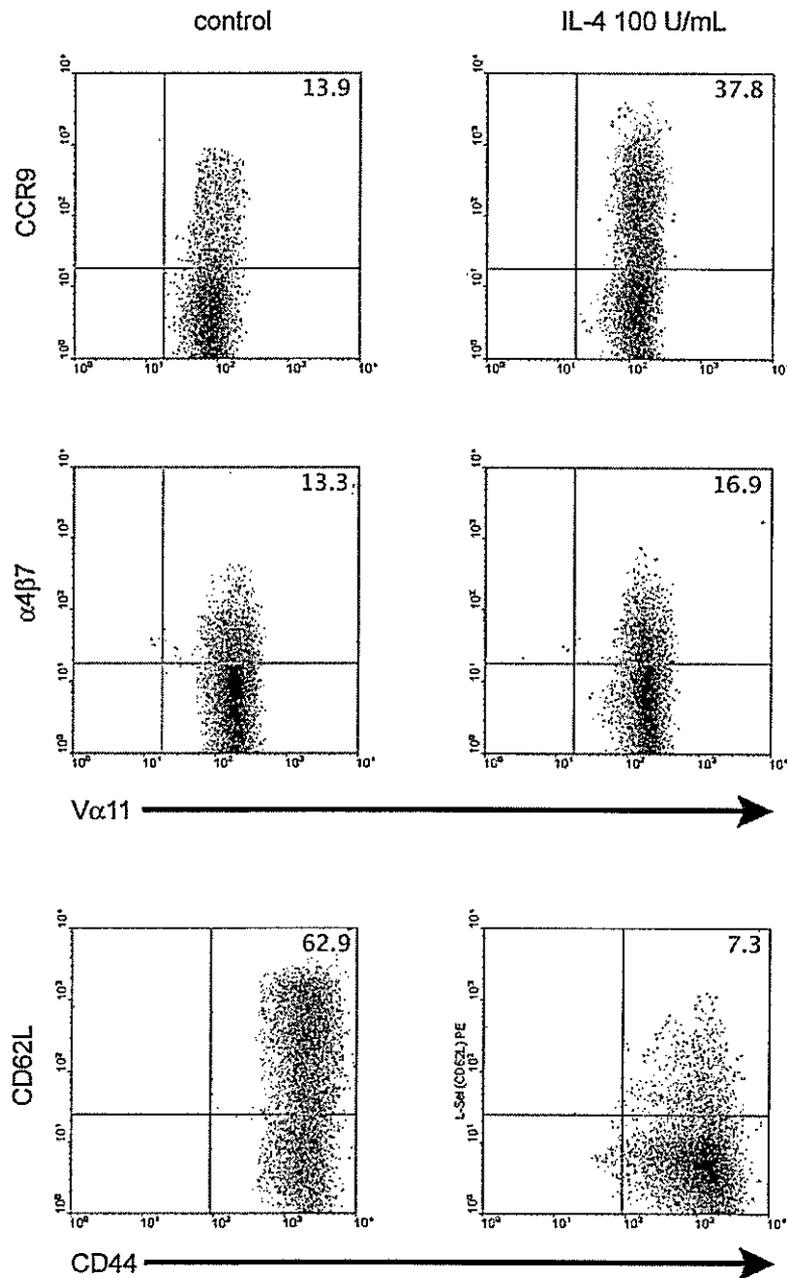


Figura 5. IL-4 aumenta la expresión de CCR9 y reduce la expresión de CD62L en los LT CD4⁺ activados con CD-LNP. LT CD4⁺ "ANDxB10.BR" se co-cultivaron con CD-LNP en presencia o ausencia de IL-4. Después de 5 días de co-cultivos la expresión de los marcadores de activación en los LT fueron analizados por citometría de flujo. Resultado representativo (n= 3-4) para la expresión de CCR9, $\alpha 4\beta 7$, CD62L y CD44 en LT CD4⁺ activados en presencia de 0 y 100 U/mL de IL-4.

OBJETIVO 2

Identificación del tipo celular sobre el cual IL-4 está actuando para modular la expresión de los receptores de *homing* a mucosa intestinal en los LT CD4⁺.

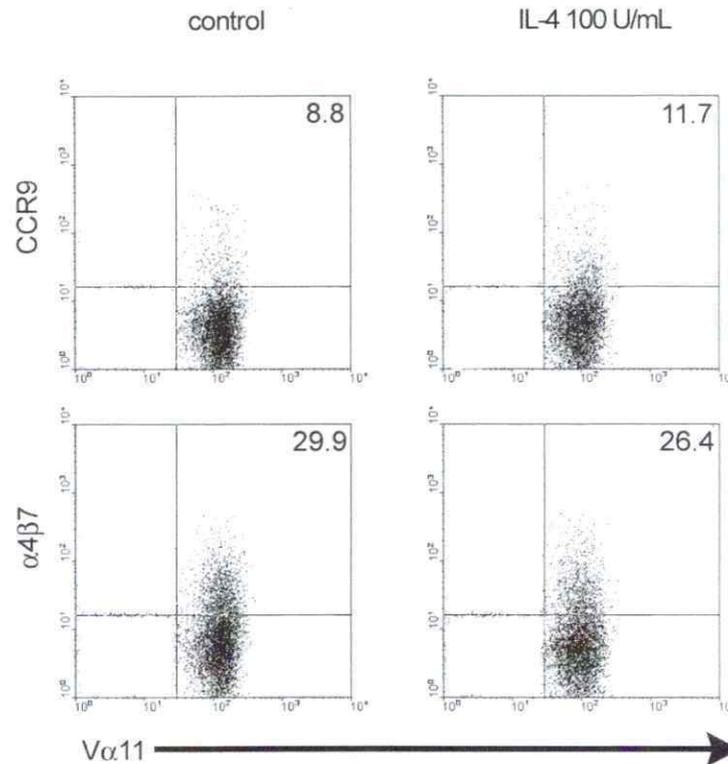
Con el fin de determinar si el incremento de CCR9 en los LT causado por IL-4 es directo sobre los LT, activamos LT CD4⁺ policlonalmente con anticuerpos anti-CD3 más anti-CD28 en presencia o ausencia de IL-4. Observamos que, similar a lo que ha sido reportado para LT CD8⁺ (Mora y col., 2005), IL-4 no aumenta la expresión de CCR9 en LT CD4⁺ en ausencia de CDs, así mismo no se observa un efecto de IL-4 en la expresión de $\alpha 4\beta 7$ (Fig. 6).

Estos resultados sugieren que esta citoquina estaría actuando a través de las CDs para inducir la expresión de CCR9 en los LT. Con el fin de dilucidar este punto, utilizamos CD-LNM de ratones *Il4ra*^{-/-} (deficiente en la expresión de la cadena alfa del receptor de IL-4, CD-LNM *Il4ra*^{-/-}) o de ratones BALB/c (CD-LNM wt) las cuales se co-cultivaron con LT CD4⁺ DO11.10 y del péptido específico OVA₃₂₃₋₃₃₉ en presencia o ausencia de IL-4. Observamos que IL-4 no aumenta la expresión de CCR9 en los LT activados con CD-LNM *Il4ra*^{-/-} comparado con CD-LNM wt (Fig. 7 panel inferior derecho y gráfico). Además, como muestra la figura 7, las CD-LNM *Il4ra*^{-/-} en ausencia de IL-4 inducen CCR9 en una menor proporción en los LT comparado con las CD-LNM wt (10,1% comparado con 41,8% respectivamente).

En relación a la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ y a la activación de los linfocitos, ya sea en los ratones BALB/c o *Il4ra*^{-/-}, la IL-4 no tiene efecto en la

expresión de este receptor (Fig. 8), ni tampoco afecta los niveles de expresión de CD44 y CD62L (Fig. 9). Cabe hacer notar que en el caso de los ratones DO11.10 de origen BALB/c, el 100% de los LT se activan, medido por la pérdida del marcador CD62L, comparado a lo que ocurre en los ratones transgénicos ANDxB10.BR que tienen otro fondo genético. El conjunto de estos resultados indica que la inducción por IL-4 de la expresión de CCR9 en los LT CD4⁺ es mediada por las CDs, además estos resultados demuestran que IL-4 afecta la expresión de CCR9 sin afectar la expresión de $\alpha 4\beta 7$ ni la activación de los LT CD4⁺.

A



B

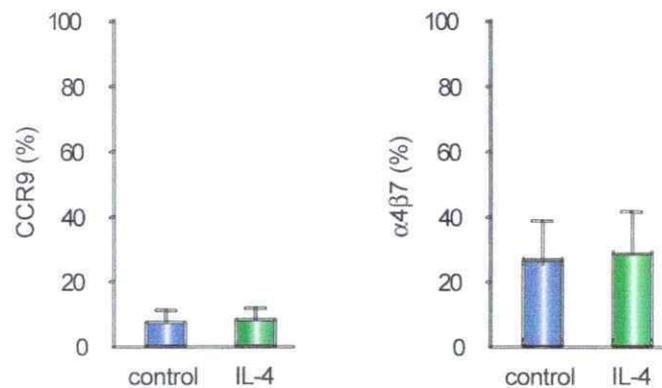
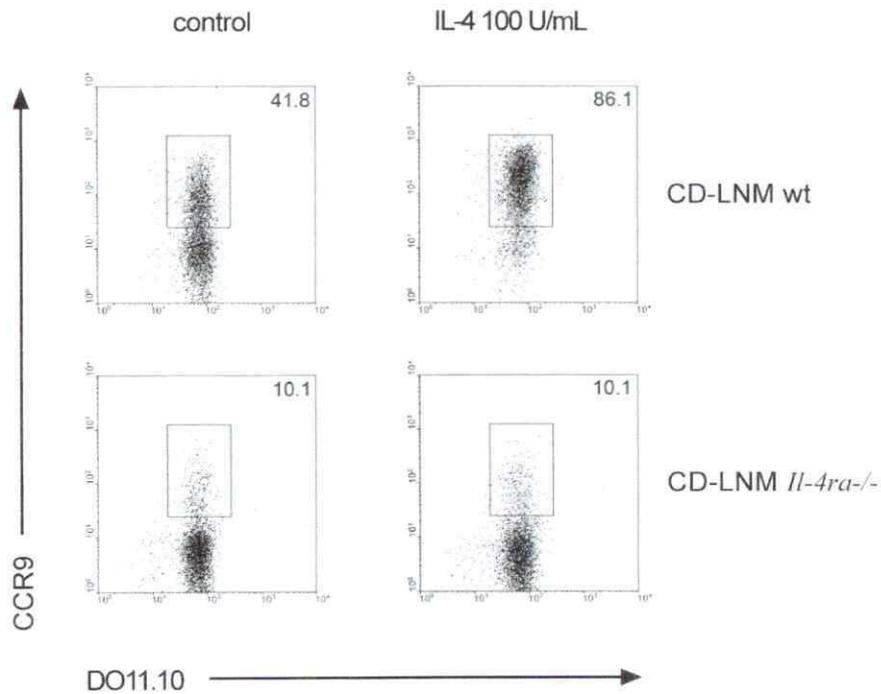


Figura 6. IL-4 no actúa directamente sobre los LT CD4⁺ para inducir el aumento en la expresión de CCR9. (A) LT fueron activados con anticuerpos anti-CD3 más anti-CD28 en ausencia de CDs con 100 U/ml de IL-4 (panel derecho) o sin IL-4 (panel izquierdo). Al cabo de 5 días de cultivo, los LT resultantes fueron analizados para la expresión de CCR9 (paneles superiores) y $\alpha 4\beta 7$ (paneles inferiores) por citometría de flujo. (B) Cuantificación de células positivas (n=3) para CCR9 (gráfico izquierdo) y $\alpha 4\beta 7$ (gráfico derecho).

A



B

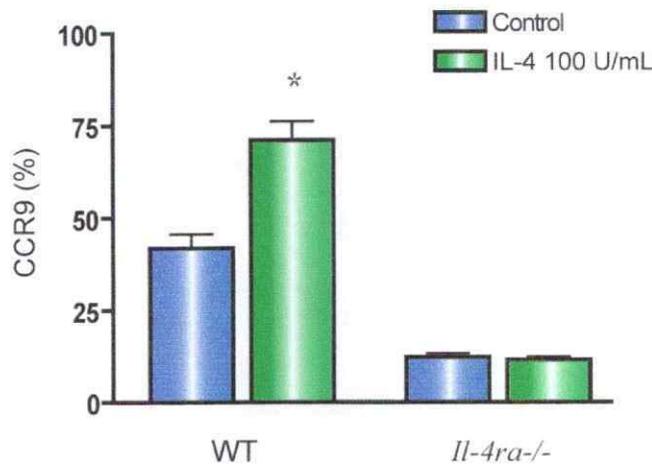


Figura 7. La contribución de IL-4 al aumento de CCR9 en LT CD4⁺ es mediada por las CD-LNM. LT CD4⁺ DO11.10 se co-cultivaron con CD-LNM purificadas de un ratón *Il4ra*^{-/-} o wt en presencia o ausencia de IL-4. Después de 5 días de co-cultivos la expresión de los receptores de *homing* en los LT fueron analizados por citometría de flujo. (A) Gráfico representativo para la expresión de CCR9 en LT activados por CD-LNM de ratón wt (paneles superiores) e *Il4ra*^{-/-} (paneles inferiores) en presencia (paneles derechos) o ausencia (paneles izquierdos) de IL-4. (B) El gráfico de barras muestra el análisis estadístico de 3-4 experimentos independientes. *p<0.01.

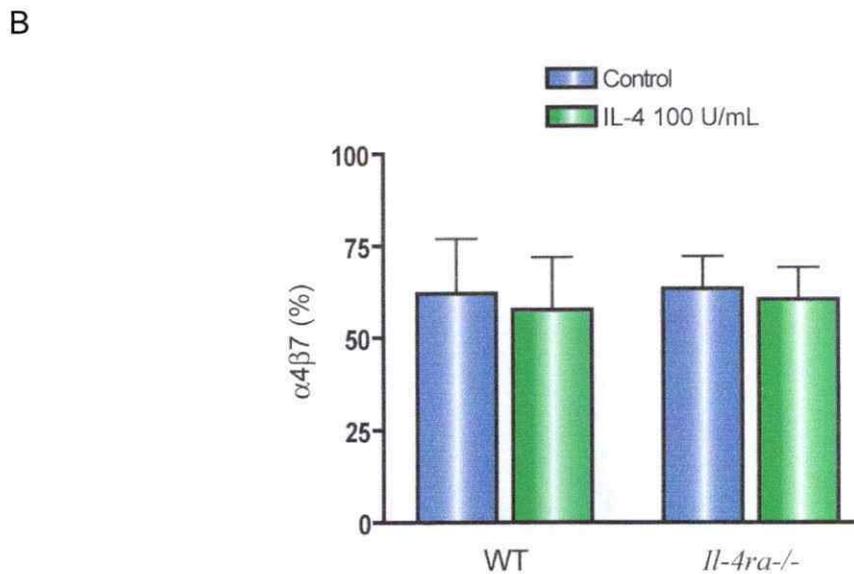
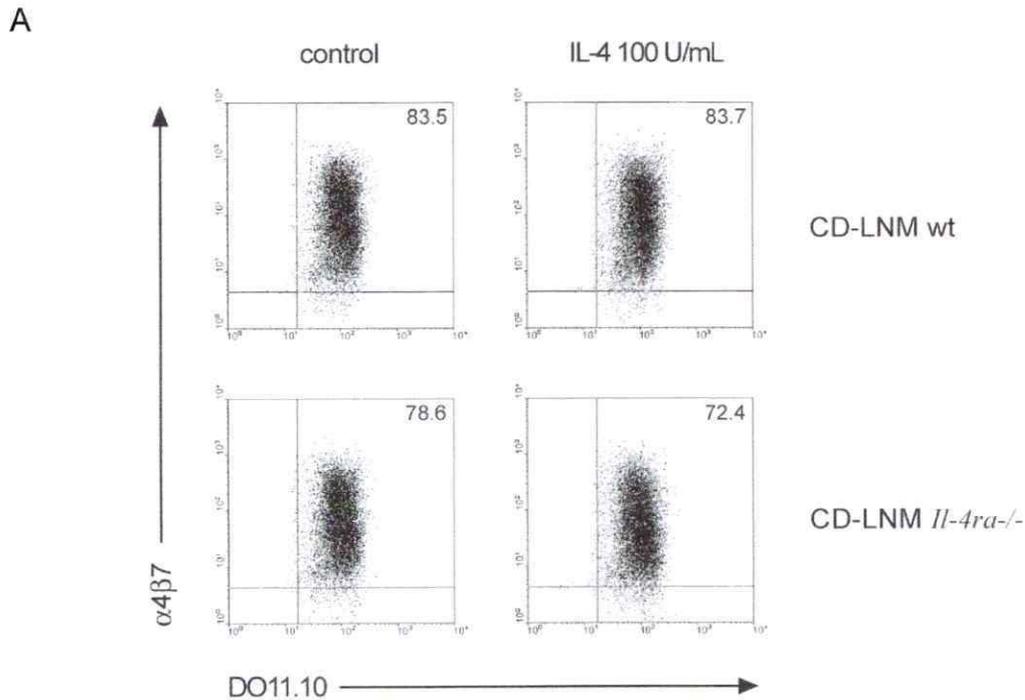


Figura 8. IL-4 no afecta la expresión de $\alpha 4\beta 7$ en LT $CD4^+$ activados por las CD-LNM *Il4ra*^{-/-}. LT $CD4^+$ DO11.10 se co-cultivaron con CD-LNM purificadas de un ratón *Il4ra*^{-/-} o wt en presencia o ausencia de IL-4. Después de 5 días de co-cultivos la expresión de los receptores de *homing* en los LT fueron analizados por citometría de flujo. **(A)** Gráfico que muestra la expresión de $\alpha 4\beta 7$ en LT activados por CD-LNM de ratón wt (paneles superiores) e *Il4ra*^{-/-} (paneles inferiores) en presencia (paneles derechos) o ausencia (paneles izquierdos) de IL-4. **(B)** El gráfico de barras muestra el análisis estadístico de 3-4 experimentos independientes.

