

UCH-FC
DOC-BMCN
R456
C.1



**EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE MHC-II
EN CÉLULAS ENDOTELIALES COLUMNARES
PRODUCIDA POR LA ADHESIÓN DE CÉLULAS B.**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular,
Celular y Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

Lilian Isabel Reyes Sáez

Septiembre, 2007



Directores de Tesis:

Dra. María Rosa Bono Merino

Dr. Mario Rosemblatt Silber

Financiamiento

Esta tesis fue financiada por los proyectos regulares de FONDECYT # 1030875,
Beca de arancel para estudiantes de doctorado del Departamento de Biología de la
Facultad de Ciencias-Universidad de Chile,
Beca doctoral de la Fundación Ciencia para la Vida y de Millenium Institute For
Fundamental And Applied Biology (MIFAB).



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

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

LILIAN ISABEL REYES SAEZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor de Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 4 de Mayo 2007.

DIRECTORES DE TESIS

Dra. María Rosa Bono Merino

Dr. Mario Rosemblatt Silber

COMISIÓN DE EVALUACIÓN DE LA TESIS

Dr. Octavio Monasterio

Dr. Juan Carlos Sáez

Dra. Mireya Fernández



The image shows three handwritten signatures in black ink, each followed by a dotted line. To the right of the middle signature is a circular stamp that reads "FACULTAD DE CIENCIAS" at the top, "BIBLIOTECA CENTRAL" in the middle, and "UNIVERSIDAD DE CHILE" at the bottom. Below the signatures is a blue ink scribble, also followed by a dotted line.

A mis amores Guillermo, Emiliano, Valentina y Amelia.



"En el fondo, los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo que queremos durante toda la vida"

Lee Smolin

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores de tesis Dra. María Rosa Bono y Dr. Mario Roseblatt. Les agradezco enormemente por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente, por sus sabios consejos y sugerencias, por su excelente disposición, por el ejemplo de amor a la ciencia y su implacable espíritu crítico.

Agradezco a los integrantes de mi comisión de doctorado Dr. Octavio Monasterio, Dr. Juan Carlos Sáez y Dra. Mireya Fernández. También quiero agradecer al Dr. José Minguell, quien formó parte de la comisión y por motivos laborales no pudo continuar. Gracias a todos ellos por haber revisado este manuscrito con dedicación, por sus críticas constructivas, por sus consejos y excelencia académica.

Agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile con quienes compartí momentos de inmensa alegría y a veces de tristeza: Leonardo Vargas, Karina Pino, Claudio Cortés, Luis Vidal, Fernando Sepúlveda, Paula Michea, Pablo Vargas, Raúl Elgueta, Gonzalo Ureta, Jennifer Alfaro, Fabiola Osorio, Rodrigo Mora, Jaime De Calisto, Daniela Sauma, Eva Mella, Pamela Palma. Gracias por su amistad, por su alegría y por aportar de una u otra manera en esta tesis. Agradezco especialmente a Leonardo Vargas y a Valeska Simon



por su valiosa colaboración y excelente voluntad. Igualmente quisiera agradecer al Dr. Alberto Fierro por su amabilidad y por su interés en el desarrollo esta tesis.

Agradezco especialmente a Karina Pino, Fernando Sepúlveda y Valeska Simon por donar generosamente su sangre para la realización de algunos experimentos de esta tesis.

Agradezco a mis amigos Rodrigo Naves, Nicole Tischler, Daniel Pizarro y Margot Valenzuela por su apoyo incondicional y por animarme a seguir adelante en los momentos más difíciles.

Agradezco a mis padres Jorge y Lidia y a mis hermanos Tata, Tita y Anita. Agradezco especialmente a Jane Holmes. Gracias a todos por su valioso cariño y por el apoyo moral que me entregaron en todo momento.

Agradezco a Jorge, mi padre, y a Guillermo, mi esposo, por leer críticamente y corregir esta tesis.

Gracias especialmente a Guillermo Molina, por su amor, comprensión y por darme fuerzas en los momentos más difíciles.

Gracias a mis amados hijitos Emiliano, Valentina y Amelia, por ser el motor de mi existencia. Por ser tan comprensivos a pesar de todo el tiempo que les privé de mi compañía debido a los interminables experimentos.

Gracias a todos aquellos que de alguna manera aportaron en el desarrollo de esta tesis y que involuntariamente he omitido. Desde lo más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo, cariño y amistad.

Gracias a Dios y a San Marcelino Champagnan, que guían mi vida y cuidan de mí.

6. Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad.....	14
7. Complejo principal de histocompatibilidad de Clase II.....	15
8. Regulación de la expresión de MHC-II.....	17
9. Marco teórico de la hipótesis propuesta y diseño experimental.....	19
10. Hipótesis de trabajo.....	21
11. Objetivo general.....	21
12. Objetivos específicos.....	21
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
1. Anticuerpos.....	23
2. Cultivo Celular y líneas celulares.....	23
3. Clones de células T.....	26
4. Co-cultivos celulares.....	26
5. Citometría de flujo.....	27
6. Marcación metabólica e inmunoprecipitación de MHC-II.....	28
7. Análisis de RT-PCR.....	29
8. Ensayos de bloqueo de moléculas de adhesión.....	33
9. Entrecruzamiento de moléculas de adhesión.....	33
10. ELISA y bioensayos de TNF- α	34
11. Ensayos de activación de linfocitos T.....	34
12. Ensayos de apoptosis.....	35
13. Ensayos de trans migración <i>in vitro</i>	36
14. Análisis estadístico.....	37



III. RESULTADOS	38
1.1 Caracterización de las moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) expresadas en las células endoteliales inducidas por la adhesión de linfocitos B.....	38
1.2 La adhesión de linfocitos B a HUTEK induce en éstas la expresión de todos los isotipos de las moléculas MHC-II: HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ en la superficie celular.....	51
1.3 Cinética de la expresión de los RNA mensajeros de MHC-II inducida por la adhesión de linfocitos B a HUTEK.....	53
2.1 Evaluación de los posibles ligandos responsables de la expresión de MHC-II en HUTEK inducida por la adhesión de linfocitos B.....	58
2.2 Determinación de factores solubles involucrados en la expresión de MHC-II en HUTEK inducida por la adhesión de linfocitos B.....	63
3.1 Comparación de la composición estructural de las moléculas MHC-II inducida por la adhesión celular y por IFN- γ	66
3.2 Efecto de la adhesión de células B a HUTEK sobre la activación, proliferación y sobrevivencia de los linfocitos.....	68



3.3 Efecto de la adhesión de células B a HUTEc sobre	
la trans migración de los linfocitos.....	74
IV. DISCUSIÓN.....	85
1. La adhesión de linfocitos B induce la expresión de	
moléculas MHC-II en células endoteliales de amígdala	
humana por un mecanismo independiente de CIITA.....	85
2. Análisis de las moléculas de adhesión y de factores	
solubles implicados en la inducción de MHC-II en HUTEc	
mediada por la adhesión de células B.....	89
3. Las moléculas MHC-II expresadas en HUTEc por la	
adhesión de células B podrían potencialmente participar	
en la presentación antigénica.....	93
4. La adhesión de células B a HUTEc permite la trans migración	
preferencial de linfocitos T CD4 ⁺ de memoria.....	95
V. RESUMEN DE RESULTADOS.....	102
VI. ANEXOS.....	104
Anexo 1.....	104
Anexo 2.....	111
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I	Características únicas de las vénulas endoteliales columnares.....	4
Tabla II	Partidores utilizados en RT-PCR.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Cascada de múltiples etapas de la trans migración linfocitaria.....	9
Figura 2	Las células B inducen la expresión de MHC-II en la superficie celular de HUTE C.....	40
Figura 3	Sólo la co-incubación de células B induce la expresión en la superficie celular de MHC-II en HUTE C.....	43
Figura 4	La expresión de MHC-II en HUTE C inducida por la co- incubación con células B es especie específica.....	44
Figura 5	Las células B Daudi inducen la expresión de MHC-II en HUTE C obtenidas de diferentes donantes.....	45

Figura 6	La expresión de mRNA de MHC-II en HUTEc inducida por la interacción con células B es dependiente de la adhesión celular.....	46
Figura 7	Las células B inducen la expresión de MHC-II en la superficie de células endoteliales de cordón umbilical.....	47
Figura 8	La expresión de mRNA de HLA-DR inducida por la adhesión de células B es independiente de CIITA.....	50
Figura 9	La adhesión de células B induce la expresión de HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ en la superficie de HUTEc.....	52
Figura 10	Cinética de expresión del mRNA de las moléculas MHC-II inducidas por IFN- γ y por la adhesión de células B en HUTEc.....	56
Figura 11	Cinética de expresión del mRNA de las moléculas accesorias de MHC-II inducidas por la adhesión de células B y por IFN- γ en HUTEc.....	57
Figura 12	La expresión del mRNA de HLA-DRA es independiente de la activación de ICAM-1.....	61
Figura 13	La activación de la integrina α 4 y de la molécula de adhesión CD40 no está involucrada en la expresión de HLA-DR en HUTEc.....	62
Figura 14	La co-incubación de HUTEc con líneas celulares derivadas de células B no induce la secreción de IFN- γ	65
Figura 15	La composición del complejo MHC-II en HUTEc formado por la adhesión de células B es similar al formado por IFN- γ	67

Figura 16	Cinética de inducción de marcadores de activación en linfocitos T incubados sobre HUTEc estimuladas por la adhesión de células B.....	69
Figura 17	La estimulación de HUTEc por la adhesión de células B no induce la proliferación de los linfocitos T.....	72
Figura 18	La estimulación de HUTEc por la adhesión de células B protege de la apoptosis a PBMC.....	73
Figura 19	Transmigración preferencial de células T CD4 ⁺ a través de HUTEc co-incubadas con linfocitos B.....	77
Figura 20	Transmigración preferencial de linfocitos T de memoria CD4 ⁺ CD45R0 ⁺ a través de HUTEc co-incubadas con células B.....	80
Figura 21	Fenotipo de los linfocitos T activados con PHA e IL-2.....	83
Figura 22	Fenotipo de los linfocitos T transmigrados a través de HUTEc co-incubadas con células B.....	84