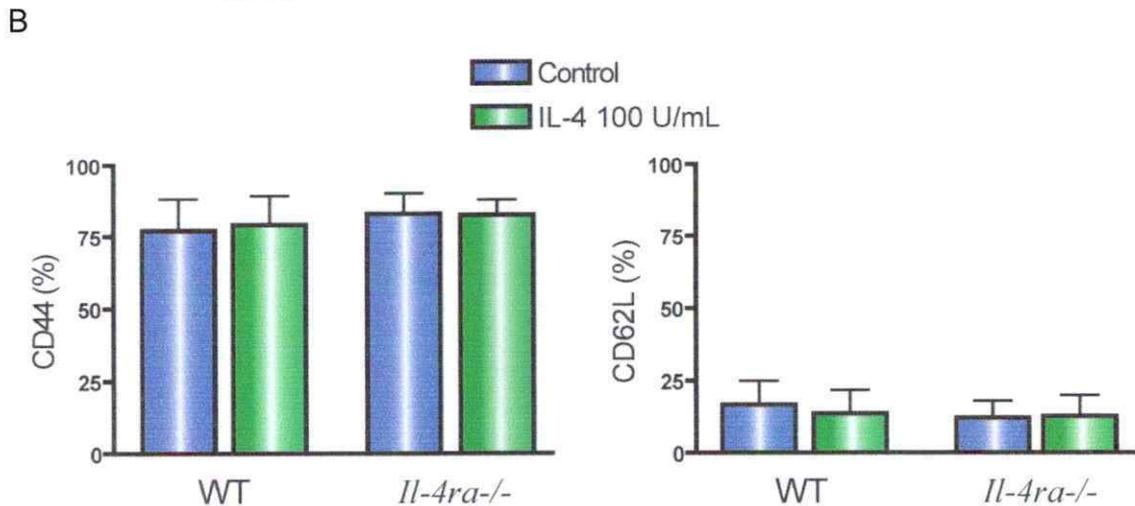
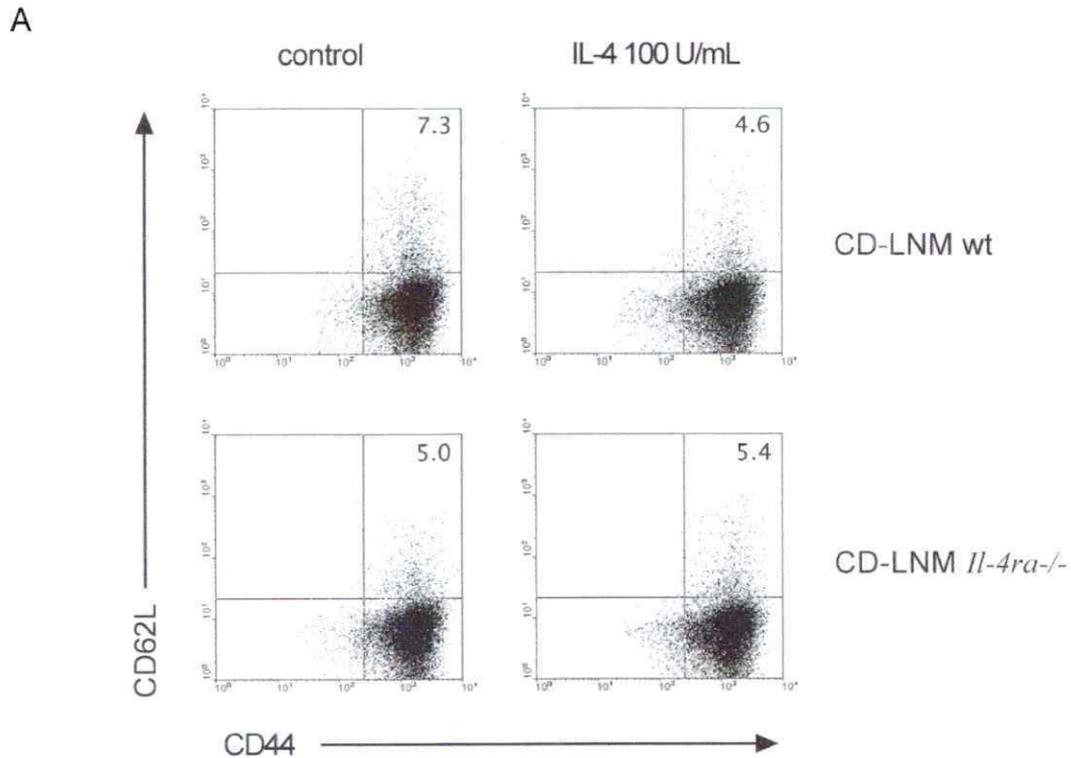


Figura 9. IL-4 no afecta el grado de activación en LT CD4⁺ activados por las CD-LNM *Il4ra*^{-/-}. LT CD4⁺ DO11.10 se co-cultivaron con CD-LNM purificadas de un ratón *Il4ra*^{-/-} o wt en presencia o ausencia de IL-4. Después de 5 días de co-cultivos la expresión de los marcadores de activación en los LT fueron analizados por citometría de flujo. **(A)** Resultado representativo para la expresión de CD62L y CD44 en LT activados por CD-LNM de ratón wt (paneles superiores) e *Il4ra*^{-/-} (paneles inferiores) en presencia (paneles derechos) o ausencia (paneles izquierdos) de IL-4. **(B)** El gráfico de barras muestra el análisis estadístico de 3-4 experimentos independientes.

OBJETIVO 3

Rol de IL-4 en la inducción de los receptores de *homing* en los LT CD4⁺ *in vivo*.

Datos recientes de la literatura indican la existencia de mecanismos de entrada para los LT CD4⁺ a mucosa intestinal dependientes e independientes de CCR9 (Stenstad y col., 2006). Por lo tanto, decidimos utilizar LT CD4⁺ activados con CD-LNM *Il4ra*^{-/-} que presentan una baja expresión de CCR9 en experimentos de migración competitiva con LT CD4⁺ activados CD-LNM wt en presencia de IL-4 para evaluar su capacidad de migración a mucosa intestinal *in vivo*. Los resultados muestran que los LT CD4⁺ activados con las CD-LNM wt migran a LP intestinal 4.8 ± 1.8 veces más que los LT CD4⁺ activados con las CD-LNM *Il4ra*^{-/-} (Fig. 10). Por otro lado, no observamos una migración preferencial hacia LNM o a PP (Fig. 10).

Estos resultados demuestran que la inducción de CCR9 por IL-4 en LT activados con CD-LNM wt es necesaria para una eficaz migración hacia la mucosa intestinal.

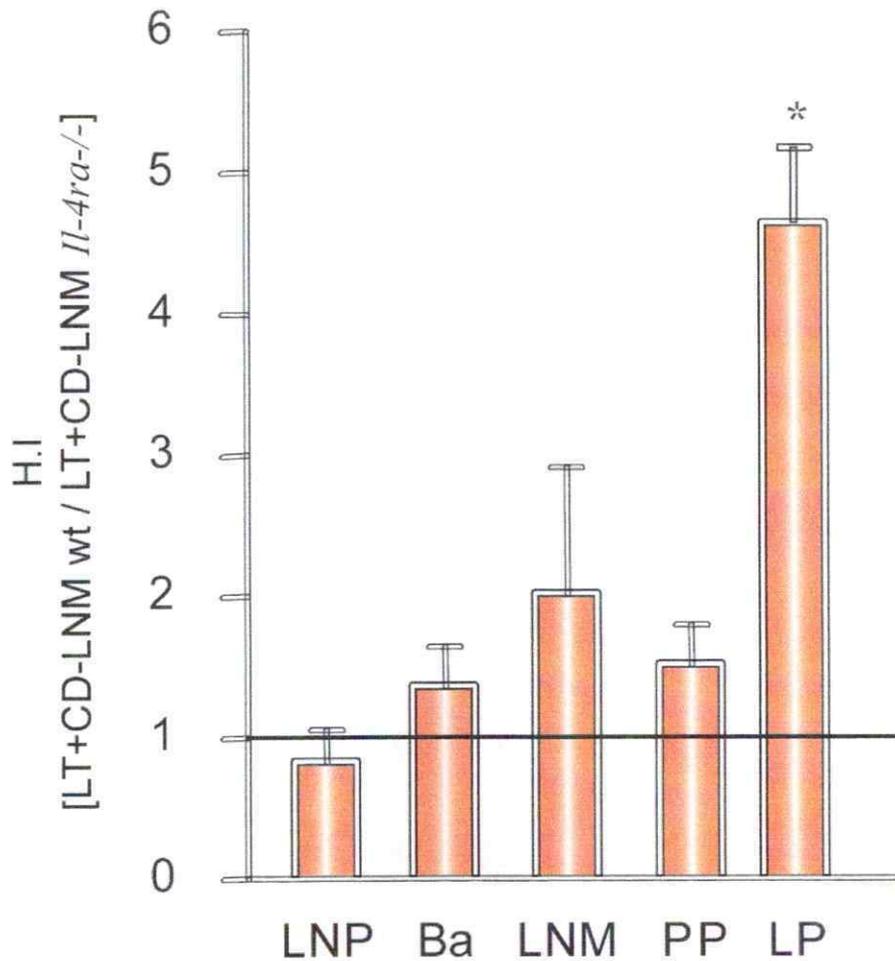


Figura 10. Los LT CD4⁺ activados con CD-LNM de ratones *Il4ra*^{-/-} migran escasamente a la mucosa intestinal. Los LT CD4⁺ DO11.10 fueron activados en presencia del péptido específico OVA₃₂₃₋₃₃₉ y 100 U/mL de IL-4 con CD-LNM de ratones BALB/c o *Il4ra*^{-/-}. Después de 5 días de co-cultivo, las células fueron marcadas con calceína o TRITC e inyectadas i.v en un ratón BALB/c. Después de 48 hrs, se determinó el índice de *homing* en diferentes tejidos del ratón receptor (n= 3-4). El índice de *homing* fue calculado como se describió anteriormente (Mora y col., 2003). LNP, linfonodos periféricos; Ba, bazo; LNM, linfonodo mesentérico; PP, placas de Peyer; LP, lámina propia. *p<0.01.

Expresión de CCR9 en LT CD4⁺ de ratones *Il4ra*^{-/-}.

Con el fin de determinar si IL-4 tiene un papel en la expresión de CCR9 en los LT CD4⁺ *in vivo*, analizamos la expresión de CCR9 en los LT CD4⁺ de timo, LNM, PP y de lámina propia de ratones controles y *Il4ra*^{-/-}. Los resultados muestran que los LT CD4⁺ de timo, LNM y PP presentan niveles similares de CCR9, sin embargo en ratones BALB/c, los LT CD4⁺ aislados de lámina propia muestran alrededor de un 30% de células CCR9⁺ a diferencias de lo que ocurre en el ratón *Il4ra*^{-/-} donde no se observan LT CD4⁺ con este marcador (Fig. 11). Con respecto a la expresión de $\alpha 4\beta 7$, no observamos diferencias entre LT CD4⁺ de los diferentes órganos de ratones controles y ratones *Il4ra*^{-/-} (Fig. 11). Estos resultados sugieren que IL-4 tendría un papel en la regulación *in vivo* de la expresión de CCR9 en LT CD4⁺.

Para descartar si el bajo porcentaje de LT CD4⁺ CCR9⁺ presentes en la mucosa intestinal de los ratones *Il4ra*^{-/-} se debe a una deficiencia en el ingreso de los LT a este tejido, realizamos ensayos de migración competitiva en ratones *Il4ra*^{-/-} entre LT CD4⁺ activados con CD-LNM *Il4ra*^{-/-} y CD-LNM wt en presencia de 100 U/mL IL-4. Como se observa en la figura 12, los LT CD4⁺ activados con CD-LNM wt migran normalmente a la LP de los ratones *Il4ra*^{-/-}, en forma similar a lo que ocurre en los ratones BALB/c (Fig. 10), descartando un defecto en la entrada de los LT hacia la mucosa intestinal en los ratones *Il4ra*^{-/-}.

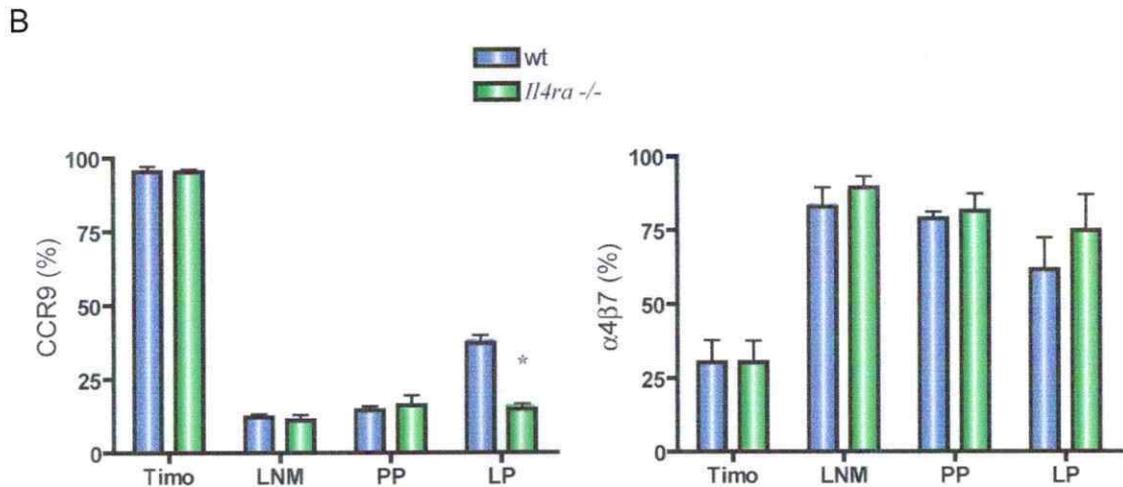
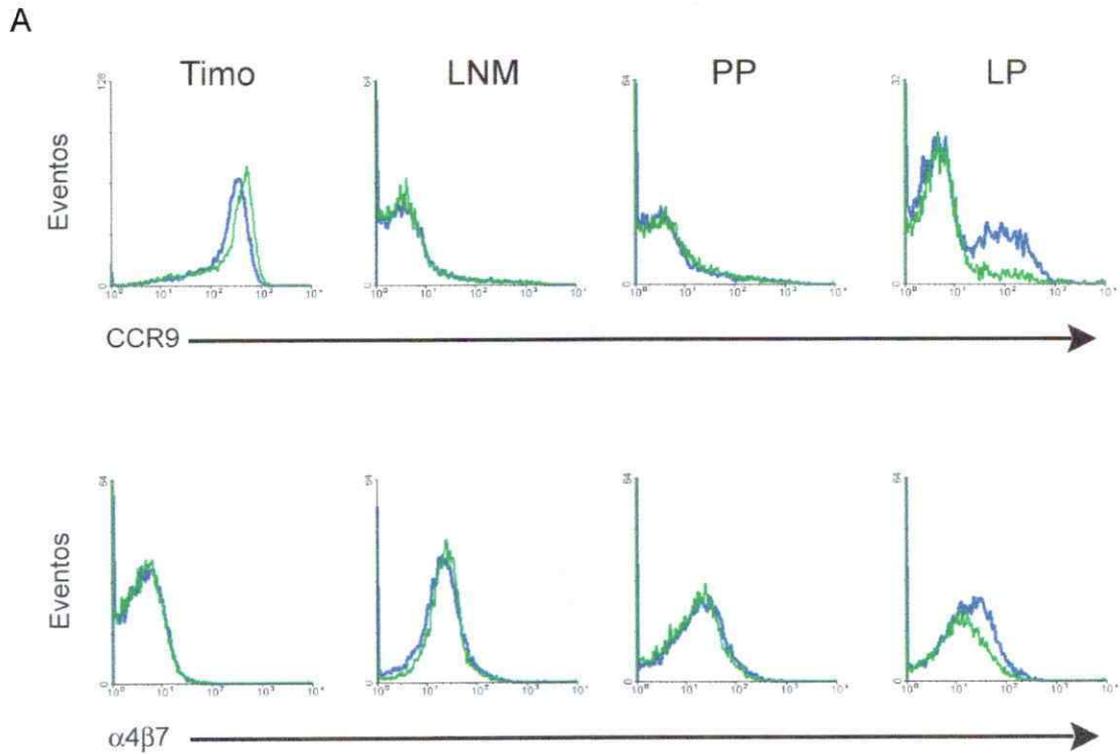


Figura 11. IL-4 regula la expresión de CCR9 en los LT CD4⁺ *in vivo*. (A) Expresión de CCR9 (paneles superiores) y $\alpha 4\beta 7$ (paneles inferiores) en los LT CD4⁺ obtenidos de timo, LNM, PP y de LP de ratones BALB/c (azul) o ratones *Il4ra*^{-/-} (verde). (B) El gráfico de barras muestra el análisis estadístico de 3 experimentos independientes del porcentaje de LT CD4⁺ que expresan CCR9 (gráfico izquierdo) y $\alpha 4\beta 7$ (gráfico derecho). * $p < 0.05$.

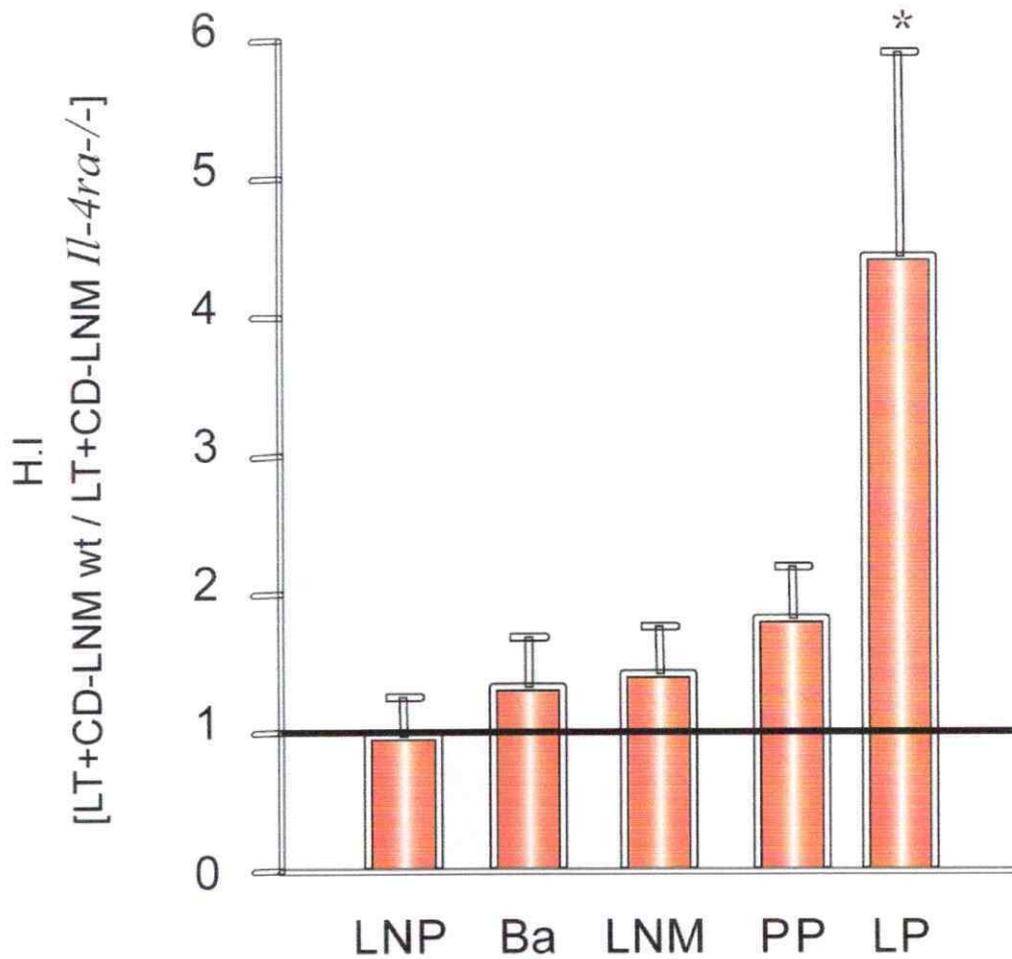


Figura 12. LT CD4⁺ activados con CD-LNM wt migran eficazmente hacia la mucosa intestinal de ratones *Il4ra*^{-/-}. Experimento de migración competitiva de LT CD4⁺ activados en presencia de IL-4 con CD-LNM de ratones BALB/c e *Il4ra*^{-/-}. Después de 5 días de co-cultivo las células se marcaron con calceína o TRITC y se inyectaron i.v en un ratón *Il4ra*^{-/-}. Después de 48 hrs, se determinó el índice de *homing* en diferentes tejidos del ratón receptor (n= 3-4). El índice de *homing* fue calculado como se describe arriba. *p<0.01.

Por otra parte, evaluamos la capacidad de las CD-LNM *Il4ra*^{-/-} de inducir la expresión de CCR9 en LT CD4⁺ *in vivo*, para esto transferimos LT CD4⁺ DO11.10 marcados con CFSE a ratones BALB/c 24 hrs después los ratones fueron inmunizados i.p. con CD-LNM *Il4ra*^{-/-} o CD-LNM wt cargadas con 1 mg de proteína OVA. Dos días después de la inmunización, analizamos la expresión de CCR9 y $\alpha 4\beta 7$ en los LT CD4⁺ DO11.10⁺ CFSE⁺ en LNM. Observamos que las CD-LNM *Il4ra*^{-/-} inducen escasamente la expresión de CCR9 en LT CD4⁺ DO11.10⁺ obtenidos de LNM en comparación a CD-LNM wt (Fig. 13). Además, en estos experimentos no observamos diferencia en la expresión de $\alpha 4\beta 7$, ni en el número de divisiones celulares en LT CD4⁺ DO11.10⁺ en LNM de ratones inmunizados CD-LNM *Il4ra*^{-/-} o CD-LNM wt (Fig. 13). Estos resultados sugieren que IL-4 es importante en la inducción de CCR9 en los LT *in vivo*.

Adicionalmente para confirmar el efecto de IL-4 en la expresión de CCR9 en los LT CD4⁺ *in vivo*, transferimos LT CD4⁺ DO11.10 marcados con CFSE a ratones BALB/c o *Il4ra*^{-/-}, 24 hrs después los ratones fueron inmunizados i.p. con 1 mg de proteína OVA más CFA. Dos días después de la inmunización, analizamos la expresión de CCR9 en los LT CD4⁺ DO11.10⁺ CFSE⁺ en LNM. Sorprendentemente observamos que la expresión de CCR9 fue inducida en los LT CD4⁺ DO11.10⁺ aislados de LNM de ratones *Il4ra*^{-/-} comparados con los ratones controles (Fig. 14). En estos mismos experimentos, el nivel de expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ no fue afectado (Fig.14). Estos resultados

sugieren que bajo la generación de una respuesta inflamatoria la inducción de CCR9 en el LNM de ratones *Il4ra*^{-/-} es independiente de IL-4.

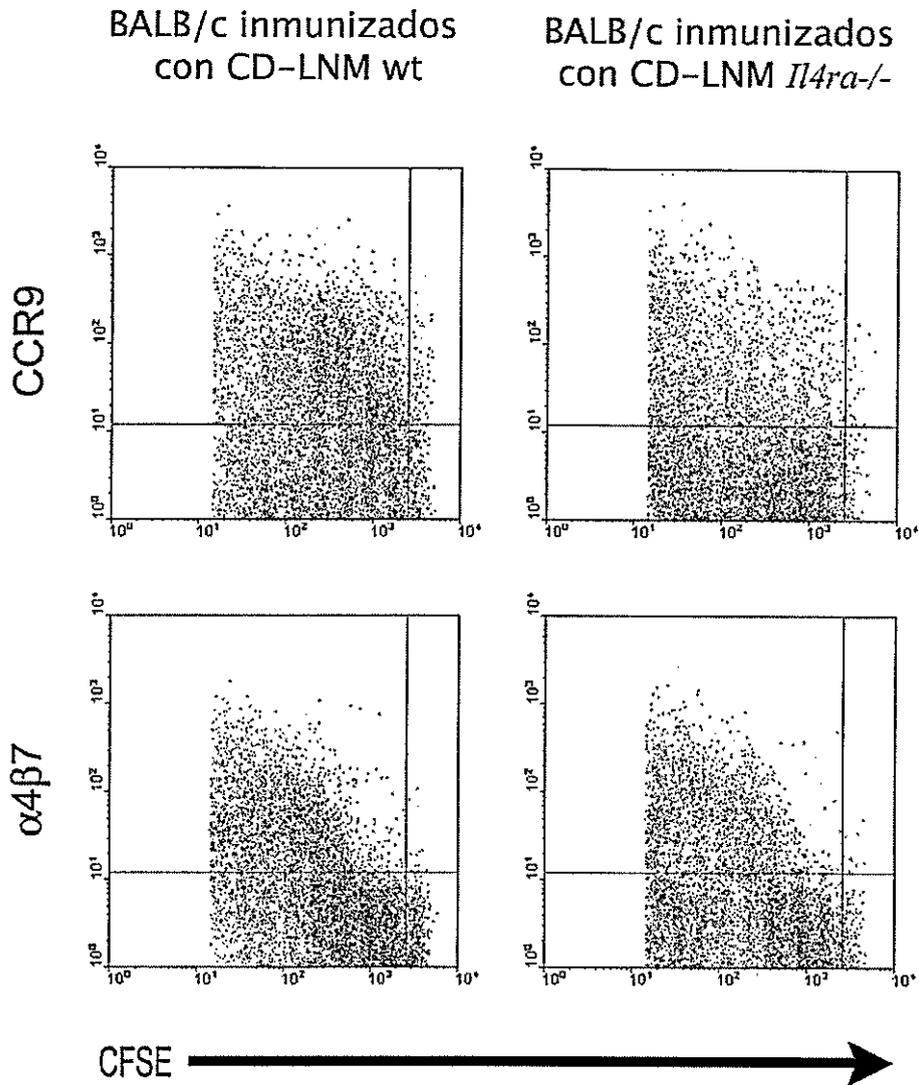


Figura 13. CD-LNM *Il4ra*^{-/-} inducen pobremente CCR9 en LT CD4⁺ DO11.10⁺ en LNM de ratones BALB/c. LT CD4⁺ DO11.10⁺ CFSE⁺ fueron transferidos i.v a ratones BALB/c. Después de 24 hrs. Los ratones fueron inmunizados con CD-LNM wt o CD-LNM *Il4ra*^{-/-} cargadas con proteína OVA. Luego de 2 días después de la inmunización se analizó la expresión de CCR9 y $\alpha 4\beta 7$ de LT CD4⁺ DO11.10⁺ CFSE⁺ en LNM por citometría de flujo (n=2).

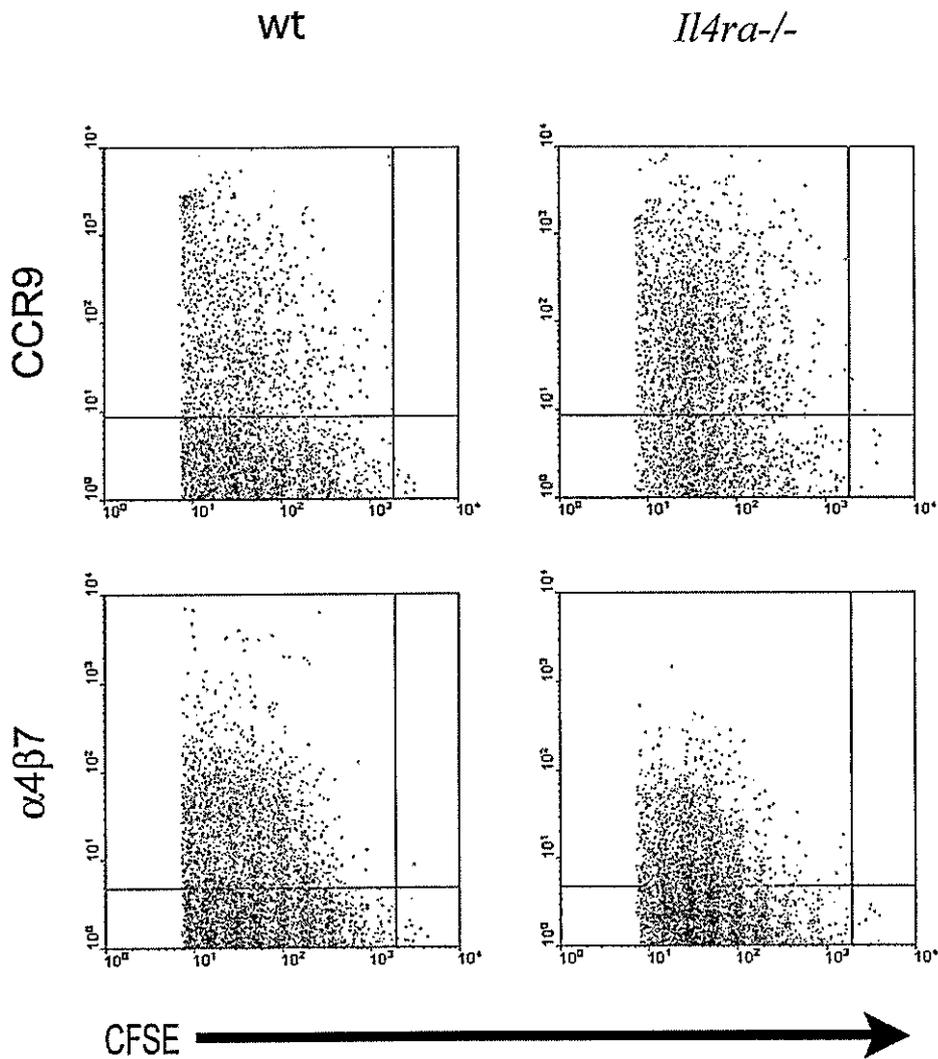


Figura 14. Expresión de CCR9 en LT CD4⁺ DO11.10⁺ en LNM de ratones *Il4ra*^{-/-} inmunizados con la proteína OVA más CFA. LT CD4⁺ DO11.10⁺ CFSE⁺ fueron transferidos i.v a ratones BALB/c (wt) o *Il4ra*^{-/-}. Después de 24 h. Los ratones fueron inmunizados con 1 mg de proteína OVA más CFA y luego de 2 días se analizó la expresión de CCR9 y α4β7 de LT CD4⁺ DO11.10⁺ CFSE⁺ en LNM por citometría de flujo (n=3).

OBJETIVO 4

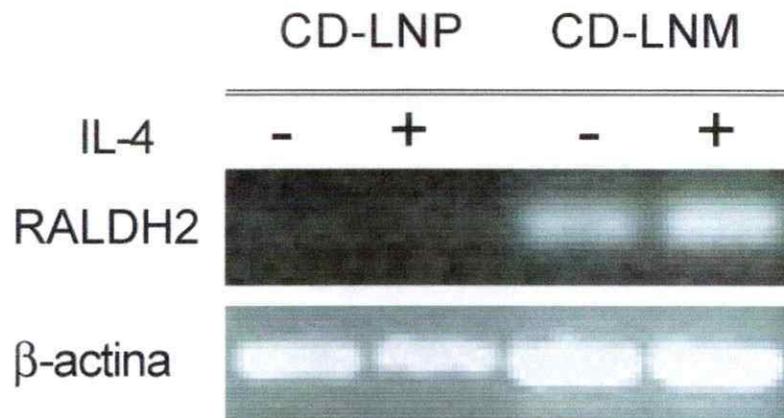
Mecanismo molecular por el cual IL-4 regula la expresión de los receptores de homing a mucosa intestinal en los LT CD4⁺.

Se ha demostrado que el AR induce la migración de LT hacia la mucosa intestinal (Iwata y col., 2004). Puesto que IL-4 induce la expresión de CCR9 en los LT a través de la activación por las CDs, nos preguntamos si el efecto de IL-4 sobre las CD-LNM se ejerce a través de la producción de AR. Analizamos entonces el efecto de IL-4 en la expresión del mRNA de RALDH2 en CD-LNM, enzima esencial en la síntesis de AR (Fig. 2). Para esto, CD-LNM o CD-LNP purificadas a partir de ratones ANDxB10.BR fueron cultivadas por 4 hrs. con 100 U/mL de IL-4, luego se extrajo RNA total y se analizaron mediante RT-PCR los niveles de expresión de RALDH2. Como se observa en la figura 15, la cuantificación de los niveles del mRNA de RALDH2 muestran un aumento significativo de este mensajero en CD-LNM tratadas con IL-4, en comparación con células no tratadas. Cabe destacar que CD-LNM expresan constitutivamente el mRNA de RALDH2, además IL-4 no tiene efecto en la expresión de RALDH2 en CD-LNP (Fig. 15). Estos resultados demuestran que IL-4 induce la expresión del mRNA de RALDH2 en CD-LNM.

Por otro lado, evaluamos el efecto de IL-4 en la expresión del mRNA de RALDH2 en CD-LNM de ratones *Il4ra*^{-/-}. Para esto, CD-LNP o CD-LNM de ratones controles BALB/c o de ratones *Il4ra*^{-/-} se trataron por 4 hrs. con 100 U/mL de IL-4, luego de lo cual se extrajo RNA total para evaluar la expresión de

RALDH2. Como se aprecia en la figura 16, CD-LNM de ratones *Il4ra*^{-/-} expresan niveles similares del mRNA de RALDH2 que CD-LNM de ratones controles. Además, IL-4 no incrementa la expresión del mRNA de RALDH2 en CD-LNM de ambos ratones (Fig. 16). Interesantemente, CD-LNP de ratones controles también expresan el mRNA de RALDH2, el cual no aumenta cuando estas células son tratadas con IL-4 (Fig. 16). Estos resultados demuestran que la expresión del mRNA de RALDH2 depende del fondo genético de la cepa del ratón analizado. En el caso de los ratones BALB/c, IL-4 pareciera no afectar los niveles del mRNA de RALDH2, el cual se expresa en forma constitutiva en los tejidos estudiados, a diferencia de lo que ocurre con los ratones ANDxB10.BR.