ABREVIATURAS

APC	Célula presentadora de antígeno
CCL	Quimioquina del tipo cisteína-cisteína
CXCL	Quimioquina del tipo cisteína-X-cisteína
CCR	Receptor de quimioquina cisteína-cisteína
CLA	Antígeno cutáneo de linfocito
CXCR	Receptor de quimioquina cisteína-X-cisteína
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DC	Célula dendrítica
ELC	Quimioquina ligando de la molécula inducida por virus Epstein Barr-1
GlyCAM-1	Molécula de adhesión celular dependiente de glicosilación 1
HEV	Vénulas endoteliales altas
HUVEC	Células endoteliales de cordón umbilical humano
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IFN-γ	Interferón gama
IL	Interleuquina
JAMs	Moléculas de adhesión de uniones intercelulares
LFA-1	Antígeno tipo 1 asociado a la función de leucocitos
mAb	Anticuerpo monoclonal
MAdCAM-1	Molécula de adhesión celular domicilina de vasculatura de mucosas 1
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad

MHC-I	Complejo principal de histocompatibilidad de clase I
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad de clase II
MNC	Células mononucleares
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
OLS	Órganos linfoides secundarios
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PCR	Reacción en cadena de DNA polimerasa
PSGL-1	Ligando de la glicoproteína de P-Selectina 1
RT-PCR	Transcripción reversa-reacción en cadena de DNA polimerasa.
SDF-1	Factor derivado de células estromales
STAT-1	Transductor de señal y activador de la transcripción 1
TCR	Receptores de antígenos de células T
Th	linfocitos T de ayuda
Th1	células T de ayuda de tipo 1
Th2	células T de ayuda de tipo 2
T_{MC}	células T de memoria centrales
T_{ME}	células T de memoria/efectoras
TNF	Factor de necrosis tumoral
UI	Unidades internacionales
VCAM	Molécula de adhesión de células vasculares
VLA-4	Antígeno muy tardío 4
$\alpha 4\beta 7$	Integrina alfa 4 beta 7

RESUMEN

Las vénulas endoteliales altas (HEV) están formadas por células endoteliales columnares especializadas en la transvasación de los linfocitos desde el torrente sanguíneo hacia el interior de los órganos linfoides secundarios (OLS) tales como, ganglios linfáticos, amígdalas y placas de Peyer.

Los linfocitos T vírgenes, a diferencia de los linfocitos de memoria y efectores, ingresan preferentemente a los OLS atravesando las HEV. El ingreso de los linfocitos a un tejido u otro depende de las moléculas de adhesión y de los receptores de quimioquinas expresadas en los linfocitos, así como de los ligandos para estas moléculas expresados en las HEV.

Sin embargo, el proceso de trans migración linfocitaria ha sido ampliamente estudiado en endotelio inflamado, ya que las células endoteliales vasculares tratadas *in vitro* con citoquinas inflamatorias como IFN- γ , expresan moléculas características de células endoteliales columnares, y por lo tanto representan un modelo de HEV.

En nuestro laboratorio desarrollamos un protocolo para obtener cultivos primarios de células endoteliales columnares derivadas de amígdalas humanas (HUTEC). Previamente, demostramos que la adhesión de linfocitos B a HUTEC induce en éstas células cambios en el patrón de fosforilación de residuos tirosina de proteínas tales como, la quinasa de adhesión focal FAK, paxilina y ERK-2. Además, hemos

descrito que la interacción de linfocitos B con HUTEK induce la activación del factor transcripcional NF- κ B en HUTEK y la producción de citoquinas quimioattractantes.

Por otra parte demostramos que la adhesión de linfocitos B a HUTEK induce la expresión de las moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) en HUTEK por un mecanismo independiente del transactivador CIITA, el cual ha sido descrito como el factor transcripcional maestro para la expresión de MHC-II. Aunque se ha descrito que algunos tipos celulares expresan MHC-II de manera independiente de CIITA, el mecanismo responsable de esta inducción y la función de las moléculas MHC-II inducidas son desconocidos.

Sobre la base de antecedentes de la literatura y de nuestros resultados preliminares, propusimos que la expresión de las moléculas MHC-II en células endoteliales de amígdala humana producida por la adhesión de linfocitos B ocurriría por un mecanismo distinto al inducido por IFN- γ y que el papel funcional de estas moléculas MHC-II sería distinto al papel fisiológico de presentación antigénica y activación linfocitaria.

Nuestros resultados muestran en primer lugar, que el mecanismo de inducción de la expresión génica de MHC-II producida por la adhesión de células B es diferente del producido por IFN- γ . La adhesión de células B induce la expresión de moléculas MHC-II en la superficie celular de una subpoblación de células HUTEK comparada a aquella obtenida después de tratamiento con IFN- γ , aunque ambos tratamientos inducen la expresión de los tres isotipos de MHC-II (HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ).

A nivel de mRNA, observamos que la expresión de mRNA de MHC-II producida por la adhesión de células B a HUTEc es más temprana y de menor duración que la inducida por IFN- γ . Además, corroboramos que la expresión de MHC-II en HUTEc producida por la adhesión de células B es independiente de la expresión de CIITA lo cual reafirma que el mecanismo de inducción de la expresión de MHC-II por la adhesión de células B es diferente del derivado por la acción de IFN- γ .

Asimismo, nuestros resultados muestran que la expresión de MHC-II tanto a nivel de mRNA como de proteína de superficie celular en HUTEc depende de la interacción directa con linfocitos B humanos y no con linfocitos T. También confirmamos en este trabajo, que la expresión en la superficie celular de MHC-II en HUTEc es dependiente del contacto celular, lo cual sugiere la participación de moléculas de adhesión. Aunque esto no descarta la acción de factores solubles, descartamos la participación de IFN- γ , TNF- α , linfotoxina α , linfotoxina β , y de las moléculas de adhesión ICAM-1, integrina $\alpha 4$ y CD40. Sólo observamos una leve inducción de la expresión de mRNA para HLA-DR después de la activación por entrecruzamiento de la integrina $\beta 1$, no logramos identificar los ligandos involucrados en la expresión de MHC-II en HUTEc,

Con el fin de aclarar el papel de las moléculas de MHC-II inducidas por la adhesión de células B, realizamos estudios funcionales de las moléculas MHC-II inducidas por la adhesión de células B a HUTEc. Determinamos que la adhesión de linfocitos B a HUTEc induce un aumento leve y transitorio en la expresión de los marcadores de activación CD69 y HLA-DR en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Sin embargo,

esta activación no fue suficiente para inducir la proliferación de los linfocitos T. No obstante, observamos que HUTEc previamente co-incubadas con células B inducen un aumento en la supervivencia de los linfocitos T. Estos resultados sugieren que la adhesión de linfocitos B a HUTEc condicionaría a los linfocitos para su posterior trans migración.

Finalmente, demostramos que la adhesión de linfocitos B a HUTEc permiten la trans migración preferencial de linfocitos T $CD4^+$ con un fenotipo de memoria ($CD45R0^+$) y no de linfocitos T activados.

El conjunto de estos resultados demuestra que la expresión de las moléculas MHC-II en células endoteliales columnares de amígdalas humanas producida por la adhesión de linfocitos B ocurre por un mecanismo diferente al inducido por $IFN-\gamma$ e independientes de CIITA, y que la función de estas moléculas sería permitir la trans migración preferencial de linfocitos T $CD4^+$ de memoria al interior de los órganos linfoides secundarios.

ABSTRACT

High endothelial venules (HEV) are composed of endothelial cells specialized in lymphocyte transvasation into secondary lymphoid organs (SLO) such as lymph nodes, tonsils and Peyer patches. Naïve T lymphocytes enter freely through HEV into SLO, while effector and memory lymphocytes enter to different peripheral tissues, depending on the adhesion molecules and chemokine receptors they express and on the ligands expressed by HEV.

The process of lymphocyte transmigration has been extensively studied in inflamed endothelia using vascular endothelial cells, which when treated with inflammatory stimuli, such as IFN- γ , express molecules constitutively expressed in HEV.

In our laboratory, we developed a protocol to obtain primary cultures of high endothelial cells derived from human tonsils (HUTEc). Previously, we demonstrated that adhesion of B lymphocytes to HUTEc induces changes in the phosphorylation pattern of tyrosine residues of HUTEc proteins such as Focal Adhesion Kinase (FAK), Paxilin and ERK-2. In addition, we demonstrated that the interaction of B lymphocytes with HUTEc induces activation of the transcriptional factor NF- κ B in HUTEc and the production of chemoattractant cytokines.

In the other hand, we demonstrated that adhesion of B lymphocytes to HUTEc induces MHC-II expression on HUTEc by a mechanism apparently independent of the transactivator CIITA, which is considered the master regulator of MHC-II expression. Although it has been described that some cell types are able to express MHC-II independently of CIITA, the mechanism responsible for this induction is yet unknown. Consistent with data from the literature and our own results, we proposed that MHC-II expression on human tonsil endothelial cells produced by B lymphocyte adhesion occurs through a mechanism different to the induction by IFN- γ and that the functional role of these MHC-II molecules might be other than antigenic presentation.

First, we determined that the induction mechanism for MHC-II expression produced by B cell adhesion is different to the one produced by IFN- γ . Although, both treatments induce the expression of all three MHC-II isotypes mRNA, namely HLA-DR, HLA-DP and HLA-DQ as well as the accessory molecules HLA-DM and the invariant chain, fewer HUTEc show in HUTEc surface expression of MHC-II after B cell adhesion is only partial when compared to IFN- γ treatment. We also observed that B cell adhesion produced a faster mRNA expression of MHC-II in HUTEc and of lower duration compared to IFN- γ induction. Moreover, we corroborated that induction of MHC-II on HUTEc mediated by B cell adhesion is independent of CIITA, confirming that the mechanism of induction differs from that of IFN- γ . On the other hand, our results show that MHC-II induction on HUTEc occurs only after direct interaction with human B lymphocytes and not after interaction with T lymphocytes. In this thesis, we also demonstrated that MHC-II expression in HUTEc is dependent on cell contact,

suggesting the participation of adhesion molecules, although it does not exclude the participation of soluble factors. Our results ruled out the participation of various cytokines such as IFN- γ , TNF- α , lymphotoxin alpha and beta, and adhesion molecules such as ICAM-1, integrin alpha 4 (part of the VLA-4 complex) and CD40. Even though, we were unable to identify the ligands involved in MHC-II expression in HUTEc, we observed a minor induction of HLA-DR mRNA after activation of integrin beta 1.

Finally, during functional studies of MHC-II molecules induced by B cell adhesion we evaluated the role of these molecules in lymphocyte activation, determining that B cell adhesion to HUTEc induces a minor and transitory increase in the expression of activation markers such as CD69 and HLA-DR in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. This activation is not sufficient to permit lymphocyte proliferation. However, we observed that HUTEc previously co-incubated with B cells induce an increase in the survival time of lymphocytes. These results suggest that the B cell adhesion to HUTEc could condition T lymphocyte for further transmigration. Finally, we demonstrated that HUTEc co-incubated with B lymphocytes do not favour the transmigration of activated lymphocytes but rather permit the preferential transmigration of CD4⁺ T lymphocytes with a memory phenotype (CD45R0⁺).

Taken together, these results demonstrate that the expression of MHC-II molecules in human tonsils high endothelial cells produced by B cell adhesion is mediated by a mechanism different from the one induced by IFN- γ and independent of CIITA, and that its function might be to permit the preferential transmigration of CD4⁺ memory T lymphocytes into secondary lymphoid organs.

I. INTRODUCCIÓN

1. Vénulas endoteliales columnares

El endotelio constituye una interfase entre la sangre y los tejidos. Se ha descrito que existe bastante heterogeneidad entre los diferentes lechos vasculares, aunque también comparten algunas características comunes (1). Las células endoteliales se clasifican según el lecho vascular, en arteriales, capilares y venulares, las cuales presentan características funcionales especializadas. Las vénulas endoteliales altas (HEV) están compuestas de una vaina perivascular prominente, una delgada lámina basal y una capa de células endoteliales columnares, y se encuentran en los órganos linfoides secundarios (OLS) tales como ganglios linfáticos, placas de Peyer y amígdalas. Las HEV regulan la adhesión y trans migración de linfocitos desde el torrente sanguíneo hacia el interior de los OLS. Esta trans migración linfocitaria depende principalmente de la expresión de determinadas moléculas de adhesión en las HEV (2, 3).

Las células endoteliales columnares tienen una forma cuboidal y están localizadas principalmente en las zonas de los OLS donde predominan las células T, tales como el área paracortical de ganglios linfáticos y las áreas interfoliculares de las placas de Peyer.

Además, las HEV se encuentran en las zonas de células B, particularmente en la periferia de los folículos de células B.

Una característica importante de las HEV es que presentan una alta capacidad de adhesión de linfocitos a sus paredes. Algunas moléculas de adhesión celular se expresan tanto en las HEV como en las células endoteliales planas, tales como CD31 e ICAM-2. En cambio, algunas moléculas de adhesión, tales como VCAM-1, ICAM-1, P-selectina y E-selectina, son expresadas selectivamente en HEV (2, 3) Tabla 1). Las HEV de ganglios linfáticos periféricos expresan sialomucinas altamente sulfatadas y glicosiladas, tales como GlyCAM-1, CD34, podocalixina, endoglicán y endomucinas (4, 5). Las HEV de placas de Peyer expresan selectivamente MadCAM-1 (6). Además, las HEV expresan constitutivamente altos niveles de quimioquinas. Actualmente, existe evidencia que las quimioquinas producidas por las HEV, o por células vecinas, tienen un papel clave en el tráfico linfocitario a ganglios linfáticos y placas de Peyer (3, 7-9).

Otra característica importante de las HEV es la presencia de uniones discontinuas entre células endoteliales, las cuales permiten la transvasación masiva de linfocitos a través de células endoteliales columnares adyacentes (2, 10).

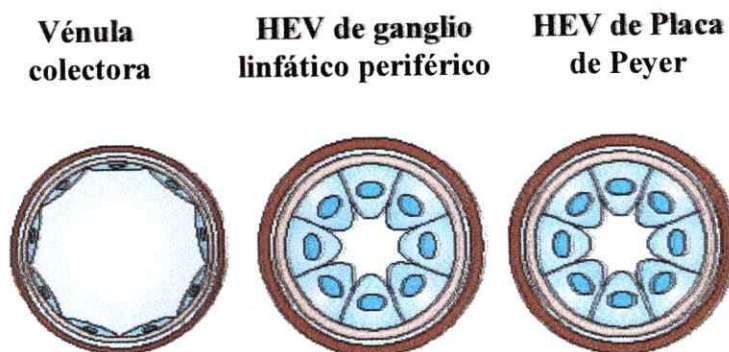
Las características particulares de las HEV se han atribuido al ambiente del tejido local en el que se encuentran. Se ha descrito que al privar de linfa aferente a los ganglios linfáticos, las células endoteliales columnares se transforman en células endoteliales planas y pierden su capacidad de permitir el tráfico linfocitario (11).

Un factor importante en el desarrollo del fenotipo de endotelio columnar, es la presencia de antígenos que provienen desde los tejidos periféricos hacia la linfa, con la posterior ausencia de estimulación antigénica y activación linfocitaria (2, 11). Además,

existen numerosos reportes que demuestran la participación de proteínas de matriz extracelular en la diferenciación *in vitro* de células endoteliales planas hacia un fenotipo HEV, tales como laminina, fibronectina o hevína (12, 13).

En humano se ha observado la presencia de vasos sanguíneos con características similares a HEV en tejidos asociados a inflamación crónica, tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad de Graves y tiroiditis de Hashimoto. Estos vasos sanguíneos presentan una morfología cuboidal, incorporan altos niveles de sulfato-S³⁵ y contienen numerosos linfocitos intramurales y lumbinales (2, 14, 15). De hecho, se ha llegado a postular que las HEV podrían tener un papel importante en la patogénesis de éstas enfermedades mediando el reclutamiento anormal de linfocitos.

Tabla 1. Características únicas de vénulas endoteliales columnares



	Vénula colectora	HEV de ganglio linfático periférico	HEV de Placa de Peyer
Endotelio	Plano	Alto y cuboidal	Alto y cuboidal
Lámina basal	delgada	delgada	delgada
Vaina perivascular	escasa	prominente	prominente
CD31	+	+	+
ICAM-2	+	+	+
ICAM-1	-/+	++	++
VE-Caderina	+	+	+
Sialomucinas			
Proteína central	+	++	+
epítoto PNAD	-	++	+
Sulfatación	-	+	+
MAdCAM-1	-	-	+
Quimioquinas (CCL19, CCL21, CXCL12 y CXCL13)	-	+	+

CCL, Ligando de quimioquina de tipo CC; CXC-L, Ligando de quimioquina de tipo CXC; VE, vascular endotelial, HEV: vénula endotelial columnar (Miyasaka y Col. 2004).

2. Migración linfocitaria

Los linfocitos están continuamente patrullando el organismo en busca de antígenos, recirculando desde la sangre a la linfa a través de los OLS y de otros tejidos. Para ingresar a los OLS, los linfocitos se adhieren selectivamente y transmigran atravesando las HEV (16, 17). La trans migración de linfocitos *in vivo* es un proceso muy eficiente y específico (18). Los linfocitos que circulan por la sangre discriminan entre el endotelio de HEV y el endotelio que delinea los tejidos no linfoides adyacentes. Aproximadamente, un 25% de los linfocitos circulantes se unen a HEV e ingresan a los OLS. Se ha estimado que ésto resulta en $1,4 \times 10^6$ linfocitos que extravasan desde la sangre hacia los ganglios linfáticos (vía HEV) por segundo (19).

La trans migración celular a través de HEV es altamente específica para los linfocitos, ya que son excluidos otros leucocitos. Inicialmente, se postuló que esta especificidad de HEV hacia los linfocitos dependía sólo de la participación de un par receptor-contra receptor (16, 17, 20). Actualmente, se sabe que la trans migración linfocitaria ocurre por un mecanismo más complejo, en el cual participan diversas moléculas de adhesión, quimioquinas y sus receptores expresados en linfocitos y HEV, en un proceso que ocurre en múltiples etapas (3, 9).

Se ha descrito que los linfocitos vírgenes (que no han encontrado a su antígeno específico) migran preferencialmente a los tejidos linfoides secundarios, proceso conocido como posicionamiento o "homing" (16, 17). El encuentro con el antígeno específico y la apropiada co-estimulación inducen la proliferación de las células T,

produciendo numerosos descendientes con idéntica especificidad antigénica. Estas células T activadas adquieren funciones efectoras y expresan receptores de posicionamiento que les permiten dirigirse a los sitios de inflamación, lo que se denomina "homing tejido-específico".

Las células T efectoras participan en la eliminación de células que presentan el antígeno en la superficie celular mediante la producción de citoquinas (linfocitos T citotóxicos, CTL), y mediante la modificación del comportamiento de otras células (linfocitos T ayudadores, Th). El "homing tejido-específico" de las células T efectoras depende de la expresión de determinadas moléculas de posicionamiento, las cuáles les permiten migrar a los tejidos inflamados donde interactúan con las células del parénquima que portan el antígeno.

Las células T efectoras pueden interactuar en los sitios de inflamación con otros leucocitos, tales como macrófagos y neutrófilos, donde participan linfocitos T de ayuda de tipo 1 (Th1), productores principalmente de IFN- γ . Además, las células T efectoras pueden interactuar con eosinófilos, células mastoideas y basófilos en reacciones alérgicas, donde participan linfocitos T de ayuda de tipo 2 (Th2), productores principalmente de IL-4. Otras células T efectoras regulan la respuesta humoral mediante el contacto con células B activadas en los órganos linfoides (16, 20).

Se ha descrito que las células T efectoras que se dirigen a la piel son preferencialmente generadas en ganglios linfáticos que drenan la piel mientras que, los ganglios linfáticos mesentéricos o placas de Peyer producen subclases de células T efectoras que se posicionan específicamente en mucosas (21). Por lo tanto, se ha

propuesto que factores solubles o células del medioambiente linfoide inducen moléculas de posicionamiento o "homing" específicos en los linfocitos.

Recientemente, se describió que las células dendríticas de placas de Peyer imprimen en linfocitos T CD8⁺ determinantes de posicionamiento a lámina propia y ganglio linfático mesentérico induciendo en las células T efectoras la expresión de los receptores de "homing" intestinal, $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 (22).