A



B

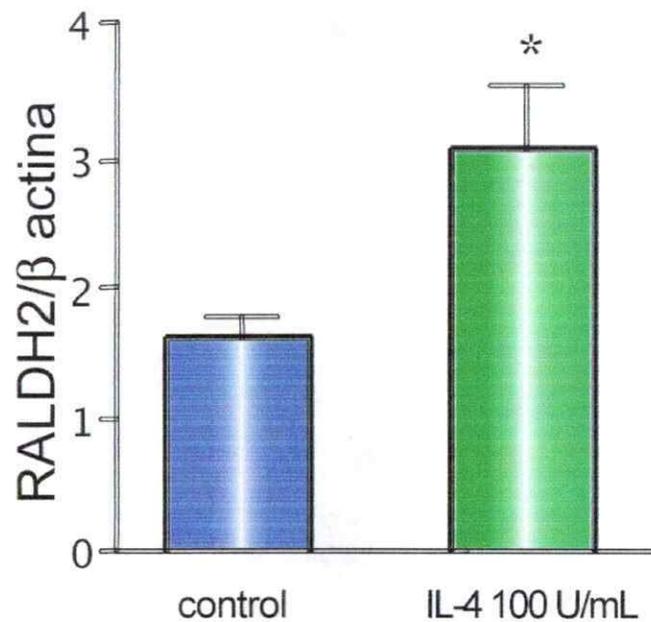
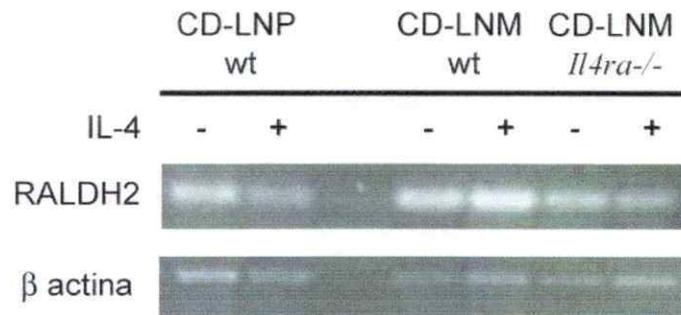


Figura 15. IL-4 aumenta la expresión del mRNA de RALDH2 en CD-LNM de ratones ANDxB10.BR. (A) RT-PCR del mRNA de RALDH2 y β -actina provenientes de CD-LNM o CD-LNP obtenidas de ratones ANDxB10.BR y tratadas o no por 4 hrs con IL-4 100 U/mL. (B) Cuantificación de la densitometría de RALDH2 normalizado por la expresión β -actina en CD-LNM (n= 3). *p<0.01.

A



B

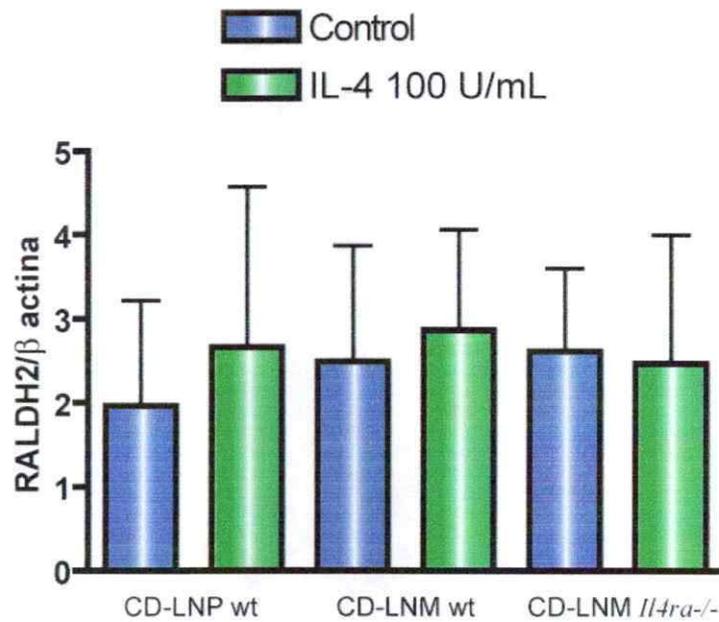
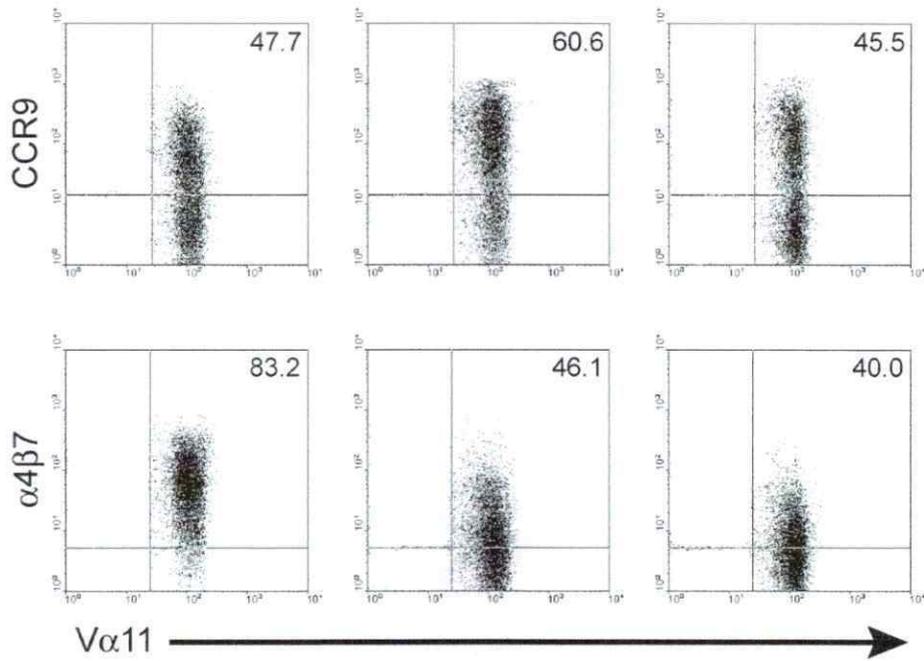


Figura 16. IL-4 no aumenta la expresión del mRNA de RALDH2 en CD-LNM de ratones *Il4ra*^{-/-} o controles. (A) Experimento representativo del RT-PCR para el mRNA de RALDH2 y β -actina provenientes de CD-LNM o CD-LNP obtenidas de ratones controles o *Il4ra*^{-/-}, tratadas por 4 hrs con IL-4 100 U/mL. (B) Cuantificación de la densitometría de RALDH2 normalizado por la expresión β -actina (n= 3).

Para determinar de manera más directa si el aumento en el potencial instructivo de *homing* inducido por IL-4 en CD-LNM es mediado por un aumento de la producción del AR por parte de las CD-LNM, activamos LT CD4⁺ ANDxB10.BR con CD-LNM en presencia de IL-4, con o sin 10 μM citral, un inhibidor de las RALDH (Connor y Smit, 1987). Como se muestra en la figura 17, el tratamiento con citral reduce significativamente la inducción de CCR9 en los LT activados con las CD-LNM en presencia de IL-4. Estos resultados indican que el efecto de IL-4 en la expresión de CCR9 es parcialmente mediado por un aumento en la producción del AR por parte de las CD-LNM.

A



B

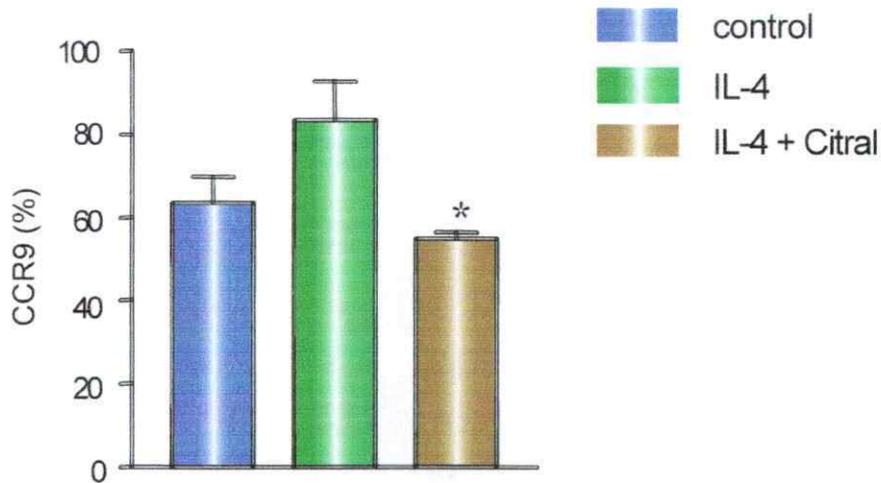


Figura 17. Citral reduce la expresión de CCR9 en LT activados en presencia de IL-4. (A) Expresión de CCR9 (paneles superiores) y $\alpha 4\beta 7$ (paneles inferiores) en los LT $CD4^+$ ANDxB10.BR activados con CD-LNM en ausencia (panel izquierdo), presencia de 100 U/mL de IL-4 (panel central) o IL-4 más 10 μ M citral (panel derecho). (B) El gráfico de barras muestra la cuantificación de 3 experimentos independientes del porcentaje de LT $CD4^+$ que expresan CCR9. * $p < 0.05$.

OBJETIVO 5

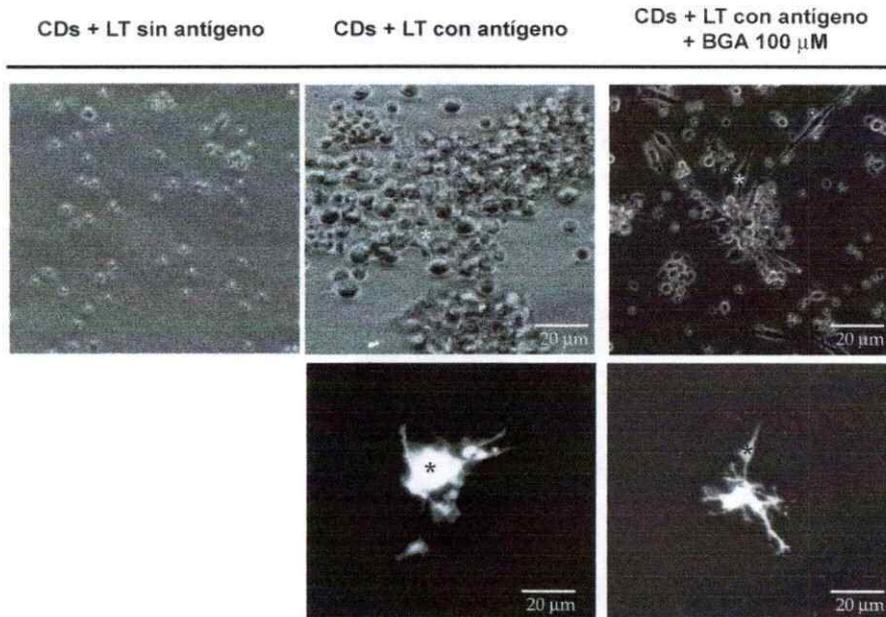
Rol funcional de la formación de uniones en hendidura entre las células dendríticas y los linfocitos T durante la activación.

Para evaluar la formación de UH entre CDs y LT, medimos el traspaso del colorante Amarillo Lucifer entre estos tipos celulares. El Amarillo Lucifer es una molécula de aproximadamente 900 Da, que solamente pasa entre 2 células vecinas por las UH. Por lo tanto, se microinyectó Amarillo Lucifer en CDs purificadas a partir de bazo de ratones ANDXB10.BR y se evaluó el traspaso a LT obtenidos de timo de la misma cepa de ratón, en presencia o ausencia del péptido PCC₈₇₋₁₀₃. Tal como esperamos, los co-cultivos realizados en ausencia del antígeno, no formaron acúmulos celulares entre CDs y LT (Fig.18A), en consecuencia no fue posible evaluar acoplamiento celular entre dichas células. Por el contrario, cuando realizamos los co-cultivos en presencia del antígeno observamos la formación de agregados celulares compuestos por CDs y LT (Fig. 18A). Encontramos que a las 8 hrs de co-cultivo un 60% de las CDs se encontraban acopladas a LT, fenómeno que es bloqueado por BGA, un inhibidor de las UH (Fig. 18). Para corroborar que el acoplamiento entre CDs y LT es mediado por UH, utilizamos un péptido específico (péptido 1848) que se une a la cara externa de los hemicanales (Corvalan y col., 2007) inhibiendo la formación de UH. Como control utilizamos una secuencia del carboxilo terminal intracelular de la conexina 43 (péptido 1849). Como se observa en la figura 18B, el péptido 1848 reduce dramáticamente el acoplamiento heterocelular

entre CDs y LT, mientras que el péptido control 1849 no lo hace. Estos resultados demuestran que durante la presentación de antígeno, existe un acoplamiento entre la CDs y LT, el cual es mediado por las UH.

Para confirmar que el acoplamiento entre CDs y LT es mediado a través de UH, evaluamos la expresión de conexina 43 en LT y CDs. Para esto LT y CDs co-cultivados por ocho horas en presencia de antígeno fueron fijados y permeabilizados para la detección de la conexina 43. El análisis por citometría de flujo de la figura 19 muestra que tanto los LT como las CDs expresan conexina 43. Estos resultados en conjunto sugieren que los LT y las CDs forman UH mediante la expresión de la conexina 43.

A



B

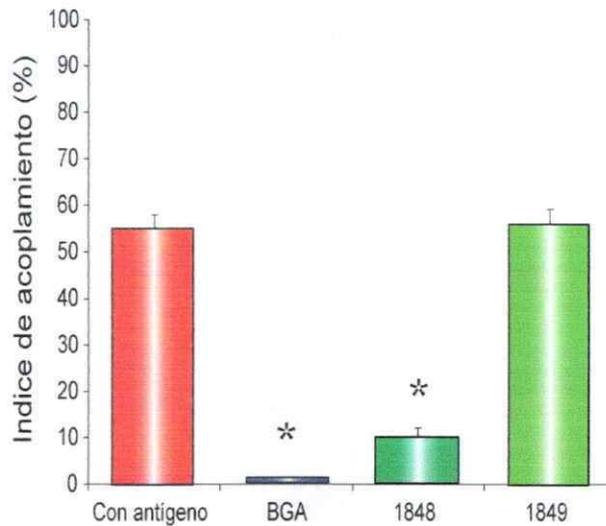


Figura 18. CDs forman UH con LT CD4⁺ durante la presentación de antígenos. CDs de bazo fueron cultivadas por 8 a 24 h con LT CD4⁺ sin antígeno, con antígeno o antígeno más diferentes inhibidores de las UH (BGA 100 μM, péptido inhibidor 1848 y el péptido control 1849 200 μM). Al cabo de 8 h las CDs fueron microinyectadas con Amarillo Lucifer y se observó el traspaso del colorante a los LT. **(A)** Imágenes de microscopía de inmunofluorescencia (paneles inferiores) o contraste de fase (paneles superiores) de LT CD4⁺ co-cultivados con CDs en ausencia de antígeno (panel izquierdo) o presencia de antígeno (panel central) o antígeno más BGA (panel derecho) **(B)** El gráfico muestra el índice de acoplamiento en cada condición (n=3-4). *p<0.01.

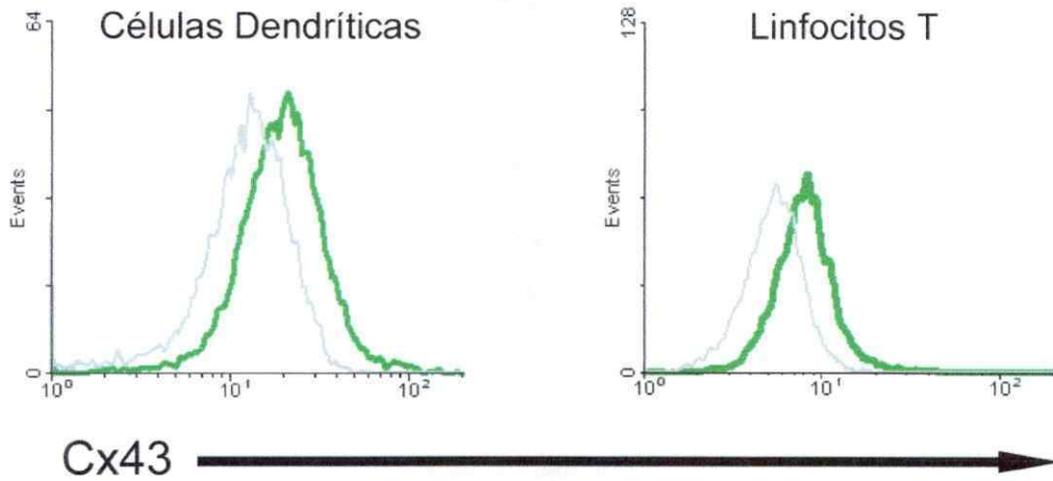


Figura 19. Las CDs y LT CD4⁺ expresan conexina 43, subunidad de la UH. CDs de bazo fueron co-cultivadas con LT en presencia de antígeno durante 16-24 hrs. Posteriormente los co-cultivos fueron fijados, permeabilizados y marcados con anticuerpo anti-CD11c (CDs, panel izquierdo), anti-CD4 (LT, panel derecho) y anti-conexina 43 (línea verde) o con suero pre-inmune (línea gris). Los análisis fueron realizados mediante citometría de flujo. La imagen es representativa de 2 experimentos independientes.

Papel funcional de las UH entre CDs y LT en la activación linfocitaria.