La mayoría de las células T efectoras mueren después que el antígeno se elimina, pero una pequeña fracción permanece como células T de memoria para dar protección de largo plazo. Se han caracterizado dos subgrupos diferentes de linfocitos T de memoria, unos que permanecen en los órganos linfoides secundarios llamados linfocitos T de memoria centrales (T_{MC}) y otros que patrullan los tejidos periféricos para montar una respuesta rápida si el antígeno regresa, llamados linfocitos T de memoria efectoras (T_{ME}) (23).

3. Modelo de múltiples etapas de la trans migración linfocitaria

Numerosos estudios realizados *in vivo* e *in vitro* han establecido que los linfocitos circulantes en la sangre son reclutados en los órganos linfoides secundarios y en los sitios de daño, infección e inflamación por una serie de etapas secuenciales.

La primera etapa de trans migración linfocitaria es el **movimiento rotatorio de los linfocitos por el endotelio o "rolling"**. Los determinantes moleculares que regulan

esta etapa son las selectinas expresadas en los leucocitos (L-selectina) y en las células endoteliales (E- y P-selectina) (Figura 1) (24).

La expresión de E-selectina se induce en células endoteliales planas durante la inflamación y constitutivamente en células endoteliales columnares. Los ligandos de E-selectina son oligosacáridos que contienen el grupo Sialil-LewisX y otros carbohidratos sialilados y fucosilados, tales como el Antígeno Cutáneo de Linfocito (CLA), cuya interacción es central en la migración de linfocitos a los sitios de inflamación.

P-selectina une un componente menor dentro de la estructura sialil-LewisX y también otras glicoproteínas sialiladas y fucosiladas (25). L-selectina une ligandos tipo mucina, tales como GlyCAM-1 y CD34 (26). L-selectina se expresa en los leucocitos, excepto en linfocitos T efectores y tiene un papel importante en la migración de células T vírgenes a los ganglios linfáticos periféricos.

Los enlaces mediados por las selectinas son transitorios como para permitir la detención de los linfocitos a la pared del vaso. Esto resulta en un movimiento de rotación que prolonga las interacciones desde unos pocos milisegundos a varios segundos, permitiendo el contacto entre los linfocitos y el endotelio para que ocurran los eventos posteriores de la cascada de adhesión celular (Figura 1) (27). Luego, de esta primera etapa de adhesión de los linfocitos, éstos dejan de rotar y se adhieren firmemente a HEV gracias a la participación de integrinas tales como LFA-1 (antígeno de tipo I asociado a la función de leucocitos), VLA-4 (antígeno muy tardío-4) y $\alpha 4\beta 7$. Además, se ha demostrado que las integrinas pueden mediar la ligación laxa y rotación de los linfocitos, casi tan eficientemente como las selectinas (28, 29).

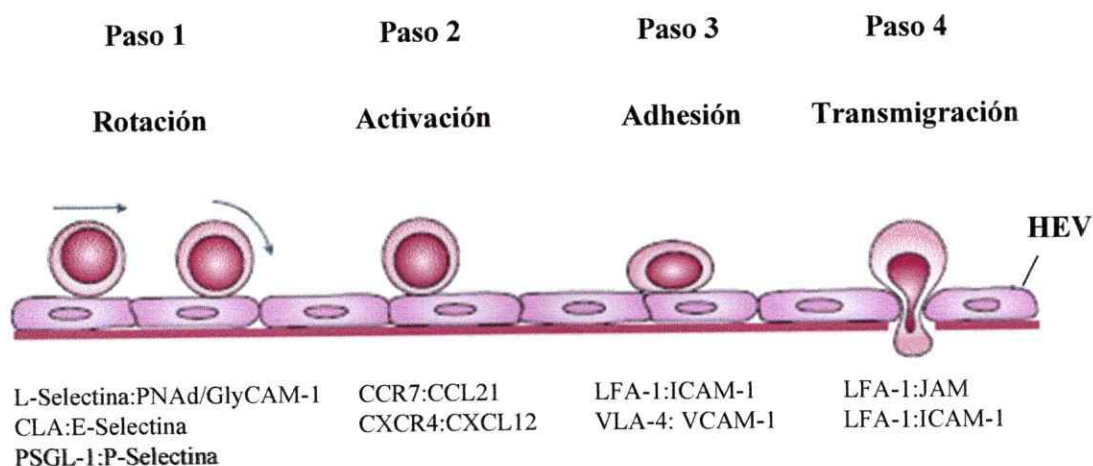


Figura 1. Cascada de múltiples etapas de la transmisión linfocitaria. La transvasación de linfocitos al interior de los órganos linfoides secundarios a través de las células endoteliales columnares (HEVs) involucra una cascada de cuatro etapas: rotación, activación, adhesión y transmisión. Los determinantes moleculares que median cada etapa son indicados en la parte inferior. La rotación es mediada principalmente por selectinas (L, E y P-selectinas). L-selectina reconoce azúcares Sialil-LewisX sulfatados, como PNAd (Adresina de Nódulo linfático). La activación es mediada por quimioquinas, tal como CCL21 que activa a receptores asociados a proteína G, como CCR7, los cuales transducen señales intracelulares que activan a las integrinas, como LFA-1. La tercera etapa de adhesión firme es gatillada por la unión de la integrina LFA-1 a su contrarreceptor ICAM-1, expresado en el endotelio. Finalmente, el linfocito transmigra al interior del órgano linfoide a través de las HEVs en un proceso mediado por proteínas de unión intercelular, tal como JAMs que interactúan con la integrinas LFA-1 y otras moléculas JAMs.

La segunda etapa de trans migración linfocitaria es **la activación de las integrinas**, que a diferencia de las selectinas (constitutivamente activas) deben ser activadas para promover una adhesión firme (Figura 1) (30).

Las integrinas son glicoproteínas heterodiméricas formadas por una subunidad α y una subunidad β y se encuentran presentes en la superficie celular de los linfocitos. Cada subunidad tiene un gran dominio extracelular, un dominio de transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático. Los dominios intracelulares de las subunidades α y β contribuyen a la organización del citoesqueleto, movilidad celular, transducción de señales y regulación de la afinidad de integrinas (30). Las moléculas responsables de la activación de las integrinas son las quimioquinas, las cuales pertenecen a una gran familia de polipéptidos secretados (8-14 KDa), relacionadas estructuralmente entre sí. Las quimioquinas están presentes constitutivamente en la superficie celular luminal de las HEV o en células estromales adyacentes. Estas se encuentran unidas a las HEV por glicosaminoglicanos similares a heparina y a otras proteínas de la matriz extracelular, manteniéndose en altas concentraciones durante largo tiempo (31). Los linfocitos expresan receptores de quimioquinas, los cuales contienen 7 dominios de transmembrana y están acoplados a proteína G, lo que lleva finalmente a la activación de las integrinas (32). La activación de las integrinas consiste en un cambio conformacional del dominio extracelular de las cadenas alfa y beta, aumentando la afinidad de las integrinas por su ligando presente en HEV (33).

La tercera etapa de la trans migración linfocitaria es la **adhesión firme** (Figura 1). Los linfocitos utilizan las integrinas VLA-4/ α 4 β 1 y LFA-1/ α L β 2 para adherirse firmemente al endotelio. Los ligandos de estas integrinas son las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1, respectivamente, ambos expresados en HEV (6, 34-37).

La **cuarta etapa de trans migración linfocitaria** es la diapedesis, en la cual los linfocitos atraviesan las HEV para ingresar a los OLS (Figura 1). Existen evidencias *in vivo* de trans migración de linfocitos a través de la pared del vaso sanguíneo de manera transcelular (38). Otros autores han reportado que la trans migración ocurre entre las uniones célula-célula (39, 40).

Los linfocitos necesitan atravesar la monocapa endotelial en la etapa final de la extravasación para migrar a través de las uniones célula-célula. Para que esto ocurra exitosamente, los linfocitos deben desestabilizar la adhesión entre células endoteliales mediante la acción de proteasas y la participación de proteínas de unión intercelular, tales como VE-caderina (caderina vascular-endotelial, CD144, caderina-5), las ocludinas y las claudinas (33, 39, 41-46).

4. Migración de los linfocitos T vírgenes

Los linfocitos proveen inmunidad adquirida a través de varias subclases de células T y células B con distintos patrones de tráfico. El tráfico de linfocitos B y linfocitos T vírgenes está restringido a tejidos linfoides secundarios; mientras que las células efectoras y de memoria migran a los sitios de inflamación.

Numerosos reportes han mostrado que los linfocitos vírgenes que migran de preferencia a los ganglios linfáticos periféricos expresan L-selectina. En cambio, los linfocitos vírgenes que migran de preferencia hacia el intestino expresan la integrina $\alpha 4\beta 7$, la cual reconoce MAdCAM-1 en vénulas de la lámina propia intestinal y de las placas de Peyer (6).

A su vez, las quimioquinas CCL19 y CCL21 son importantes en la migración de los linfocitos vírgenes a ganglios linfáticos. Alrededor del 80% de HEV expresan CCL21 en ganglios linfáticos y placas de Peyer (47). CCL19 es producido por células estromales en el área circundante a las HEV y es transportada hacia la superficie luminal de HEV (8). Se ha descrito que la cepa mutante de ratón *plt/plt*, que congénitamente carece de la expresión de CCL19 y CCL21, presenta una migración defectuosa de células T a los ganglios linfáticos. Además, la inyección subcutánea de CCL19 o CCL21 en los ratones *plt/plt* es capaz de reestablecer el tráfico de linfocitos T a los ganglios linfáticos, demostrando la importancia del receptor CCR7 de estas quimioquinas en el tráfico linfocitario (8).

Sallusto y sus colaboradores demostraron que CCR7 se expresaba en linfocitos vírgenes, linfocitos de memoria centrales y DCs, y que no se expresaba en linfocitos de memoria efectores y linfocitos activados (23). Por lo tanto, la interacción entre CCL21/CCL19 y CCR7 es crítica para gatillar la adhesión y trans migración de células T vírgenes y linfocitos de memoria central a HEV de los ganglios linfáticos.

Se ha demostrado el papel secundario de otras quimioquinas en la migración de linfocitos T vírgenes, tal como CXCL12 (factor derivado de células estromales, SDF-1) y su ligando el receptor de la quimioquina CXCL12 (CXCR4) (3, 9, 48, 49).

5. Migración de los linfocitos T de memoria/efectores y de memoria central

Durante la respuesta inmune primaria en los OLS, las células T reconocen el antígeno específico, el cual es presentado por células presentadoras de antígeno profesionales, induciendo la diferenciación de los linfocitos T a células efectoras. En estados tempranos de la activación linfocitaria, las células T expresan CCR7 de manera transitoria, aumentando el tiempo de permanencia de los linfocitos T en las zonas T de los ganglios linfáticos (50, 51).

Recientemente, se ha descrito que las células T CD4⁺ activadas *in vivo* expresan CXCR5, mientras pierden el receptor CCR7 y migran posteriormente a los folículos de células B, donde el ligando de CXCR5, la quimioquina CXCL13, se expresa constitutivamente (52).

Como se mencionó previamente, una fracción de las células T activadas por el antígeno se expande clonalmente y se diferencia a células T de memoria/efectoras (T_{ME}) y otra fracción se diferencia a células T de memoria central (T_{MC}) (23, 48). Las células T de memoria central expresan L-selectina y CCR7, al igual que los linfocitos T vírgenes, de esta manera pueden migrar a los órganos linfoides secundarios (23).

El concepto de que las células de memoria central se posicionan en tejidos linfoides secundarios, mientras que las células de memoria/efectoras y células efectoras se posicionan en tejidos no linfoides es ampliamente aceptado. No obstante, trabajos

recientes han determinado que las poblaciones de células T de memoria y efectoras *in vivo*, consisten en poblaciones más complejas y heterogéneas (50).

Las células efectoras migran al sitio de inflamación utilizando mecanismos similares, es decir, receptores de moléculas de adhesión endotelial y receptores de quimioquinas inflamatorias. Las respuestas efectoras inducidas por patógenos, ya sea mediadas por células Th1 o células Th2, obedecen a diferentes señales de tráfico celular (20). Los receptores de quimioquinas presentes en células Th1 incluyen CCR5 y CXCR3, los cuales unen quimioquinas inflamatorias (53). Los ligandos de las selectinas P y E-selectina, los cuales se expresan en el endotelio inflamado tienen un papel importante en la respuesta Th1 (54). Por otro lado, la diferenciación de los linfocitos a células Th2 disminuye la expresión de los ligandos de las selectinas e induce la expresión del receptor de quimioquina CCR3, receptor de eotaxina (55, 56).

6. Moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad

Los linfocitos T reconocen específicamente al antígeno a través del receptor de células T (TCR), sólo cuando el antígeno se encuentra asociado a proteínas especializadas expresadas en la superficie celular de células presentadoras de antígeno, o de células infectadas. Estas proteínas son codificadas por genes localizados en el cromosoma 6 humano, en el locus llamado Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC).

El MHC es un sistema poligénico que contiene genes relacionados estructural y funcionalmente y altamente polimórficos, puesto que en la población existen múltiples alelos para cada gen. El complejo MHC está dividido principalmente en dos subgrupos denominados MHC de clase I (MHC-I) y MHC de clase II (MHC-II).

Existen diferencias entre el origen y procesamiento del antígeno presentado por MHC-I y MHC-II. Se ha descrito que MHC-I une principalmente antígenos intracelulares citosólicos, los cuales son presentados a linfocitos T $CD8^+$ (CTLs) y MHC-II une principalmente antígenos extracelulares que han sido endocitados, los cuales son presentados a linfocitos T $CD4^+$ ayudadores (Th) (57).

Aunque las moléculas MHC-I y MHC-II tienen un papel fundamental en la respuesta inmune, sólo las moléculas MHC-II están relacionadas con los objetivos de esta tesis, por lo tanto sólo describiremos lo que respecta a MHC-II

7. Complejo Principal de Histocompatibilidad de Clase II

Las moléculas MHC-II presentan antígeno a los linfocitos T $CD4^+$ y juegan un papel fundamental en la inducción y regulación de la respuesta inmune adaptiva a patógenos. Así mismo permiten el mantenimiento de la tolerancia a lo propio, fenómeno importante en procesos de autoinmunidad.

Las moléculas MHC-II son glicoproteínas presentes de manera constitutiva en la superficie de células presentadoras de antígeno profesionales (APC), tales como células dendríticas (DCs), linfocitos B y macrófagos. Además, se ha descrito que las células

epiteliales tímicas y los linfocitos T humanos activados también expresan MHC-II en su superficie celular. Durante la biosíntesis de las moléculas MHC-II, éstas adquieren péptidos de 12-30 aminoácidos provenientes principalmente de proteínas endocitadas del medio extracelular, los cuales son mostradas a los linfocitos T CD4+. La interacción MHC-II-péptido con el TCR de los linfocitos T gatilla una cascada de señalización intracelular que resulta en la activación y proliferación de las células T, iniciándose una respuesta inmune inducida por la presencia de los péptidos antigénicos (58, 59).

La presentación antigénica a través de las moléculas de MHC-II ocurre en varias etapas, las cuales involucran la síntesis de las moléculas MHC-II, la generación de péptidos antigénicos por digestión proteolítica y la unión de éstos en la región correspondiente en el dímero formado por las cadenas α y β de las moléculas MHC-II.

Las cadenas α y β de HLA-DR son sintetizadas por ribosomas unidos al retículo endoplásmico, donde se ensamblan con ayuda de la chaperona denominada cadena invariante Ii, cuyo papel es mantener la conformación estable y bloquear la región de unión del péptido antigénico. Posteriormente, las moléculas MHC-II son transportadas a través de vesículas exocíticas por el aparato de Golgi, para luego fusionarse con vesículas endosomales, las cuales contienen el antígeno procesado por la acción de enzimas proteolíticas. En este compartimento ocurre la degradación de la cadena invariante Ii, y con la ayuda de la proteína HLA-DM se produce la unión del péptido antigénico a las moléculas MHC-II. Finalmente, el complejo trimérico MHC-II, cadena alfa, cadena beta y su correspondiente péptido antigénico unido, son transportados a la

superficie celular, donde el péptido es presentado a los linfocitos T CD4⁺ que expresan un TCR específico para el antígeno (59-62).

En humanos existen tres isotipos para las moléculas de MHC-II, llamadas HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ, los cuales son expresados en forma co-dominante y coordinada. Se ha postulado que la expresión de los 3 isotipos de MHC-II aumentaría las posibilidades de presentación de antígeno (58).

8. Regulación de la expresión de MHC-II.

La expresión de MHC-II es inducida principalmente por IFN- γ en la mayoría de los tipos celulares (63, 64). Las células presentadoras de antígeno como linfocitos B y DCs expresan constitutivamente MHC-II, cuya expresión es regulada principalmente durante la diferenciación de éstas células. Por otro lado, numerosos estímulos como TGF- β , IFN- α e IL-4 inhiben la expresión inducida de MHC-II por IFN- γ (65).

La expresión génica de MHC-II es regulada principalmente a nivel transcripcional a través de la presencia de secuencias conservadas denominadas caja W (o caja S), caja X, caja X2 y caja Y en los promotores de MHC-II y de genes relacionados (65).

Los factores de transcripción RFX y X2BP se unen a la caja X y NF-Y se une a la caja Y, regulando en *cis* las regiones promotoras de los genes MHC-II. Estos factores se expresan en forma constitutiva en células presentadoras de antígeno profesionales, uniéndose cooperativamente al promotor para formar un complejo de nucleoproteínas

macromolecular muy estable llamado “*enhanceosoma*-MHC-II.” Este “*enhanceosoma*” es activado en forma *trans* por el Transactivador de Clase II, CIITA, el cual es un co-activador que no tiene secuencia de unión al DNA y es el control maestro de la expresión de MHC-II (58, 65).

CIITA es inducible por citoquinas, principalmente IFN- γ , y presenta un patrón de expresión constitutivo similar al de las células que expresan constitutivamente MHC-II, tales como linfocitos B, células dendríticas, macrófagos y células epiteliales tímicas(58, 59, 63, 65).

La expresión del gen que codifica para CIITA, MHC2TA, es controlada por cuatro diferentes promotores (pI-pIV). Tres de estos promotores son altamente conservados entre genes de humano y de ratón (pI, PIII y pIV) (58).

La expresión inducible de CIITA por IFN- γ es controlada por el promotor IV del gen MHC2TA en la mayoría de los tipos celulares (66). IFN- γ actúa uniéndose a su receptor en la superficie celular, produciéndose una serie de cambios conformacionales que permiten la activación recíproca de las proteínas tirosina quinasas de la familia JAK (quinasa janus), JAK-1 y JAK-2, que se encuentran unidas al dominio citoplasmático del receptor de IFN- γ . Las proteínas JAK-1 y JAK-2 se activan al fosforilarse y transfosforilarse, luego de lo cual catalizan la fosforilación del receptor de IFN- γ , permitiendo la unión del factor transcripcional citoplasmático STAT-1 α . Finalmente, STAT-1 α es fosforilado por las quinasas JAKs y liberado al citoplasma, donde forma un homodímero capaz de translocar al núcleo para actuar como un factor transcripcional regulando la expresión de las moléculas MHC-II (67).

9. Marco teórico de la hipótesis propuesta y diseño experimental

Se ha descrito que en humanos las células endoteliales expresan constitutivamente en la superficie celular las moléculas MHC-II (68-70). La expresión de MHC-II en células endoteliales vasculares es inducida por citoquinas producidas por los linfocitos, principalmente IFN- γ , y por el contacto celular (71, 72). Se ha demostrado que además de linfocitos, el contacto con células NK alogénicas también puede inducir la expresión de MHC-II en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) por una ruta que es independiente de IFN- γ (72), e independiente de CIITA (73).

La expresión de MHC-II independiente de CIITA, se ha demostrado en ratones deficientes de CIITA ("knockout" para CIITA), los cuales presentan una expresión residual de las moléculas MHC-II en células epiteliales de la médula tímica y en órganos linfoides secundarios, la cual fue inducida mediante la inyección de linfocitos T CD4⁺ provenientes de ratones silvestres y por medio del tratamiento con polisacárido liposoluble (LPS) (74-76).

Otro trabajo demostró que el virus de la parainfluenza humana (HPIV3) fue capaz de inducir la expresión de MHC-II en células epiteliales de pulmón también de un modo independiente de IFN- γ y CIITA. Este trabajo sugirió que productos génicos virales, no identificados aún, podrían tener un papel esencial en la inducción de MHC-II (77). Actualmente se desconoce el mecanismo por el cual se induce la expresión de MHC-II independiente de CIITA.