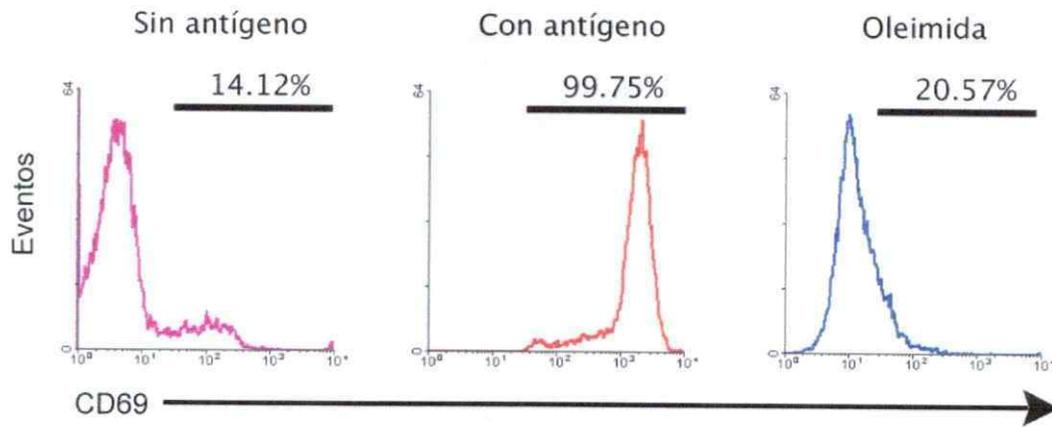
Puesto que demostramos la existencia de UH entre LT CD4⁺ y CDs, enseguida nos preguntamos a cerca de la función de dichas estructuras en la activación de los LT. Para evaluar este punto, se activaron por 16 h LT CD4⁺ ANDxB10.BR con CDs purificadas de bazo y el péptido específico en presencia o ausencia de Oleimida, un inhibidor de UH. Luego de transcurrido este tiempo, se analizó por citometría de flujo la expresión del marcador temprano de activación CD69 en los LT. Por otra parte, se realizaron co-cultivos por 72 horas en presencia de Oleimida para analizar la expresión de CD62L en los LT CD4⁺. Como se observa en la figura 20, los LT co-cultivados en presencia de Oleimida muestran una importante reducción en la expresión de CD69 en comparación con co-cultivos realizados en ausencia de este inhibidor. Los resultados muestran además, una alta expresión de CD62L en los LT tratados con Oleimida, similar a los niveles expresados por LT vírgenes (Fig. 21). Estos resultados sugieren que la inhibición de las UH afectan directamente la activación del LT.

Para confirmar estos resultados, co-cultivamos por 16-20 horas LT CD4⁺ ANDxB10.BR y CDs de bazo más el péptido específico, en presencia o ausencia de Oleimida o de los péptidos 1848 y 1849. Luego de este tiempo recolectamos los sobrenadantes de los co-cultivos y analizamos la secreción de IL-2 mediante ELISA. En estos experimentos observamos que existe una drástica reducción en la secreción de IL-2 en los co-cultivos tratados con inhibidores de la formación de las UH (Oleimida o péptido 1848, Fig. 22) en

comparación a los co-cultivos control o tratados con el péptido no inhibidor de las UH 1849. En conclusión, la inhibición de la formación de las UH impide la activación del LT, manteniendo bajos niveles de expresión de CD69, altos niveles de expresión de CD62L e inhibiendo la secreción de IL-2, similar a lo que ocurre en los LT no activados.

Si la inhibición de las UH en los co-cultivos afectan la activación de los LT CD4⁺, entonces también debería afectar la proliferación de los LT. Para evaluar esto, realizamos estos mismos experimentos con LT CD4⁺ ANDxB10.BR marcados con CFSE. Luego de 3 o 5 días la dilución de CFSE en los LT resultantes fue analizado por citometría de flujo para determinar proliferación celular. Los resultados muestran que al día 3 de co-cultivo los LT activados en presencia de Oleimida no proliferaron, resultado similar al de los LT co-cultivados con CDs, pero sin antígeno (Fig. 23). Sin embargo, al día 5 de co-cultivo observamos en los LT tratados con Oleimida 5 ciclos de división celular en comparación a los LT de co-cultivos con antígeno en ausencia del inhibidor donde se observa 7 ciclos de división celular (Fig. 23). Por lo tanto la inhibición de las UH entre los LT y CDs retarda el inicio de la proliferación de los LT. Cabe señalar que la ausencia de CDs o de antígeno en los co-cultivos impide completamente la proliferación de los LT.

Estos resultados demuestran que la eficiente proliferación de los LT CD4⁺ durante la presentación de antígenos necesita de la formación de UH entre los LT y las CDs.



B

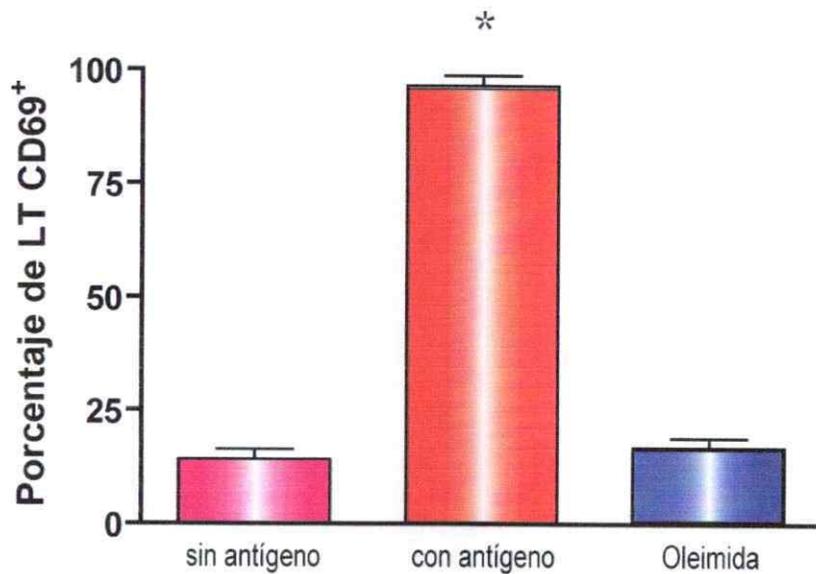


Figura 20. El bloqueo de las UH inhibe la expresión de CD69 en los LT CD4⁺. CDs de bazo fueron co-cultivados con LT CD4⁺ "ANDxB10.BR" y péptido específico por 16 hrs. (A) Expresión de CD69 por citometría de flujo en LT. (B) El gráfico muestra el porcentaje de LT CD4⁺ CD69⁺. (n=3). *p<0.01.

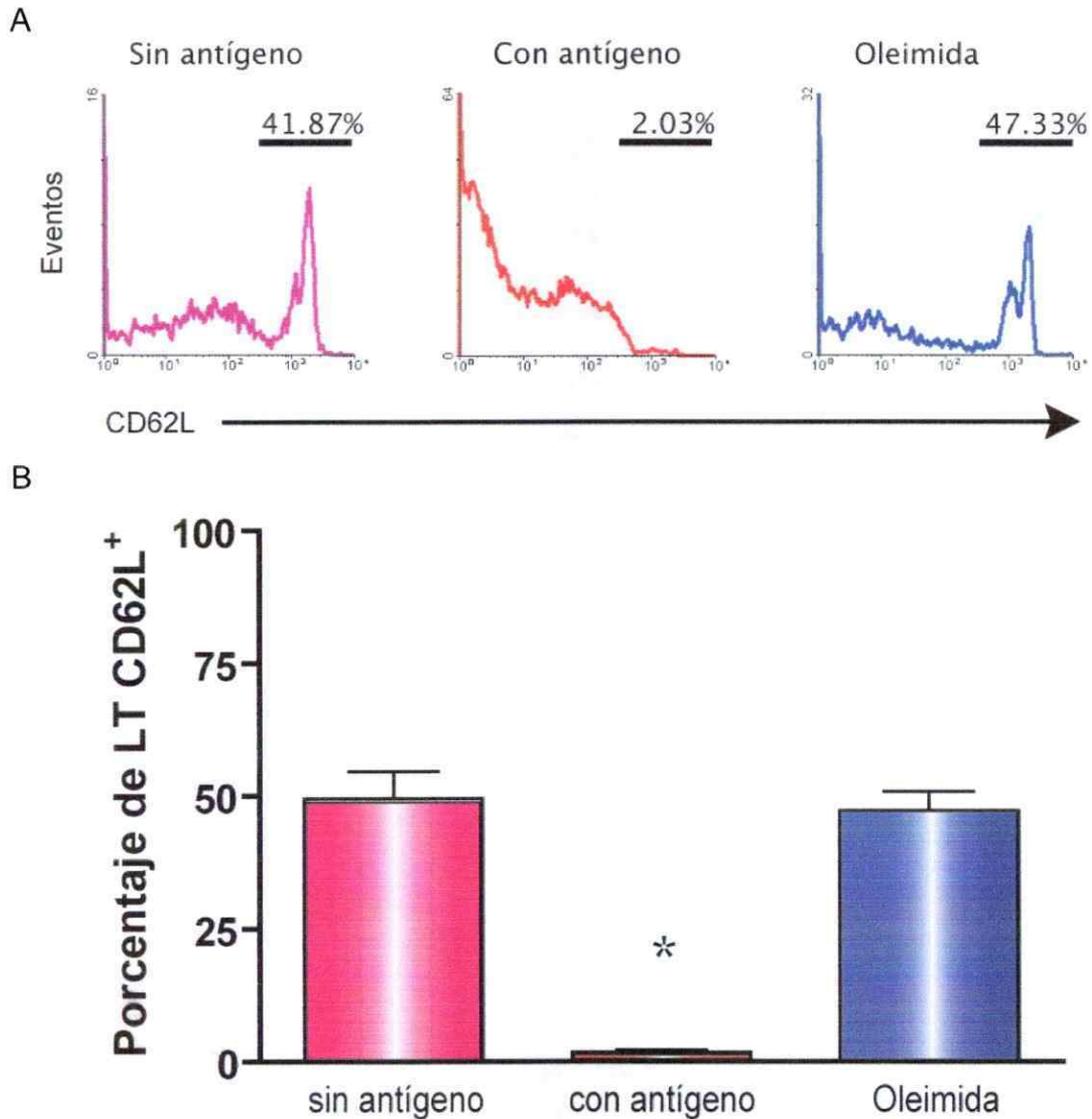


Figura 21. El bloqueo de las UH mantiene la expresión de CD62L en los LT CD4⁺. LT CD4⁺ "ANDxB10.BR" fueron co-cultivados con CDs de bazo por 72 hrs y se analizó la expresión de CD62L por citometría de flujo. **(A)** Histogramas representativo de la expresión de CD62L en LT sin antígeno (panel izquierdo), activado con antígeno en ausencia (panel central) o presencia de Oleimida 100 μ M (panel derecho). **(B)** El gráfico muestra el porcentaje de LT CD4⁺ CD62L⁺. (n=3). *p<0.01.

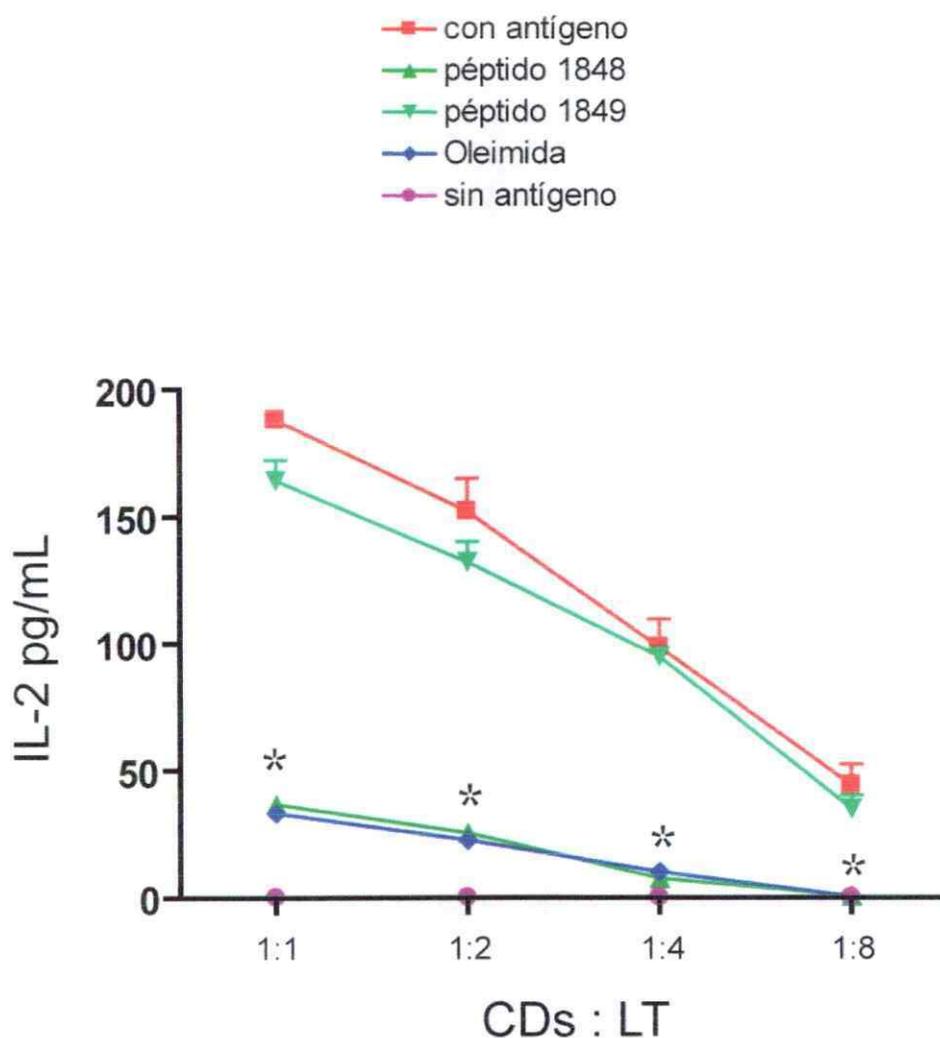


Figura 22. La inhibición de las UH reduce la secreción de IL-2 en LT CD4⁺. CDs de bazo fueron co-cultivados con LT CD4⁺ por 16-20 hrs. sin antígeno, con antígeno o antígeno más inhibidores de las UH (Oleimida 100 μ M, péptido 1848 y el péptido control 200 μ M). Al cabo de este tiempo, se recolectaron los sobrenadantes de los co-cultivos y se evaluó la secreción de IL-2 mediante ELISA. (n=3). *p<0.01.

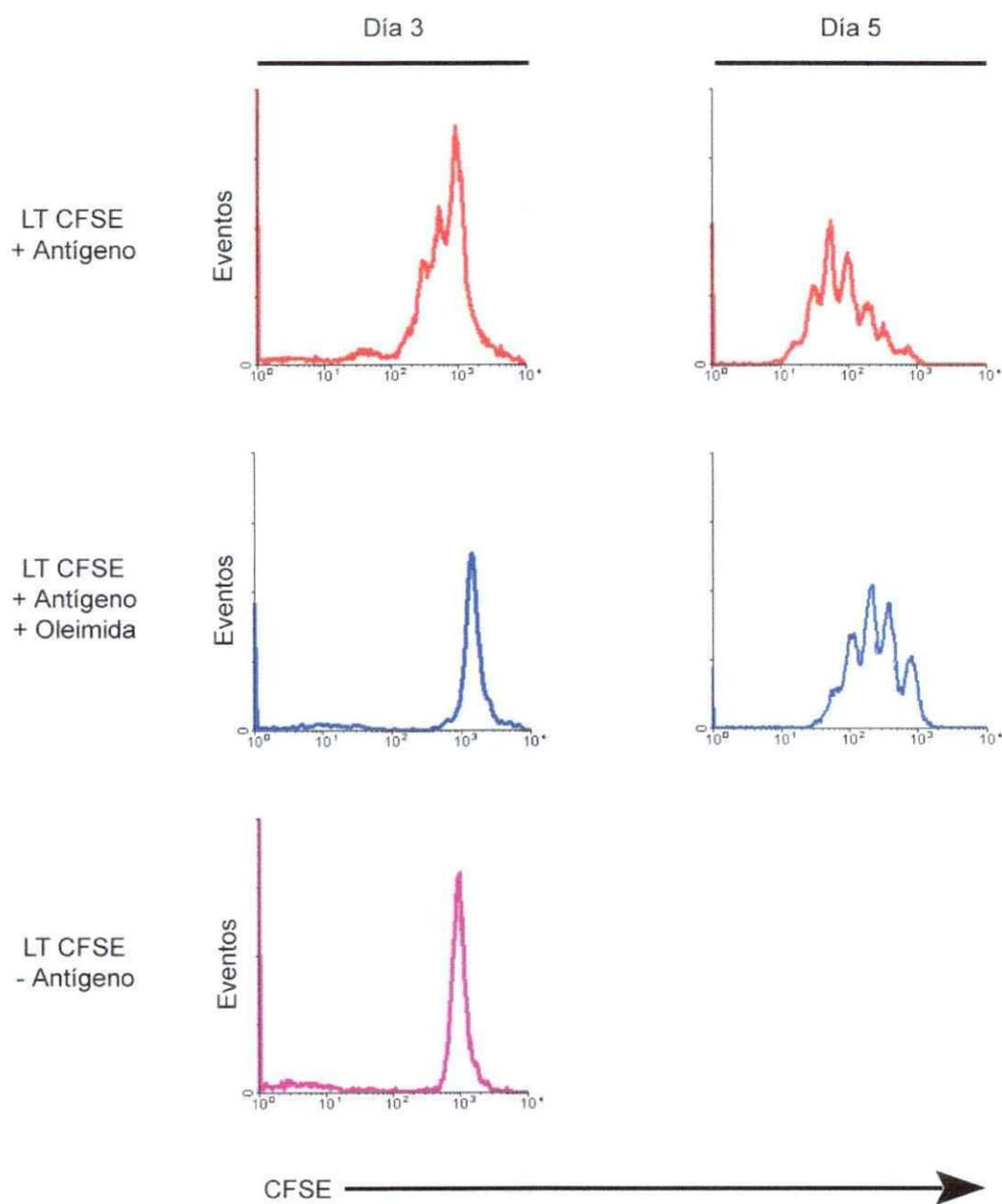


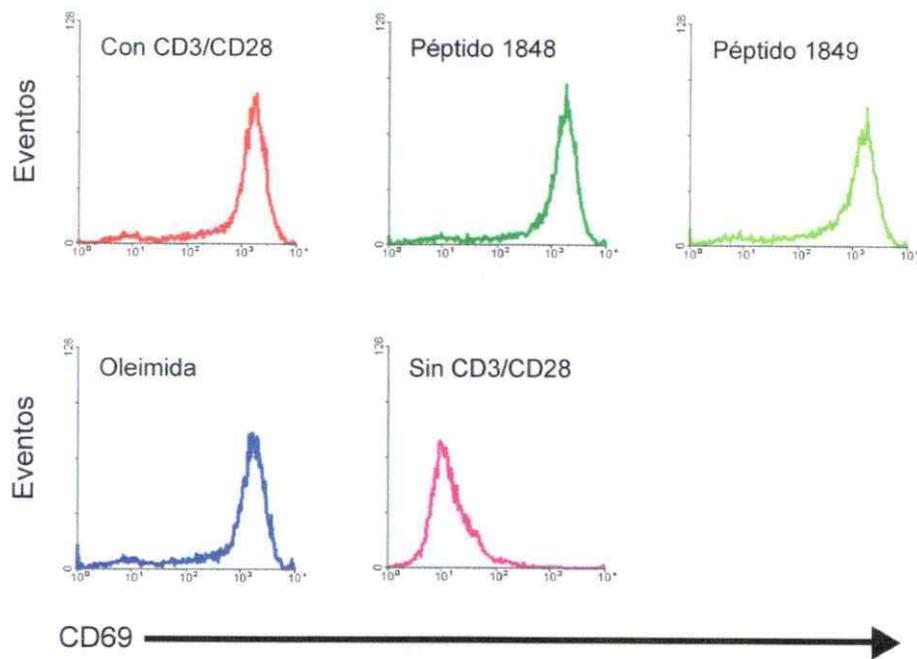
Figura 23. La inhibición de las UH afecta la proliferación de los LT CD4⁺. LT CD4⁺ “ANDxB10.BR” marcados con CFSE fueron co-cultivados con CDs en ausencia o presencia de antígeno con o sin Oleimida 100 μ M. La dilución del colorante CFSE en los LT fue evaluada por citometría de flujo a los días 3 y 5. Histogramas representativo de 2 experimentos independientes.