En nuestro laboratorio hemos descrito que la adhesión de linfocitos B a células endoteliales columnares de amígdalas humanas, HUTEc, induce cambios en el patrón de fosforilación de residuos tirosina de varias proteínas importantes en la transducción de señales, tales como FAK, paxilina y ERK-2. Demostramos que estos cambios de fosforilación ocurrían después de la adhesión de linfocitos B y no de linfocitos T. La interacción entre linfocitos B y HUTEc fue funcional, ya que demostramos producción de RNA mensajero para citoquinas y quimioquinas importantes en la trans migración y reclutamiento de leucocitos, además de factores de crecimiento de células hematopoyéticas tales como IL-6, IL-8, MCP-1, M-CSF (78).

Del mismo modo, durante el desarrollo de esta tesis, demostramos la activación del factor transcripcional NF- κ B en HUTEc co-cultivadas con células B, la cual ocurre a través de un mecanismo dependiente de factores solubles. Aunque la activación de NF- κ B en HUTEc es independiente de la adhesión celular, esto ocurre por un mecanismo dependiente de la presencia de ambos tipos celulares (79).

De interés para el desarrollo de esta tesis, es la observación que después de la adhesión de linfocitos B a HUTEc se induce la expresión de las moléculas MHC-II en HUTEc, aparentemente por un mecanismo independiente de CIITA. En base a los antecedentes presentados y a nuestros resultados preliminares, nos planteamos como objetivo general de la presente tesis: **“estudiar el mecanismo por el cual la adhesión de linfocitos B induce la expresión de las moléculas MHC-II en células endoteliales de amígdala humana y el papel fisiológico que cumplen éstas moléculas.”**

10. Hipótesis de trabajo

La expresión de las moléculas MHC-II, inducida por la adhesión de linfocitos B a células endoteliales de amígdala humana, ocurre por un mecanismo independiente de IFN- γ . El papel funcional de estas moléculas MHC-II estaría relacionado con la trans migración de determinadas poblaciones celulares.

11. Objetivo General

Estudiar el mecanismo por el cual la adhesión de linfocitos B induce la expresión de las moléculas MHC-II en células endoteliales de amígdalas humanas y estudiar el posible papel fisiológico de este fenómeno.

12. Objetivos específicos

1. Caracterizar la expresión de MHC-II inducida por la adhesión de linfocitos B en HUTEc.

1.1 Caracterizar la expresión de las moléculas MHC-II en HUTEc producida por la co-incubación con líneas celulares B linfoblastoides de fenotipos diferentes.

1.2 Determinar si la adhesión de linfocitos B a HUTEc induce la expresión de los 3 isotipos de moléculas MHC-II (HLA-DR, DP y DQ).

1.3 Determinar la cinética de inducción de la expresión de las moléculas MHC-II inducidas por la adhesión de linfocitos B. Estos resultados se compararán con la cinética de expresión de MHC-II inducida por IFN- γ en HUTEc.

2. Estudiar los factores solubles y las moléculas de adhesión involucradas en la inducción de la expresión de las moléculas MHC-II mediada por la adhesión de linfocitos B.

2.1 Identificar los ligandos responsables de la inducción de la expresión de MHC-II en HUTEc por la adhesión de linfocitos B.

2.2 Evaluar la presencia de factores solubles inductores de MHC-II en los cultivos de HUTEc y linfocitos B.

3. Estudiar la funcionalidad de las moléculas MHC-II inducidas por la adhesión de linfocitos B en HUTEc y el posible papel en la migración linfocitaria.

3.1 Comparar la composición proteica del complejo MHC-II inducido por la adhesión celular con aquel inducido por IFN- γ .

3.2 Estudiar el efecto de la adhesión de células B sobre HUTEc en la activación, proliferación y supervivencia de los linfocitos.

3.3 Estudiar el efecto de la adhesión de células B en HUTEc sobre la transmigración de sub-poblaciones celulares.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. *Anticuerpos*

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-integrina β 1 humana LIA1/2 (IgG1), anti-integrina β 2 humana LIA3/2 (IgG1), anti-integrina α 4 HP2/1 (IgG1) donados por el Dr. Sánchez Madrid (Servicio de Inmunología, Hospital de La Princesa, Madrid, España); anti-integrina β 1 humana TS2/16.2.1 (IgG1) y anti-CD40 humano G28-5 (IgG1) obtenidos de ATCC (Rockville, MD); anti-CD3-FITC, CD3-PerCP, CD16-PE/CD56-PE, CD20-FITC, CD45RA-FITC, CD45R0-FITC, CD4-PerCP, CD4-FITC, CD8-PerCP, CD25-PE y CD69-PE; anti-HLA-DR-PE (clon L-243), anti-HLA-DP (B7/21), provenientes de Becton Dickinson; y el anticuerpo policlonal de conejo anti HLA-DQ, donado por Dra. Ana M. Lennon-Dumenil (36).

2. *Cultivo celular y líneas celulares*

Las células endoteliales columnares derivadas de amígdalas humanas (HUTEC) se obtuvieron de amígdalas humanas y se caracterizaron como se describió previamente (80). En breve, amígdalas humanas obtenidas después de amigdalectomía de rutina, se

lavaron en forma secuencial en PBS estéril, etanol 70% y PBS estéril. Después de retirar el epitelio externo, las amígdalas se cortaron en trozos pequeños y se digirieron con 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Colagenasa XI y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNAsa tipo I (Sigma, St Louis, MO) durante 1 hora a temperatura ambiente. La suspensión celular se sedimentó a 1 x g durante 5 minutos y el sobrenadante se centrifugó a 250 x g durante 10 minutos. Las células colectadas se lavaron 2 veces en medio RPMI 1640 (Gibco/BRL, Grand Island, N. Y.) y se plaquearon a una densidad de $2 \times 10^6/\text{cm}^2$ en RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomycin y 10% FCS (Gibco/BRL, Grand Island, N. Y.). Después de 2-3 semanas de cultivo y reemplazando la mitad del medio de cultivo, las células endoteliales adherentes de los cultivos confluentes se soltaron con 0,25% de tripsina/EDTA en PBS y se cultivaron en RPMI 1640 conteniendo 10% FCS o se mantuvieron congeladas en N_2 líquido. Las HUTEK fueron caracterizadas mediante estudios de citometría de flujo, presentando los marcadores de células endoteliales LVAP-2 y DARC (1, 78, 80).

Las líneas celulares B humanas Ramos y Daudi, y las líneas celulares T humanas MolT-4 y Jurkat se obtuvieron de la ATCC. En algunos experimentos se utilizó la línea celular B TBCL-10, obtenida en nuestro laboratorio a partir de la transformación con el virus Epstein Barr (EBV) de células B de amígdalas humanas (78). Todas estas líneas celulares se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FCS, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/ml de Penicilina y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de sangre venosa heparinizada de dadores voluntarios sanos, después de centrifugación en gradiente

de densidad Ficoll-Hypaque. Las células B de sangre periférica se obtuvieron a partir de PBMC a las cuales se les eliminó las células T mediante lisis por complemento con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 humano OKT-3, mientras que las células T se obtuvieron después de lisis por complemento de las células B, con el anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR humano L112. La lisis por complemento se realizó incubando con 10 µg/mL del anticuerpo correspondiente durante 30 minutos a 4°C, luego se lavaron las células con RPMI 1640 y se incubaron con una dilución adecuada de complemento durante 1 hora a 37°C. Los linfocitos T o B de amígdalas se obtuvieron mediante este mismo procedimiento.

Los cultivos primarios de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) se obtuvieron según protocolos estándares (80). HUVEC se aislaron de venas de cordón umbilical humano, mediante la digestión proteolítica con colagenasa tipo IV (Gibco) durante 20 minutos a 37 °C en un baño termorregulado. La solución celular se recuperó en un tubo de 50 mL conteniendo medio M-199 más 20% FCS y 50 µg/mL de heparina. Después de lavar las células mediante centrifugación a 1.600 rpm por 10 minutos, se agregó 10 mL de medio de cultivo M199 más 10% FCS, penicilina/estreptomicina, 50 µg/mL de heparina, 2 µg/mL anfotericina B, 50 µg/mL suplemento de crecimiento de célula endotelial (ECGS, Calbiochem). Se sembraron 10 mL de la suspensión celular en una placa de cultivo p-100 cubierta con 2% de gelatina y en una atmósfera 5% CO₂ y a 37°C. A las 24 horas de cultivo, se reemplazó el medio y se repitió esta operación cada 7 días. Al llegar a confluencia, las HUVECs se soltaron de la

placa con 0,25% de tripsina/EDTA en PBS y se recultivaron por 4-5 pasajes en medio de cultivo hasta su uso posterior.

3. Clones de células T

Los clones de células T se obtuvieron como se describió previamente (81). Brevemente, los clones dependientes de IL-2 se prepararon a partir de PBMC aislados por gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma-Diagnostics, St. Louis), luego se activaron con fitohemaglutinina (PHA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; SIGMA, St. Louis) durante 3 días. Las células se lavaron y recultivaron a una densidad de $10^6/\text{mL}$ en medio RPMI 1640 más 10% FCS conteniendo 2 nM de IL-2 recombinante humana (BD/PharMingen, San Diego, CA). Los clones de células T se incubaron por 1-4 semanas, luego se caracterizaron por citometría de flujo y se usaron para ensayos de trans migración *in vitro*. A estas células se les denominó "células T activadas".

4. Co-cultivos celulares

HUTEC de pasajes 3-5 se crecieron a confluencia en placas de cultivo de 60 mm (0.8×10^6 células/placa) y se co-incubaron con 3×10^6 células derivadas de diferentes líneas celulares linfoides, fracción de células B derivadas de PBMC, fracción de células T de PBMC, linfocitos B y T derivadas de amígdalas o de líneas celulares, previamente lavados y resuspendidos en RPMI 1640 suplementado con 10% FCS. Para la

determinación de la razón celular óptima de células linfoides versus HUTEK, se utilizaron las siguientes razones: 1:1, 1:4, 1:6, 1:10 y 1:25 y se determinó que la razón 1:4 producía el mayor porcentaje de HUTEK viables y positivas para MHC-II después del tiempo de co-incubación. Los co-cultivos se realizaron a 37°C por diferentes períodos de tiempo. Para los experimentos de RT-PCR se eliminaron las células linfoides mediante lisis por complemento antes de extraer el RNA total de HUTEK.

5. Citometría de flujo

Esta técnica permite un análisis multiparamétrico de mezclas complejas de células sin necesidad de proceder a una separación física. Esto es especialmente importante en el caso de los co-cultivos de células endoteliales con células linfoides, donde nuestro objetivo fue analizar el efecto de linfocitos B sobre las células endoteliales. Por lo tanto, para realizar la inmunofluorescencia primero se eliminaron las células B y luego las células endoteliales se tripsinizaron y se recuperaron en medio RPMI 1640 conteniendo 10% FCS. Enseguida, se lavaron en medio RPMI más 2% FCS por centrifugación a 450 x g durante 4 minutos a 4°C. Posteriormente, las células se marcaron directamente con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-HLA-DR conjugado con PE (clon L-243, Becton Dickinson), anti-HLA-DP puro (B7/21, Becton Dickinson) o con el anticuerpo policlonal de conejo anti-HLA-DQ (donado por Dra. Ana M. Lennon-Dumenil).

Para identificar a las HUTEc dentro de la mezcla celular se marcó primeramente con el anticuerpo monoclonal anti-integrina $\alpha 5$ (Pharmingen) seguido por la marcación con un anticuerpo secundario conjugado con FITC (DAKO); o se marcó directamente con el anticuerpo anti-CD13 conjugado con FITC (Pharmingen). Como controles de isotipo se utilizaron los anticuerpos apropiados para cada experimento. Las células marcadas se adquirieron en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson) y los análisis se realizaron con el programa CellQuest (Becton Dickinson) o Win MDI (disponible en línea).

6. Marcación metabólica e inmunoprecipitación de MHC-II

Las células HUTEc se co-incubaron con células linfoides B o con 150 UI/mL de IFN- γ por 96 horas, como control positivo de la inducción de la expresión de MHC-II. Luego de lavar para eliminar las células linfoides, se incubó durante 45 minutos a 37°C con medio libre de metionina-cisteína conteniendo 10% FCS. Enseguida, se incubó con 1 mCi de metionina-cisteína-S³⁵ por 30 minutos a 37°C. Después, se aspiró el sobrenadante y se lavó con medio completo, para disgregar a las células adheridas mediante tripsinización.

La suspensión celular de HUTEc se marcó con el mAb de ratón anti-integrina $\alpha 5$ humana (Becton Dickinson), durante 30 minutos a 4°C y se seleccionaron positivamente las células endoteliales, mediante el uso microesferas acopladas a un anticuerpo anti-Ig de ratón (MACS, Miltenyi Biotec). Después, las HUTEc purificadas se lisaron durante

30 minutos en hielo con tampón de lisis conteniendo 5% NP-40, 50 mM Tris/Cl pH 7,4; 5 mM MgCl₂ e inhibidores de proteasas. Luego, se realizó la inmunoprecipitación de MHC-II, con una primera etapa de eliminación de la unión inespecífica consistente en la incubación durante una hora a 4°C del extracto proteico con 5 µL de suero normal de ratón, 5 µL de suero normal de conejo, seguido por la incubación por una hora con 50 µL de solución 50 % proteína G-sefarosa (Pharmacia). Luego, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm por 3 minutos, se eliminó el precipitado y el sobrenadante se incubó durante 3 horas con 5 µL de líquido ascítico del anticuerpo anti-HLA-DR, L112. Enseguida, se agregó 50 µL de la solución 50 % proteína G-sefarosa y se incubó por una hora a 4°C. Después de centrifugar el inmunoprecipitado a 12.000 rpm, se lavó 4 veces con tampón de lisis más 150 mM NaCl. Finalmente, se agregó 30 µL de tampón de carga y se calentó durante 5 minutos a 100°C, se centrifugó a 12.000 rpm y el sobrenadante obtenido se cargó en un gel al 12% de poliacrilamida-SDS. Posteriormente, el gel se secó, se expuso a una placa sensible a radioactividad (BioRad) y se analizó en un PhosphoImager (BioRad).

7. Análisis de RT-PCR

El RNA total de las células HUTEc, líneas celulares B y T, de linfocitos T y B de sangre periférica (PBMC) y de linfocitos de amígdalas se obtuvo mediante el uso de TRIZOL (Invitrogen/Life technologies). En los experimentos de co-cultivo celular entre HUTEc y células linfoides T y B, los linfocitos se eliminaron mediante tres lavados con

PBS, seguido por lisis por complemento incubando con el mAb anti-CD45 (GAP8.3) durante 30 minutos a 4°C. Después de lavar con RPMI 1640 sin suero, se incubó durante 1 hora a 37°C con suero normal de conejo diluido 1/8 en medio RPMI 1640 más 10% FCS. Enseguida, las HUTEc se lavaron con PBS hasta observar al microscopio la ausencia de linfocitos y se procedió a la extracción de RNA con TRIZOL según las instrucciones del proveedor.

En los experimentos de co-cultivos celulares entre HUTEc y células linfoides B, se analizó la expresión del mRNA de CD19 como control de la presencia de contaminación de RNA de células B en las muestras de RNA de HUTEc. Para controlar la cantidad de RNA depositada en los geles de agarosa (control de carga) se determinó el mRNA de β actina.

La síntesis de cDNA se realizó por transcripción reversa incubando 5 μ g de RNA, 500 ng oligo dT (18 dT, Biosource), 200 U MMLV-RT (Promega), 24 U RNAsin (Promega) y 0,5 mM dNTP (Gibco-BRL) diluido en tampón MMLV-RT a un volumen final de 25 μ L.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (MJ Research) en una mezcla de reacción conteniendo 2 μ L del cDNA resultante, 200 ng del partidor sentido y del antisentido, 200 μ M dNTP, 1.5 mM MgCl₂ (GIBCO) y 5 U Taq DNA polimerasa (GIBCO/BRL) en buffer AmpliTaq a un volumen final de 25 μ L.

Los partidores se diseñaron de manera de cruzar intrones para descartar la contaminación por DNA genómico. El protocolo de amplificación del mRNA para β -actina fue el siguiente: un ciclo de 5 minutos a 95° C; 20 ciclos de 30 s a 94° C, 45 s a

58° C y 90 s a 72° C. Para amplificar los mRNA de los otros genes se usó un ciclo inicial de 5 minutos a 95° C seguido de 25-30 ciclos de 1 minuto a 94° C, 90 seg a 60° C y 90 seg a 72° C. Todos los programas se terminaron con una extensión final de 10 minutos a 72° C. Para el análisis de la expresión de los genes de interés, se determinaron las condiciones óptimas de PCR, de manera de amplificar en la fase exponencial de la reacción. Para visualizar el producto de amplificación se cargaron 10 µL de la mezcla en un gel de agarosa al 1,4% y el DNA se marcó con bromuro de etidio y se fotografió con una cámara Kodack Digital Science DC120. Los partidores utilizados se muestran en la tabla 2. En los ensayos de cinética de la expresión de los mRNA de HLA y de las moléculas accesorias se calcularon los niveles relativos de expresión de los mRNA mediante un análisis densitométrico, en el cual se normalizó con respecto a la expresión del mRNA de β -actina. La normalización se realizó mediante la razón de la medida densitométrica correspondiente a la banda de mRNA de cada isotipo de MHC-II versus la medida densitométrica de la banda de mRNA para β -actina en el tiempo indicado. Luego, al valor máximo de expresión obtenido se le asignó el valor de 1 y los demás valores se calcularon con respecto a este valor

TABLA 2. Partidores utilizados en RT-PCR.

Partidor	Secuencia
β -actina sentido	5'-AAATCGTGCGTGACATTAAGG-3'
β -actina antisentido	5'-CCGATCCACACGGAGTACTT-3'
CIITA sentido	5'GGGAAAGCTTGTGCAGACTC-3'
CIITA antisentido	5'-CAGCGTGGTTAGTGTCTCA-3'
CD19 sentido	5'-CCCCGCTTAAACCCTTCTTA-3'
CD19 antisentido	5'-AAGGGAACACAGGCAGAAGA-3'
HLA-DRA sentido	5'-CTGACTCCCAAAGAGCGCCC-3'
HLA-DRA antisentido	5'-TGCTTGAGAAGAGGCTCATCC-3'
HLA-DPA sentido	5'-AGCTGGTCACTGAGGGTGTC-3'
HLA-DPA antisentido	5'-TGAGACAACGGAGACTGTGC-3'
HLA-DQA sentido	5': TGGGCACTCAGTCACAGAAG-3'
HLA-DQA antisentido	5'-AACTAGGGGTTCGGCAGAAAG-3'
Ii sentido	5'-TGTGACC AAGCAGGATCTGG-3'
Ii antisentido	5'-AACTAGGGGTTCGGCAGAAAG-3'
HLA-DMA sentido	5'-TCACGAAATTGACCGCTACA-3'
HLA-DMA antisentido	5'-TCACGAAATTGACCGCTACA-3'

8. Ensayos de bloqueo de moléculas de adhesión

Los ensayos de bloqueo de la adhesión entre HUTEK y linfocitos B Ramos se realizaron con el anticuerpo monoclonal anti-integrina $\alpha 4$ (HP2/1, anti-VLA-4) bloqueador de un 80-90% de la adhesión de las células linfoides B Ramos a HUTEK (80).

Las células Ramos y HUTEK se incubaron por separado con el mAb HP2/1 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 30 minutos a 4°C . Luego de lavar las células con medio RPMI, se cocubaron durante 3-6 horas a 37°C las células HUTEK con las células B Ramos. Posteriormente, las HUTEK se lavaron con PBS para retirar las células B Ramos no adheridas y se realizó la lisis por complemento con el anticuerpo GAP8.3 (anti-CD45) para eliminar las células B Ramos adheridas. Finalmente, las HUTEK se procesaron para el análisis por RT-PCR.

9. Entrecruzamiento de moléculas de adhesión

HUTEK crecidas a confluencia, se incubaron durante 30 minutos a 4°C con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo monoclonal anti-integrina $\beta 1$ (LIA 1/2), anti-integrina $\alpha 4$ (HP2/1); anti-CD40 (G28-5) o anti- ICAM-1 (Immunotech). El anticuerpo anti-integrina $\beta 2$ (LIA3/2) se utilizó como control negativo del entrecruzamiento de las moléculas de adhesión, ya que HUTEK no presentan esta molécula en la superficie celular. Enseguida, las HUTEK se lavaron con medio RPMI 1640 para eliminar el exceso de

anticuerpo primario y se incubó con un anticuerpo secundario anti-Ig de ratón, durante 3 horas a 37°C. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante tres lavados con PBS y se procedió a la extracción de RNA con TRIZOL para el análisis de expresión de mRNA por RT-PCR.