Efecto de los inhibidores de las UH en la activación policlonal de los LT y en el fenotipo de las CDs durante los co-cultivos.

Para descartar que el efecto de los inhibidores de las UH en la activación de los LT CD4⁺ ANDxB10.BR, sea por un efecto directo sobre los linfocitos, realizamos cultivos de LT activados policlonalmente con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, en presencia o ausencia de Oleimida, el péptido inhibidor 1849 o el péptido control 1849. Luego de 16 horas, analizamos la expresión de CD69 mediante citometría de flujo en los LT y la secreción de IL-2 mediante ELISA. Como se observa en la figura 24, Oleimida y el péptido 1848 no tiene el efecto sobre el porcentaje de LT que expresan CD69 o en la secreción de IL-2. Esto demuestra que la inhibición de la activación en los LT por Oleimida no ocurre directamente sobre los LT, sino más bien en la interacción de los LT con las CDs.

Por otro lado, para descartar que el efecto de Oleimida fuera sobre la maduración de las CDs afectando así indirectamente la activación de los LT, CDs se co-cultivaron por 16 horas con LT CD4⁺ en presencia de Oleimida. Luego de este tiempo, se analizó la expresión de los marcadores de maduración de las CDs (CD80, CD86, CD40 e I-A/I-E). Como se observa en la figura 25, Oleimida no afecta la expresión de los marcadores de maduración en la CDs. Estos resultados en conjunto nos permiten sugerir que los inhibidores de las UH actúan sobre dichas estructuras formadas entre CDs y LT afectando la activación de estos últimos.

A



B

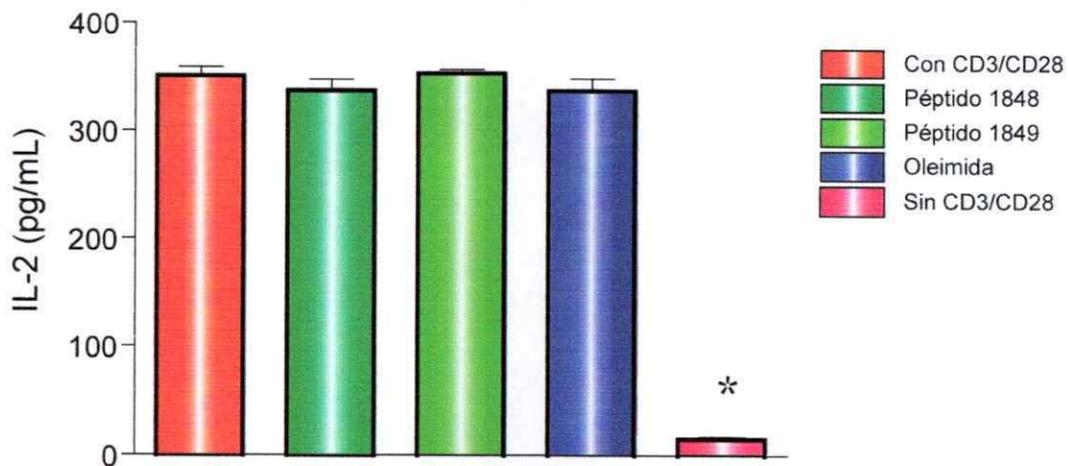


Figura 24. Los inhibidores de las UH no afectan directamente la activación de los LT CD4⁺. LT CD4⁺ fueron activados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o ausencia de Oleimida 100 μ M, péptido 1848 o péptido 1849 200 μ M por 16 hrs, para posteriormente analizar la expresión de CD69 por citometría de flujo y se recolectaron los sobrenadantes de los cultivo para medir IL-2 por ELISA. (A) Histograma de la expresión de CD69 en LT CD4⁺. (B) Gráfico de la secreción de IL-2 de los cultivo. (n=3). *p<0.01.

A

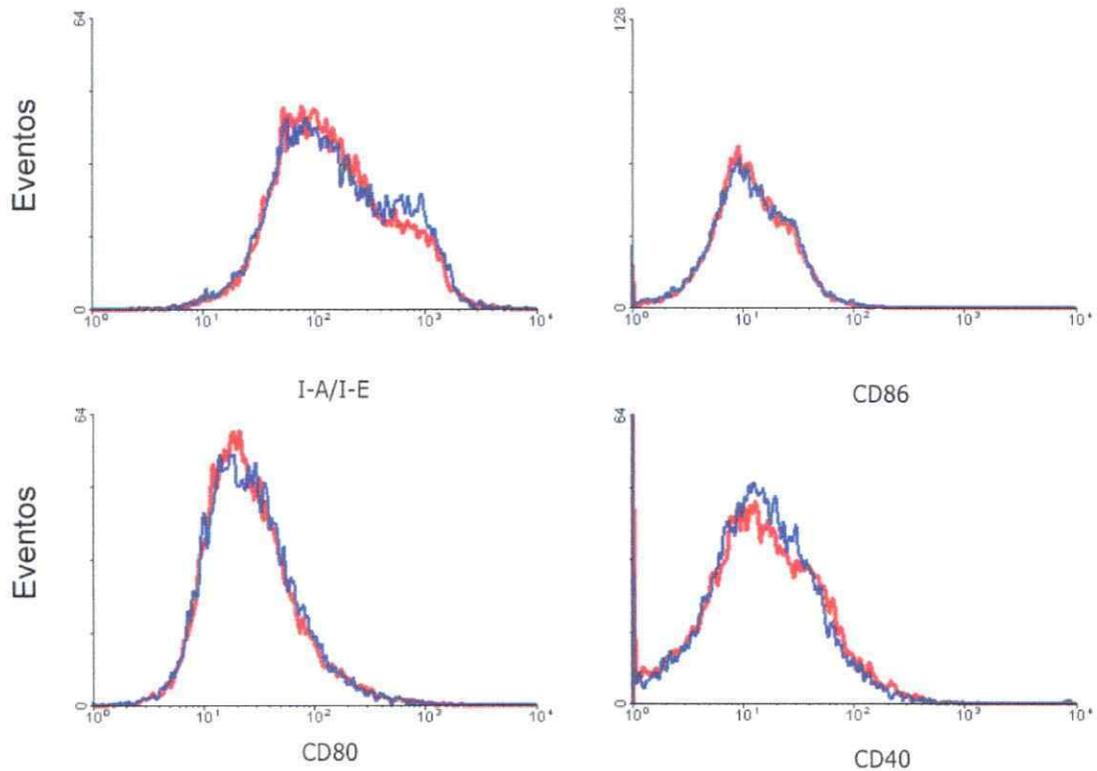


Figura 25. Los inhibidores de las UH no afectan el fenotipo de las CDs durante los co-cultivos. CDs fueron co-cultivadas con LT CD4⁺ "ANDxB10.BR" en presencia o ausencia de Oleimida 100 μ M por 16 horas. Posteriormente, se analizó mediante citometría de flujo la expresión de MHC-II (I-A/I-E), CD80, CD86 y CD40 en una ventana de células CD11c⁺. Histograma de la expresión de MHC-II (I-A/I-E), CD80, CD86 y CD40 en CDs tratadas con Oleimida (línea azul) o no tratadas (línea roja).

DISCUSIÓN

Papel de IL-4 en la regulación del *homing* de los LT CD4⁺ hacia la mucosa intestinal.

El papel que juega IL-4 en el acondicionamiento de las CDs por parte de los LT asociados a la mucosa intestinal se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Alpan y col., 2004). Adicionalmente, se ha observado que esta citoquina es capaz de inducir la expresión de CCR9 en los LT CD8⁺ cuando son activados con CD-LNM (Mora y col., 2005). A pesar de los distintos roles que cumple IL-4 en la mucosa intestinal, no se sabe si IL-4 afecta la regulación de los receptores de *homing* en los LT CD4⁺ y cuales son los posibles mecanismos que están participando en la inducción de estos receptores. En esta tesis, demostramos que IL-4 aumenta la expresión de CCR9 en los LT CD4⁺ de manera dosis dependiente (Fig. 3). Interesantemente, el efecto de esta citoquina en la inducción de CCR9 en los LT es a través de las CDs, debido a que CD-LNM provenientes de ratones *Il4ra*^{-/-} no son capaces de inducir la expresión de CCR9 en LT CD4⁺, ni tampoco aumentar la expresión de este receptor cuando IL-4 está presente en los co-cultivos (Fig. 7). Por otro lado, IL-4 no tiene un efecto significativo en la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en ambos modelos de ratones utilizados en este trabajo (C57BL6 y BALB/c). Estos resultados están de acuerdo con evidencias que sugieren que la inducción de los receptores CCR9 y $\alpha 4\beta 7$ pueden tener distintos requerimientos (Agace, 2006), ya que

existirían señales que regularían específicamente a cada receptor, señales que podrían ser dependientes o independientes del AR (Iwata y col., 2004, Mora y col., 2005, Agace, 2006). Por ejemplo, OX40 podría actuar en la regulación de $\alpha 4\beta 7$ en los LT en forma independiente al efecto de IL-4 en la inducción de CCR9, tal como lo sugiere Agace (Agace, 2006).

Interesantemente, nuestros resultados muestran que CD-LNP purificadas de ratones ANDxB10.BR, inducen la expresión de CCR9 en los LT CD4⁺ cuando los co-cultivos fueron realizados en presencia de IL-4 (Fig. 5). Si bien, estas células no expresan el mRNA de RALDH2, ni aumenta con IL-4 (Fig. 15), se ha demostrado que expresan el mRNA de RALDH1 y RALDH2 (Fig. 2) (Iwata y col., 2004), sugiriendo que IL-4 estaría aumentando la expresión de estas isoformas para producir AR en las CD-LNP y así inducir la expresión de CCR9 en los LT.

A través de los ensayo de migración competitiva entre los LT activados con CD-LNM provenientes de un ratón *Il4ra*^{-/-} o control, podemos observar que el aumento de CCR9 en los LT por IL-4 es necesario para una eficaz migración hacia la LP intestinal, sin embargo los LT CD4⁺ activados con CD-LNM *Il4ra*^{-/-} también son capaces de migrar a este sitio (Fig. 10 y 12). Estos resultados apoyan la hipótesis que la migración de LT CD4⁺ a la mucosa intestinal puede ser dependiente o independiente de CCR9 (Stenstad y col., 2006). Además debemos destacar que en la LP de ratones controles BALB/c existen ambas poblaciones de LT, es decir CCR9⁺ y CCR9⁻ (Fig. 11). Una de las moléculas que

puede estar involucrada en el *homing* de los LT hacia la mucosa intestinal, es el receptor CCR6, el cual se expresa en LT de LP y su ligando MIP3 α está abundantemente expresado en el intestino grueso y en una menor proporción en la LP del intestino delgado (Varona y col., 1998, Lugering y col., 2003, Stenstad y col., 2006).

Nuestros resultados *in vivo* demuestran que IL-4 es necesaria para la expresión de CCR9, ya que encontramos pocos LT CD4⁺ CCR9⁺ en la LP de los ratones *Il4ra*^{-/-} (Fig. 11) y en LNM de ratones BALB/c inmunizados con CD-LNM *Il4ra*^{-/-} (Fig. 13). Interesantemente, los LT CD4⁺ presentes en el timo de los ratones *Il4ra*^{-/-} expresan CCR9 de manera similar a los LT CD4⁺ de ratones controles. Esto sugiere que los mecanismos de inducción de CCR9 en timo y en los OLS asociados a la mucosa intestinal serían distintos.

Por otra parte, cuando los ratones se inmunizan con la proteína emulsionada en CFA, los LT CD4⁺ obtenidos de LNM de ratones *Il4ra*^{-/-} expresan CCR9, incluso a niveles mayores que los encontrados en ratones controles (Fig. 14). Estos resultados nos sugieren que i) las CDs asociadas a mucosa intestinal en un estado de inflamación son educadas por señales independientes de IL-4 ii) el mecanismo de inducción de CCR9 en los LT CD4⁺ en LNM bajo un estado de inflamación serían similares a los mecanismos que actúan en los linfocitos para la inducción de este receptor en el timo y iii) el microambiente en el OLS estaría actuando directamente sobre el LT para inducir CCR9 en un estado de inflamación. Varios investigadores han propuesto

que las señales producidas en el microambiente y la vía de inmunización son importantes en la inducción de *homing* en los LT (Johansson-Lindbom y col., 2003, Dudda y col., 2004), además se ha demostrado que gran parte de la mucosa intestinal expresa las enzimas necesarias para sintetizar el AR (Iwata y col., 2004), aunque no se ha demostrado la importancia de este microambiente en la inducción de *homing* hacia dicho tejido en los LT.

En relación al mecanismo por el cual IL-4 induce a través de las CDs la expresión de CCR9 en los LT CD4⁺, observamos que en el modelo C57BL6, IL-4 aumenta la expresión del mRNA de RALDH2 en CD-LNM (Fig. 14), sugiriendo que el efecto de IL-4 sobre la inducción del CCR9 en los linfocitos es a través de la síntesis del AR. Sin embargo, en el modelo BALB/c observamos que IL-4 no tiene el mismo efecto sobre la expresión del mRNA RALDH2 en CD-LNM de ratones *Il4ra*^{-/-} o controles (Fig. 15). Por otra parte, observamos que las CD-LNP también expresan el mRNA de esta enzima (Fig. 15), sugiriendo que los mecanismos de inducción de CCR9 en los LT por IL-4 en los ratones BALB/c y C57BL6 son distintos. Sobre la base de las diferencias que puedan existir entre ambos modelos, evidencias de la literatura (Guler y col., 1997, Filippi y col., 2003, Alexander y Bryson, 2005) muestran que ratones C57BL/6 inducen en LT preferentemente un fenotipo Th1 frente a determinadas infecciones, mientras que ratones BALB/c inducen un fenotipo de tipo Th2 no protector frente al mismo estímulo. Por lo tanto existirían propiedades genéticas que influenciarían el tipo de respuesta inmune que se establece. Además, resultados recientes han demostrado que las CDs de los ratones C57BL6 son capaces de producir

dendritas transepiteliales que pueden sensor y capturar antígenos presentes en el lumen del intestino, mientras que las CDs proveniente del mismo tejido, pero de un ratón BALB/c no generan dichas estructuras (Vallon-Eberhard y col., 2006). Además, se ha reportado que ambas cepas de ratones difieren en el desarrollo postnatal de los folículos linfoides aislados y de las criptas intestinales (Hamada y col., 2002). La mucosa intestinal de los ratones BALB/c presenta un alto nivel de expresión de la fosfolipasa A₂, que tiene una actividad bactericida, produciendo un cambio en la composición de la flora intestinal, mientras que en el ratón C57BL6 presenta una disrupción genética en el grupo de genes de secreción de tipo II de la fosfolipasa A₂, careciendo de esta enzima en la mucosa intestinal (Harwig y col., 1995, Kennedy y col., 1995). Por último la lámina propia de los ratones BALB/c contiene más linfocitos B IgA⁺ que los presente en los ratones C57BL6 (Kamata y col., 2000). Las evidencias que muestran las numerosas diferencias entre la mucosa intestinal de ambas cepas de ratones, nos permite postular que IL-4 actúa a través de las CD-LNM para incrementar la expresión de CCR9 en los LT CD4⁺ por mecanismos distintos y dependiente de la cepa de ratón.

Resultados recientes han demostrado que IL-4 al actuar sobre la CD induce un aumento en la producción de IL-12, polarizando la respuesta de los LT a Th1 (Yao y col., 2005), adicionalmente otros investigadores han demostrado que gran parte de los LT CD4⁺ CCR9⁺ son productores de INF- γ (Kim y col., 2001, Papadakis y col., 2003, Saruta y col., 2007), sugiriendo que

en la mucosa intestinal, IL-4 podría tener un efecto dual, inducir la polarización de la respuesta inmune a Th1 e inducir la expresión de los receptores de *homing*. Por otro lado, IL-4 es necesaria para generar tolerancia contra antígenos administrado oralmente (Alpan y col., 2004), esta respuesta puede estar debida a la inducción de la síntesis de AR, ya que recientemente se ha demostrado que AR producido por las CDs de la mucosa intestinal sinergiza con TGF- β para inducir T reguladores (Benson y col., 2007, Coombes y col., 2007, Sun y col., 2007). Uno de los punto que cabe dilucidar es como IL-4 regula inducción de T reguladores y T efectores en la mucosa intestinal.

Como se describió anteriormente en la introducción, para ejercer su función, IL-13 debe interactuar con la cadena α del receptor de IL-4 y con la misma cadena del receptor de IL-13, así sobrelleva muchas funciones de IL-4 (Lutz y col., 2002). Por estos antecedentes, no descartamos que IL-13 tenga el mismo efecto en la inducción de CCR9 en los LT CD4⁺, además hay evidencias de la expresión del mRNA de esta citoquina y de su receptor en la mucosa intestinal (Mcdermott y col., 2005, Morimoto y col., 2006).

El papel de las UH en la activación de los LT CD4⁺.

Esta tesis muestra por primera vez, evidencias de la formación de UH funcionales entre las CDs y los LT, en respuesta a la presentación de antígenos. Cuando co-cultivamos CDs de bazo con LT, observamos que existe acoplamiento heterocelular entre las dos poblaciones. Además el antígeno es

requerido para la formación de dichas estructuras, indicando que la presentación de antígenos por las CDs genera un ambiente apropiado para la formación de las UH (Fig. 18). En relación al papel funcional que cumplen las UH, demostramos que estas son necesarias para una eficaz activación y proliferación de los LT. Estos resultados sugieren que las UH entre CDs y LT son importantes para una efectiva respuesta inmune.

Nuestros resultados muestran que los co-cultivos de LT con CDs en ausencia de antígeno no forman acúmulos heterocelulares, además los co-cultivos que fueron realizados en presencia de antígeno, forman acúmulos celulares tal como describe Benvenuti (Benvenuti y col., 2004). Adicionalmente, el curso temporal de acoplamiento entre CDs y LT fue desde las 4 horas hasta las 24 horas, similares a los cursos temporales de interacción entre CDs y LT descritas por otros grupos (Benvenuti y col., 2004).

Debido a que la conexina es la subunidad fundamental para la formación de las UH, evaluamos la expresión de la conexina 43 en nuestros co-cultivos. Nuestros resultados muestran que tanto LT como CDs expresan esta subunidad de las UH (Fig. 19), confirmando antecedentes previos que han demostrado que LT obtenidos de amígdala o de sangre, expresan las conexinas 40 y 43 (Oviedo-Orta y col., 2000, Oviedo-Orta y col., 2001) y que CDs diferenciadas a partir de médula ósea y activadas con LPS en presencia de INF γ más TNF α expresan las conexinas 43 y 45 (Matsue y col., 2006, Corvalan y col., 2007,

Mendoza-Naranjo y col., 2007). Adicionalmente otras conexinas podrían estar participando en las UH formadas entre CDs y LT.

Para la evaluación el papel que tiene las UH entre CDs y LT en la activación del LT, evaluamos distintos parámetros i) la inducción temprana de CD69 ii) la reducción de CD62L como símbolo de activación de los LT, iii) la secreción de IL-2 y por último iv) la proliferación de los LT (Inaba y Steinman, 1986, Monks y col., 1997, Monks y col., 1998, Dustin y Cooper, 2000). En todos los casos observamos una drástica inhibición de la activación de los LT al inhibir la formación de las UH en los co-cultivos, sin embargo al día 5 de los co-cultivos, los LT proliferan en presencia de los inhibidores de las UH. Estos resultados sugerirían que los inhibidores de las UH pueden ser degradados y retomando de esta manera la activación de los LT y su posterior proliferación.

Para descartar un efecto directo de los inhibidores de la formación de UH sobre los LT, activamos los LT policlonalmente en ausencia de CDs. Nuestros resultados demuestran que los bloqueadores no inhiben directamente la activación linfocitaria, sugiriendo que la posible formación de UH homóloga entre LT no afecta la activación de estos, lo cual es contrario a lo reportado por Saez y colaboradores (Concha y col., 1993) que mostraron que LT de sangre periférica humana activados con concanavalina A forman UH las que al ser inhibidas reducen drásticamente la activación del LT. Estas diferencias pueden deberse al origen de los LT (ratón v/s humano) o a los diferentes métodos de obtención y activación de los LT.

Antecedentes previos han demostrado que las UH formadas entre CDs son necesarias para una eficiente activación de dichas células (Matsue y col., 2006, Corvalan y col., 2007, Mendoza-Naranjo y col., 2007). Para estudiar el efecto que tienen los inhibidores de UH sobre la CDs, evaluamos distintos marcadores de activación de la CDs. Nuestros resultados demuestran que no existen diferencia en la expresión de los marcadores de activación de las CDs en los co-cultivos tratados con los inhibidores y los controles (Fig. 24). Las diferencias entre nuestros datos y los de la literatura pueden deberse a i) nuestros ensayos fueron realizados con CDs purificadas de bazo, mientras que los otros grupos de investigadores utilizaron líneas celulares de CDs o CDs diferenciadas de médula ósea, ii) en nuestros ensayos existió sólo un 10% de acoplamiento por UH entre CDs (datos no mostrados) y el acoplamiento que observamos entre CDs y LT fue debido a las señales producidas durante el co-cultivo, mientras que en trabajos anteriores inducen el acoplamiento por UH entre CDs mediante la activación con LPS en presencia de INF- γ más TNF- α (Eugenin y col., 2003).

¿Las UH estarían regulando la activación del LT in vivo? Aunque no existe un modelo de ratón deficiente en la conexina 43 en el cual se pueda evaluar esta pregunta, en base a las evidencias que muestran la interacción entre la CDs y los LT durante la presentación de antígenos en el OLS, ambos tipos celulares mantienen un estrecho contacto celular manteniéndose este contacto un par de horas, tanto en condición de tolerancia, como en condición

de inflamación (Shakhar y col., 2005, Zinselmeyer y col., 2005). Las UH podrían jugar un papel importante en diferenciar el tipo de respuesta inmune, tolerancia v/s inflamación, que se está generando dentro OLS.

Las UH no son las únicas comunicaciones intercelulares, recientemente se ha descrito verdaderos tubos de membrana plasmática llamadas nanotúbulos, entre células dendríticas, macrófagos y células NK. Estas estructuras no sólo dejan pasar moléculas desde el citoplasma, si no también permiten el traspaso de proteínas de membranas (Onfelt y col., 2004, Watkins y Salter, 2005). Si bien no se ha determinado el papel funcional de los nanotúbulos, esta estructuras pueden formarse entre la CD y el LT, y tener un papel funcional durante la sinapsis inmunológica.

Varias interrogantes permanecen por ser dilucidadas, i) la identificación y cantidad de las moléculas que son transmitidas intercelularmente entre CDs y LT, ii) cuales de estas moléculas está realmente involucrada en la activación del LT, iii) identificar otras subunidades de conexinas que pueden estar participando en la formación de UH entre CDs y LT.

RESUMEN DE CONCLUSIONES

La unión de IL-4 a su receptor en las CD-LNM determina que éstas células induzcan un aumento en la expresión del receptor de *homing* a mucosa intestinal CCR9 en los LT CD4⁺ *in vitro*.

Este efecto de la IL-4 es específico sobre la expresión de CCR9 en LT CD4⁺ ya que no afecta la expresión del otro receptor conocido de *homing* a mucosa intestinal $\alpha 4\beta 7$ o la activación del LT.

Esta interacción de IL-4 con las CD-LNM es necesaria para una eficaz migración hacia la mucosa intestinal de los LT CD4⁺.

El efecto de IL-4 sobre las CD-LNM se ejerce a través de su capacidad de aumentar la expresión del mRNA de RALDH2 en CD-LNM de ratones C57BL6. El hecho que IL-4 no afecta los niveles de mRNA de RALDH2 en CD-LNM de ratones BALB/c sugiere que los mecanismos de inducción de CCR9 en ambas cepa de ratón son distintos.

La presencia de antígeno es fundamental en el acoplamiento entre CDs y LT. Este acoplamiento se debe a la formación de UH entre las dos poblaciones celulares, con la participación de la conexina 43.

La formación de estas UH aparece como fundamental en la activación y proliferación linfocitaria.

Bibliografía

- Agace, W. W. (2006). Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities. *Nat Rev Immunol*, 6(9), 682-692.
- Alexander, J., y Bryson, K. (2005). T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett*, 99(1), 17-23.
- Apan, O., Bachelder, E., Isil, E., Arnheiter, H., y Matzinger, P. (2004). 'Educated' dendritic cells act as messengers from memory to naive T helper cells. *Nat Immunol*, 5(6), 615-622.
- Andrade, M. C., Menezes, J. S., Cassali, G. D., Martins-Filho, O. A., Cara, D. C., y Faria, A. M. (2006). Alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction in mice. *Clin Exp Immunol*, 146(2), 312-322.
- Andrew, D. P., Berlin, C., Honda, S., Yoshino, T., Hamann, A., Holzmann, B., Kilshaw, P. J., y Butcher, E. C. (1994). Distinct but overlapping epitopes are involved in alpha 4 beta 7-mediated adhesion to vascular cell adhesion molecule-1, mucosal addressin-1, fibronectin, and lymphocyte aggregation. *J Immunol*, 153(9), 3847-3861.
- Annacker, O., Coombes, J. L., Malmstrom, V., Uhlig, H. H., Bourne, T., Johansson-Lindbom, B., Agace, W. W., Parker, C. M., y Powrie, F. (2005). Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med*, 202(8), 1051-1061.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., y Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18, 767-811.

Becker, D., Mohamadzadeh, M., Reske, K., y Knop, J. (1992). Increased level of intracellular MHC class II molecules in murine Langerhans cells following in vivo and in vitro administration of contact allergens. *J Invest Dermatol*, 99(5), 545-549.

Benson, M. J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M., y Noelle, R. J. (2007). All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med*, 204(8), 1765-1774.

Benvenuti, F., Lagaudriere-Gesbert, C., Grandjean, I., Jancic, C., Hivroz, C., Trautmann, A., Lantz, O., y Amigorena, S. (2004). Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J Immunol*, 172(1), 292-301.

Berlin, C., Berg, E. L., Briskin, M. J., Andrew, D. P., Kilshaw, P. J., Holzmann, B., Weissman, I. L., Hamann, A., y Butcher, E. C. (1993). Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell*, 74(1), 185-195.

Bjorkdahl, O., Barber, K. A., Brett, S. J., Daly, M. G., Plumpton, C., Elshourbagy, N. A., Tite, J. P., y Thomsen, L. L. (2003). Characterization of CC-chemokine receptor 7 expression on murine T cells in lymphoid tissues. *Immunology*, 110(2), 170-179.

Budd, R. C., Cerottini, J. C., Horvath, C., Bron, C., Pedrazzini, T., Howe, R. C., y MacDonald, H. R. (1987). Distinction of virgin and memory T lymphocytes. Stable acquisition of the Pgp-1 glycoprotein concomitant with antigenic stimulation. *J Immunol*, 138(10), 3120-3129.

Campbell, D. J., y Butcher, E. C. (2002). Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J Exp Med*, 195(1), 135-141.

Campbell, D. J., Debes, G. F., Johnston, B., Wilson, E., y Butcher, E. C. (2003). Targeting T cell responses by selective chemokine receptor expression. *Semin Immunol*, 15(5), 277-286.

Campbell, J. J., Haraldsen, G., Pan, J., Rottman, J., Qin, S., Ponath, P., Andrew, D. P., Warnke, R., Ruffing, N., Kassam, N., Wu, L., y Butcher, E. C. (1999). The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature*, 400(6746), 776-780.

Campbell, J. J., y Butcher, E. C. (2000). Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol*, 12(3), 336-341.

Chen, Y., Inobe, J., y Weiner, H. L. (1997). Inductive events in oral tolerance in the TCR transgenic adoptive transfer model. *Cell Immunol*, 178(1), 62-68.

Clausen, B. E., Waldburger, J. M., Schwenk, F., Barras, E., Mach, B., Rajewsky, K., Forster, I., y Reith, W. (1998). Residual MHC class II expression on mature dendritic cells and activated B cells in RFX5-deficient mice. *Immunity*, 8(2), 143-155.

Concha, M., Vidal, A., Garces, G., Figueroa, C. D., y Caorsi, I. (1993). Physical interaction between Langerhans cells and T-lymphocytes during antigen presentation in vitro. *J Invest Dermatol*, 100(4), 429-434.

Connor, M. J., y Smit, M. H. (1987). Terminal-group oxidation of retinol by mouse epidermis. Inhibition in vitro and in vivo. *Biochem J*, 244(2), 489-492.

Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y., y Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*, 204(8), 1757-1764.

Corvalan, L. A., Araya, R., Branes, M. C., Saez, P. J., Kalergis, A. M., Tobar, J. A., Theis, M., Willecke, K., y Saez, J. C. (2007). Injury of skeletal muscle and

specific cytokines induce the expression of gap junction channels in mouse dendritic cells. *J Cell Physiol*, 211(3), 649-660.

Dudda, J. C., Simon, J. C., y Martin, S. (2004). Dendritic cell immunization route determines CD8⁺ T cell trafficking to inflamed skin: role for tissue microenvironment and dendritic cells in establishment of T cell-homing subsets. *J Immunol*, 172(2), 857-863.

Dudda, J. C., Lembo, A., Bachtanian, E., Huehn, J., Siewert, C., Hamann, A., Kremmer, E., Forster, R., y Martin, S. F. (2005). Dendritic cells govern induction and reprogramming of polarized tissue-selective homing receptor patterns of T cells: important roles for soluble factors and tissue microenvironments. *Eur J Immunol*, 35(4), 1056-1065.

Dustin, M. L., y Cooper, J. A. (2000). The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol*, 1(1), 23-29.

Eugenin, E. A., Branes, M. C., Berman, J. W., y Saez, J. C. (2003). TNF-alpha plus IFN-gamma induce connexin43 expression and formation of gap junctions between human monocytes/macrophages that enhance physiological responses. *J Immunol*, 170(3), 1320-1328.

Everson, M. P., Lemak, D. G., McDuffie, D. S., Koopman, W. J., McGhee, J. R., y Beagley, K. W. (1998). Dendritic cells from Peyer's patch and spleen induce different T helper cell responses. *J Interferon Cytokine Res*, 18(2), 103-115.

Filippi, C., Hugues, S., Cazareth, J., Julia, V., Glaichenhaus, N., y Ugolini, S. (2003). CD4⁺ T cell polarization in mice is modulated by strain-specific major histocompatibility complex-independent differences within dendritic cells. *J Exp Med*, 198(2), 201-209.

Gallatin, W. M., Weissman, I. L., y Butcher, E. C. (1983). A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature*, 304(5921), 30-34.

Gessner, A., Blum, H., y Rollinghoff, M. (1993). Differential regulation of IL-9-expression after infection with *Leishmania major* in susceptible and resistant mice. *Immunobiology*, 189(5), 419-435.

Gross, J. A., St John, T., y Allison, J. P. (1990). The murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28. Molecular cloning and cell surface expression. *J Immunol*, 144(8), 3201-3210.

Guler, M. L., Jacobson, N. G., Gubler, U., y Murphy, K. M. (1997). T cell genetic background determines maintenance of IL-12 signaling: effects on BALB/c and B10.D2 T helper cell type 1 phenotype development. *J Immunol*, 159(4), 1767-1774.

Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., Kiyono, H., Yamamoto, H., y Ishikawa, H. (2002). Identification of multiple isolated lymphoid

follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol*, 168(1), 57-64.

Harwig, S. S., Tan, L., Qu, X. D., Cho, Y., Eisenhauer, P. B., y Lehrer, R. I. (1995). Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A2. *J Clin Invest*, 95(2), 603-610.

Hasbold, J., Johnson-Leger, C., Atkins, C. J., Clark, E. A., y Klaus, G. G. (1994). Properties of mouse CD40: cellular distribution of CD40 and B cell activation by monoclonal anti-mouse CD40 antibodies. *Eur J Immunol*, 24(8), 1835-1842.

Haskins, K., Kubo, R., White, J., Pigeon, M., Kappler, J., y Marrack, P. (1983). The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. *J Exp Med*, 157(4), 1149-1169.

Hathcock, K. S., Laszlo, G., Dickler, H. B., Bradshaw, J., Linsley, P., y Hodes, R. J. (1993). Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation. *Science*, 262(5135), 905-907.

Holzmann, B., McIntyre, B. W., y Weissman, I. L. (1989). Identification of a murine Peyer's patch--specific lymphocyte homing receptor as an integrin molecule with an alpha chain homologous to human VLA-4 alpha. *Cell*, 56(1), 37-46.

Homey, B., Wang, W., Soto, H., Buchanan, M. E., Wiesenborn, A., Catron, D., Muller, A., McClanahan, T. K., Dieu-Nosjean, M. C., Orozco, R., Ruzicka, T.,

Lehmann, P., Oldham, E., y Zlotnik, A. (2000). Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC). *J Immunol*, 164(7), 3465-3470.

Homey, B., Alenius, H., Muller, A., Soto, H., Bowman, E. P., Yuan, W., McEvoy, L., Lauerma, A. I., Assmann, T., Bunemann, E., Lehto, M., Wolff, H., Yen, D., Marxhausen, H., To, W., Sedgwick, J., Ruzicka, T., Lehmann, P., y Zlotnik, A. (2002). CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med*, 8(2), 157-165.

Inaba, K., y Steinman, R. M. (1986). Accessory cell-T lymphocyte interactions. Antigen-dependent and -independent clustering. *J Exp Med*, 163(2), 247-261.

Iwasaki, A., y Kelsall, B. L. (1999). Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med*, 190(2), 229-239.

Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., y Song, S. Y. (2004). Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*, 21(4), 527-538.

Jameson, S. C., Nakajima, P. B., Brooks, J. L., Heath, W., Kanagawa, O., y Gascoigne, N. R. (1991). The T cell receptor V alpha 11 gene family. Analysis of

allelic sequence polymorphism and demonstration of J alpha region-dependent recognition by allele-specific antibodies. *J Immunol*, 147(9), 3185-3193.

Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Wurbel, M. A., Malissen, B., Marquez, G., y Agace, W. (2003). Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant. *J Exp Med*, 198(6), 963-969.

Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Pabst, O., Palmqvist, C., Marquez, G., Forster, R., y Agace, W. W. (2005). Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med*, 202(8), 1063-1073.

Kaech, S. M., Wherry, E. J., y Ahmed, R. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*, 2(4), 251-262.

Kamata, T., Nogaki, F., Fagarasan, S., Sakiyama, T., Kobayashi, I., Miyawaki, S., Ikuta, K., Muso, E., Yoshida, H., Sasayama, S., y Honjo, T. (2000). Increased frequency of surface IgA-positive plasma cells in the intestinal lamina propria and decreased IgA excretion in hyper IgA (HIGA) mice, a murine model of IgA nephropathy with hyperserum IgA. *J Immunol*, 165(3), 1387-1394.

Kantele, A., Kantele, J. M., Savilahti, E., Westerholm, M., Arvilommi, H., Lazarovits, A., Butcher, E. C., y Makela, P. H. (1997). Homing potentials of

circulating lymphocytes in humans depend on the site of activation: oral, but not parenteral, typhoid vaccination induces circulating antibody-secreting cells that all bear homing receptors directing them to the gut. *J Immunol*, 158(2), 574-579.

Kaye, J., Hsu, M. L., Sauron, M. E., Jameson, S. C., Gascoigne, N. R., y Hedrick, S. M. (1989). Selective development of CD4⁺ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature*, 341(6244), 746-749.

Kennedy, B. P., Payette, P., Mudgett, J., Vadas, P., Pruzanski, W., Kwan, M., Tang, C., Rancourt, D. E., y Cromlish, W. A. (1995). A natural disruption of the secretory group II phospholipase A2 gene in inbred mouse strains. *J Biol Chem*, 270(38), 22378-22385.

Kim, C. H., Rott, L., Kunkel, E. J., Genovese, M. C., Andrew, D. P., Wu, L., y Butcher, E. C. (2001). Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest*, 108(9), 1331-1339.

Kunkel, E. J., Campbell, J. J., Haraldsen, G., Pan, J., Boisvert, J., Roberts, A. I., Ebert, E. C., Vierra, M. A., Goodman, S. B., Genovese, M. C., Wardlaw, A. J., Greenberg, H. B., Parker, C. M., Butcher, E. C., Andrew, D. P., y Agace, W. W. (2000). Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med*, 192(5), 761-768.

Lanzavecchia, A., y Sallusto, F. (2000). From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol*, 12(1), 92-98.

Larsson, M., Fonteneau, J. F., y Bhardwaj, N. (2001). Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. *Trends Immunol*, 22(3), 141-148.

Leo, O., Foo, M., Sachs, D. H., Samelson, L. E., y Bluestone, J. A. (1987). Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(5), 1374-1378.

Levings, M. K., Gregori, S., Tresoldi, E., Cazzaniga, S., Bonini, C., y Roncarolo, M. G. (2005). Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood*, 105(3), 1162-1169.

Lugering, A., Kucharzik, T., Soler, D., Picarella, D., Hudson, J. T., 3rd, y Williams, I. R. (2003). Lymphoid precursors in intestinal cryptopatches express CCR6 and undergo dysregulated development in the absence of CCR6. *J Immunol*, 171(5), 2208-2215.

Luster, A. D. (2001). Chemokines regulate lymphocyte homing to the intestinal mucosa. *Gastroenterology*, 120(1), 291-294.

Lutz, M. B., Schnare, M., Menges, M., Rossner, S., Rollinghoff, M., Schuler, G., y Gessner, A. (2002). Differential functions of IL-4 receptor types I and II for

dendritic cell maturation and IL-12 production and their dependency on GM-CSF. *J Immunol*, 169(7), 3574-3580.

Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A. L., y Lefrancois, L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*, 291(5512), 2413-2417.

Matsue, H., Yao, J., Matsue, K., Nagasaka, A., Sugiyama, H., Aoki, R., Kitamura, M., y Shimada, S. (2006). Gap junction-mediated intercellular communication between dendritic cells (DCs) is required for effective activation of DCs. *J Immunol*, 176(1), 181-190.

McDermott, J. R., Humphreys, N. E., Forman, S. P., Donaldson, D. D., y Grecis, R. K. (2005). Intraepithelial NK cell-derived IL-13 induces intestinal pathology associated with nematode infection. *J Immunol*, 175(5), 3207-3213.

Mendoza-Naranjo, A., Saez, P. J., Johansson, C. C., Ramirez, M., Mandakovic, D., Pereda, C., Lopez, M. N., Kiessling, R., Saez, J. C., y Salazar-Onfray, F. (2007). Functional gap junctions facilitate melanoma antigen transfer and cross-presentation between human dendritic cells. *J Immunol*, 178(11), 6949-6957.

Metlay, J. P., Witmer-Pack, M. D., Agger, R., Crowley, M. T., Lawless, D., y Steinman, R. M. (1990). The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med*, 171(5), 1753-1771.

Monks, C. R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A., y Kupfer, A. (1997). Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature*, 385(6611), 83-86.

Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N., y Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, 395(6697), 82-86.

Mora, J. R., Bono, M. R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L. L., Roseblatt, M., y Von Andrian, U. H. (2003). Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature*, 424(6944), 88-93.

Mora, J. R., Cheng, G., Picarella, D., Briskin, M., Buchanan, N., y von Andrian, U. H. (2005). Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *J Exp Med*, 201(2), 303-316.

Morimoto, M., Zhao, A., Madden, K. B., Dawson, H., Finkelman, F. D., Mentink-Kane, M., Urban, J. F., Jr., Wynn, T. A., y Shea-Donohue, T. (2006). Functional importance of regional differences in localized gene expression of receptors for IL-13 in murine gut. *J Immunol*, 176(1), 491-495.

Moser, M. (2001). Regulation of Th1/Th2 development by antigen-presenting cells in vivo. *Immunobiology*, 204(5), 551-557.

Murphy, K. M., Heimberger, A. B., y Loh, D. Y. (1990). Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo. *Science*, 250(4988), 1720-1723.

Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J., y Paul, W. E. (1999). The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol*, 17, 701-738.

Noben-Trauth, N., Shultz, L. D., Brombacher, F., Urban, J. F., Jr., Gu, H., y Paul, W. E. (1997). An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4+ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(20), 10838-10843.

Onfelt, B., Nedvetzki, S., Yanagi, K., y Davis, D. M. (2004). Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol*, 173(3), 1511-1513.

Ortega, G., Robb, R. J., Shevach, E. M., y Malek, T. R. (1984). The murine IL 2 receptor. I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells. *J Immunol*, 133(4), 1970-1975.

Oviedo-Orta, E., Hoy, T., y Evans, W. H. (2000). Intercellular communication in the immune system: differential expression of connexin40 and 43, and perturbation of gap junction channel functions in peripheral blood and tonsil human lymphocyte subpopulations. *Immunology*, 99(4), 578-590.

Oviedo-Orta, E., Gasque, P., y Evans, W. H. (2001). Immunoglobulin and cytokine expression in mixed lymphocyte cultures is reduced by disruption of gap junction intercellular communication. *Faseb J*, 15(3), 768-774.

Oviedo-Orta, E., y Evans, W. H. (2002). Gap junctions and connexins: potential contributors to the immunological synapse. *J Leukoc Biol*, 72(4), 636-642.

Oviedo-Orta, E., y Howard Evans, W. (2004). Gap junctions and connexin-mediated communication in the immune system. *Biochim Biophys Acta*, 1662(1-2), 102-112.

Ozato, K., Hansen, T. H., y Sachs, D. H. (1980). Monoclonal antibodies to mouse MHC antigens. II. Antibodies to the H-2Ld antigen, the products of a third polymorphic locus of the mouse major histocompatibility complex. *J Immunol*, 125(6), 2473-2477.

Ozato, K., Mayer, N. M., y Sachs, D. H. (1982). Monoclonal antibodies to mouse major histocompatibility complex antigens. *Transplantation*, 34(3), 113-120.

Pabst, O., Ohl, L., Wendland, M., Wurbel, M. A., Kremmer, E., Malissen, B., y Forster, R. (2004). Chemokine receptor CCR9 contributes to the localization of plasma cells to the small intestine. *J Exp Med*, 199(3), 411-416.

Papadakis, K. A., Landers, C., Prehn, J., Kouroumalis, E. A., Moreno, S. T., Gutierrez-Ramos, J. C., Hodge, M. R., y Targan, S. R. (2003). CC chemokine receptor 9 expression defines a subset of peripheral blood lymphocytes with

mucosal T cell phenotype and Th1 or T-regulatory 1 cytokine profile. *J Immunol*, 171(1), 159-165.

Picker, L. J., Michie, S. A., Rott, L. S., y Butcher, E. C. (1990a). A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. *Am J Pathol*, 136(5), 1053-1068.

Picker, L. J., Terstappen, L. W., Rott, L. S., Streeter, P. R., Stein, H., y Butcher, E. C. (1990b). Differential expression of homing-associated adhesion molecules by T cell subsets in man. *J Immunol*, 145(10), 3247-3255.

Picker, L. J., Treer, J. R., Ferguson-Darnell, B., Collins, P. A., Bergstresser, P. R., y Terstappen, L. W. (1993a). Control of lymphocyte recirculation in man. II. Differential regulation of the cutaneous lymphocyte-associated antigen, a tissue-selective homing receptor for skin-homing T cells. *J Immunol*, 150(3), 1122-1136.

Picker, L. J., Treer, J. R., Ferguson-Darnell, B., Collins, P. A., Buck, D., y Terstappen, L. W. (1993b). Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. *J Immunol*, 150(3), 1105-1121.

Pulendran, B., Lingappa, J., Kennedy, M. K., Smith, J., Teepe, M., Rudensky, A., Maliszewski, C. R., y Maraskovsky, E. (1997). Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J Immunol*, 159(5), 2222-2231.

Razi-Wolf, Z., Freeman, G. J., Galvin, F., Benacerraf, B., Nadler, L., y Reiser, H. (1992). Expression and function of the murine B7 antigen, the major costimulatory molecule expressed by peritoneal exudate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(9), 4210-4214.

Ruedl, C., Rieser, C., Bock, G., Wick, G., y Wolf, H. (1996). Phenotypic and functional characterization of CD11c⁺ dendritic cell population in mouse Peyer's patches. *Eur J Immunol*, 26(8), 1801-1806.

Saez, J. C., Branes, M. C., Corvalan, L. A., Eugenin, E. A., Gonzalez, H., Martinez, A. D., y Palisson, F. (2000). Gap junctions in cells of the immune system: structure, regulation and possible functional roles. *Braz J Med Biol Res*, 33(4), 447-455.

Saez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martinez, A. D., y Beyer, E. C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev*, 83(4), 1359-1400.

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., y Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754), 708-712.

Sallusto, F., Mackay, C. R., y Lanzavecchia, A. (2000). The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol*, 18, 593-620.

Saruta, M., Yu, Q. T., Avanesyan, A., Fleshner, P. R., Targan, S. R., y Papadakis, K. A. (2007). Phenotype and effector function of CC chemokine receptor 9-expressing lymphocytes in small intestinal Crohn's disease. *J Immunol*, 178(5), 3293-3300.

Sauma, D., Michea, P., Lennon-Dumenil, A. M., Fierro, A., Morales, J., Roseblatt, M., y Bono, M. R. (2004). Interleukin-4 selectively inhibits interleukin-2 secretion by lipopolysaccharide-activated dendritic cells. *Scand J Immunol*, 59(2), 183-189.

Schaerli, P., Ebert, L., Willimann, K., Blaser, A., Roos, R. S., Loetscher, P., y Moser, B. (2004). A skin-selective homing mechanism for human immune surveillance T cells. *J Exp Med*, 199(9), 1265-1275.

Scimone, M. L., Felbinger, T. W., Mazo, I. B., Stein, J. V., Von Andrian, U. H., y Wenginger, W. (2004). CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central

memory cells, but not naive T cells, in peripheral lymph nodes. *J Exp Med*, 199(8), 1113-1120.

Seder, R. A. (1996). High-dose IL-2 and IL-15 enhance the in vitro priming of naive CD4⁺ T cells for IFN-gamma but have differential effects on priming for IL-4. *J Immunol*, 156(7), 2413-2422.

Seneviratne, S. L., Jones, L., Bailey, A. S., Samuel, R. V., Black, A. P., y Ogg, G. S. (2005). Interleukin-4 induced down-regulation of skin homing receptor expression by human viral-specific CD8 T cells may contribute to atopic risk of cutaneous infection. *Clin Exp Immunol*, 141(1), 107-115.

Shakhar, G., Lindquist, R. L., Skokos, D., Dudziak, D., Huang, J. H., Nussenzweig, M. C., y Dustin, M. L. (2005). Stable T cell-dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo. *Nat Immunol*, 6(7), 707-714.

Shi, G. P., Villadangos, J. A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K. J., Riese, R., Ploegh, H. L., y Chapman, H. A. (1999). Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity*, 10(2), 197-206.

Sigmundsdottir, H., Pan, J., Debes, G. F., Alt, C., Habtezion, A., Soler, D., y Butcher, E. C. (2007). DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program'

T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol*, 8(3), 285-293.

Stenstad, H., Ericsson, A., Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Marsal, J., Mack, M., Picarella, D., Soler, D., Marquez, G., Briskin, M., y Agace, W. W. (2006). Gut-associated lymphoid tissue-primed CD4⁺ T cells display CCR9-dependent and -independent homing to the small intestine. *Blood*, 107(9), 3447-3454.

Streeter, P. R., Berg, E. L., Rouse, B. T., Bargatze, R. F., y Butcher, E. C. (1988). A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature*, 331(6151), 41-46.

Sugamura, K., Asao, H., Kondo, M., Tanaka, N., Ishii, N., Ohbo, K., Nakamura, M., y Takeshita, T. (1996). The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol*, 14, 179-205.

Sun, C. M., Hall, J. A., Blank, R. B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J. R., y Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med*, 204(8), 1775-1785.

Vallon-Eberhard, A., Landsman, L., Yogev, N., Verrier, B., y Jung, S. (2006). Transepithelial pathogen uptake into the small intestinal lamina propria. *J Immunol*, 176(4), 2465-2469.

Varona, R., Zaballos, A., Gutierrez, J., Martin, P., Roncal, F., Albar, J. P., Ardavin, C., y Marquez, G. (1998). Molecular cloning, functional characterization and mRNA expression analysis of the murine chemokine receptor CCR6 and its specific ligand MIP-3 α . *FEBS Lett*, 440(1-2), 188-194.

Vlad, G., Cortesini, R., y Suciu-Foca, N. (2005). License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC. *J Immunol*, 174(10), 5907-5914.

von Andrian, U. H., y Mackay, C. R. (2000). T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med*, 343(14), 1020-1034.

Watkins, S. C., y Salter, R. D. (2005). Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity*, 23(3), 309-318.

Wu, L., Scollay, R., Egerton, M., Pearse, M., Spangrude, G. J., y Shortman, K. (1991). CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus. *Nature*, 349(6304), 71-74.

Yao, Y., Li, W., Kaplan, M. H., y Chang, C. H. (2005). Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. *J Exp Med*, 201(12), 1899-1903.

Yokoyama, W. M., Koning, F., Kehn, P. J., Pereira, G. M., Stingl, G., Coligan, J. E., y Shevach, E. M. (1988). Characterization of a cell surface-expressed disulfide-linked dimer involved in murine T cell activation. *J Immunol*, 141(2), 369-376.

Zaballos, A., Gutierrez, J., Varona, R., Ardavin, C., y Marquez, G. (1999). Cutting edge: identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK. *J Immunol*, 162(10), 5671-5675.

Zabel, B. A., Agace, W. W., Campbell, J. J., Heath, H. M., Parent, D., Roberts, A. I., Ebert, E. C., Kassam, N., Qin, S., Zovko, M., LaRosa, G. J., Yang, L. L., Soler, D., Butcher, E. C., Ponath, P. D., Parker, C. M., y Andrew, D. P. (1999). Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med*, 190(9), 1241-1256.

Zinselmeyer, B. H., Dempster, J., Gurney, A. M., Wokosin, D., Miller, M., Ho, H., Millington, O. R., Smith, K. M., Rush, C. M., Parker, I., Cahalan, M., Brewer, J. M., y Garside, P. (2005). In situ characterization of CD4⁺ T cell behavior in mucosal and systemic lymphoid tissues during the induction of oral priming and tolerance. *J Exp Med*, 201(11), 1815-1823.

Zlotnik, A., y Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12(2), 121-127.