10. ELISA y bioensayos de TNF- α

Los ensayos de ELISA se realizaron utilizando un kit específico para detectar IFN- γ siguiendo las instrucciones del fabricante (Pharmingen). Los bioensayos de TNF- α se realizaron según está descrito (78, 82).

11. Ensayos de activación de linfocitos

HUTEC se crecieron a confluencia en placas de cultivo de 24 pocillos. Después se agregó 1×10^6 células B Ramos o Daudi y se co-cultivaron durante 96 horas para inducir la expresión de MHC-II en HUTEC (verificado mediante citometría de flujo). Luego, se agregó 1×10^6 de linfocitos y se incubó durante 24-72 horas a 37°C.

Los linfocitos se obtuvieron a partir de PBMC aisladas por gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Diagnostics, St Louis) después de la eliminación de las células adherentes (principalmente monocitos) mediante adhesión en placa durante 1 hora a 37°C. Después de la co-incubación, los linfocitos se recuperaron, se contaron y se

caracterizaron fenotípicamente por citometría de flujo para los marcadores de activación CD25, CD69 y HLA-DR y los marcadores de subclase de linfocitos CD4 y CD8.

12. Ensayos de apoptosis

HUTEC se crecieron a confluencia en placas de cultivo de 24 pocillos. Después se agregó 1×10^6 células B Ramos o Daudi y se co-cultivaron durante 96 horas para inducir la expresión de MHC-II en HUTEC (verificado por citometría de flujo). Luego, se agregó 1×10^6 PBMC y se incubó durante 24, 48, 72 y 96 horas a 37°C .

Los linfocitos T se obtuvieron como se describió antes. Después de la co-incubación, las células linfoides adherentes y no adherentes se recuperaron y se contaron con azul de tripán para determinar la viabilidad celular. Enseguida, las células linfoides se marcaron para medir apoptosis mediante la técnica de TUNEL utilizando el kit APO-Direct según las indicaciones del fabricante (Becton-Dickinson). En breve, las células se fijaron con 0,1% paraformaldehído en PBS durante 15 minutos en hielo. Después de lavar dos veces por centrifugación con PBS, las células se resuspendieron en 70% etanol y se dejaron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, las células se centrifugaron y se lavaron dos veces con 1 mL de solución de lavado. Enseguida, las células se marcaron con 50 μL de solución de tinción conteniendo dUTP conjugado con FITC y la enzima TdT (terminal deoxinucleotidil transferasa) y se incubaron por 60 minutos a 37°C . Después, las células se lavaron con 1 mL de tampón de lavado por centrifugación. Las células marcadas, se

resuspendieron en PBS, se adquirieron y analizaron por citometría de flujo (Becton Dickinson).

13. Ensayos de trans migración in vitro.

Las HUTEc se crecieron a confluencia en el pocillo superior de placas de cultivo "transwell" de 35 mm (Costar, tamaño de poro de 3 μm). Después, se agregaron 3×10^6 células B Ramos o Daudi y se co-cultivaron durante 96 horas para inducir la expresión de MHC-II en HUTEc. Luego, las células B se retiraron o se mantuvieron durante los experimentos de trans migración, se agregaron 3×10^6 PBMC y se co-incubaron a 37°C durante 3 y 18 horas.

Las células mononucleares se aislaron por gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Diagnostics, St Louis) y se eliminaron las células adherentes (principalmente monocitos) mediante adhesión en placa durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, las células trans migradas se recuperaron desde el compartimiento inferior, se contaron y se caracterizaron fenotípicamente mediante inmunofluorescencia por citometría de flujo.

Para la caracterización fenotípica se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD3-FITC, anti-CD3-PerCP, anti-CD16-PE/CD56-PE, anti-CD20-FITC, anti-CD45RA-FITC, anti-CD45R0-FITC, anti-CD4-PerCP, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PerCP, anti-CD25-PE y anti-CD69-PE (todos Becton-Dickinson). Se realizaron cuatro ensayos independientes con sangre obtenida de dadores sanos diferentes.

14. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los ensayos de activación y transmigración se presentan como el promedio \pm media del error estándar (SEM) para cada grupo. Para el análisis estadístico, se utilizó el t-test de Student de análisis de varianza "One-way" (ANOVA), con corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa computacional GraphPad Prism. Los niveles mínimos de significancia estadística utilizados fueron $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) y $P < 0.001$ (***)

III. RESULTADOS

1.1 Caracterización de las moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) expresadas en las células endoteliales inducidas por la adhesión de linfocitos B.

En primer lugar, se determinó la cinética de expresión de las moléculas MHC-II (HLA-DR) en HUTEK incubadas por 48-96 horas con la línea celular B Daudi. La presencia de HLA-DR en la superficie de HUTEK fue determinada mediante inmunofluorescencia y analizada por citometría de flujo. Para diferenciar la expresión de MHC-II proveniente de los linfocitos B de aquella proveniente de HUTEK se marcaron las células con un anticuerpo monoclonal contra la integrina alfa-5, la cual es selectivamente expresada en las células endoteliales.

Como control positivo de inducción de MHC-II en HUTEK, estas células se trataron durante 48 y 72 horas con 150 U/mL de IFN- γ . En la figura 2, se observa que a las 96 horas de co-incubación de HUTEK con las células B, es mayor el porcentaje de células HUTEK que expresan MHC-II. Además, comparado con el tratamiento con IFN-

γ , la expresión de MHC-II en HUTEc producida por la adhesión celular fue parcial, detectándose sólo 10-30% células HUTEc- MHC-II positivas (Figura 2).

Para determinar si la expresión de HLA-DR en HUTEc ocurre de manera independiente del tipo de linfocito B, se coincubó con diferentes líneas celulares B, algunas de ellas derivadas de amígdala humana (TBCL-10). Todas las líneas celulares B (Ramos, Daudi y TBCL-10) indujeron la expresión de HLA-DR en la superficie de HUTEc (Figura 3).

En conjunto, estos resultados demuestran que la expresión de HLA-DR en HUTEc inducida por la adhesión de células B tiene una cinética de expresión en la superficie celular diferente a la inducida por IFN- γ e independiente del tipo de linfocito B utilizado en la co-incubación.

En la Figura 3 se muestra que el porcentaje de células HUTEc en la cual se expresa HLA-DR después de la incubación con los distintos tipos de células B es variable. Este fenómeno no ocurre cuando las células HUTEc son incubadas con las líneas celulares T Jurkat y Molt-4, lo cual sugiere que la expresión de las moléculas MHC-II en HUTEc es inducida sólo por la interacción de linfocitos B (Figuras 3 y 4).

Por otra parte, se investigó si la inducción de la expresión de MHC-II en HUTEc depende de la especie de la cual provienen los linfocitos B. Para esto, se incubó durante 96 horas HUTEc con la línea celular B derivada de ratón A-20. La figura 4 muestra que A20 no induce la expresión de moléculas MHC-II humanas en HUTEc. Este resultado sugiere que la expresión de MHC-II en HUTEc producida por la interacción de células B es especie-específica.

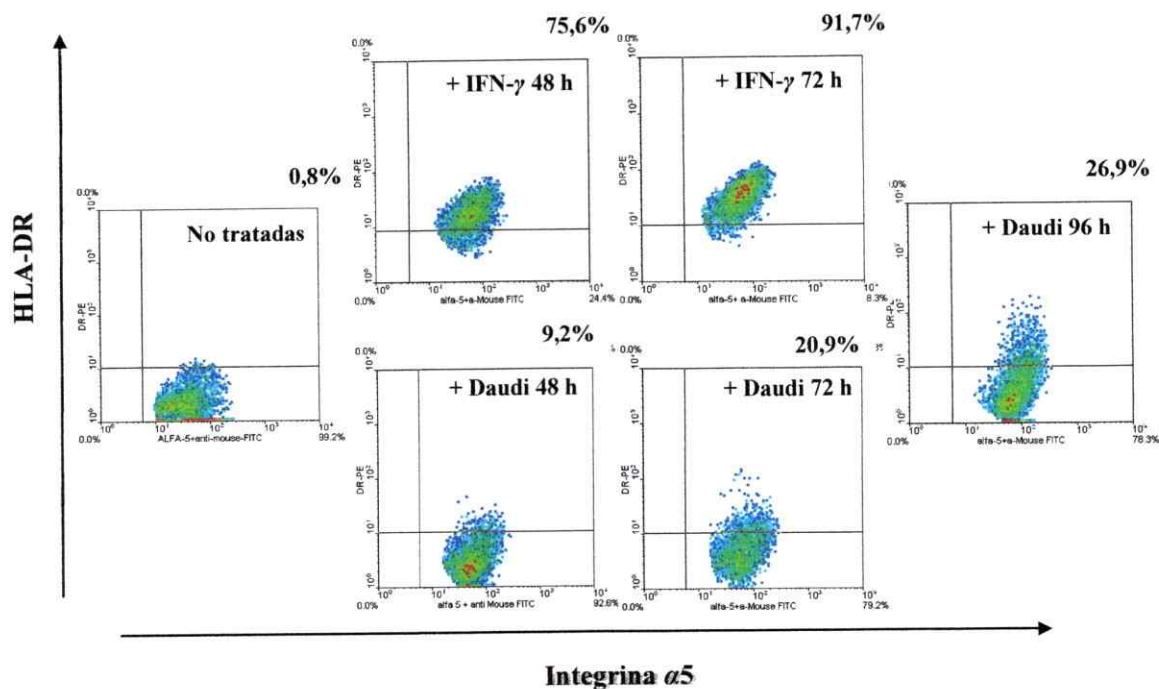


Figura 2. Las células B inducen la expresión de MHC-II en la superficie celular de HUVEC. Las células endoteliales HUVEC se crecieron a confluencia y se incubaron por 48, 72 y 96 horas con la línea celular B Daudi o con IFN- γ durante 48 y 72 horas (como control positivo de inducción de MHC-II). Los gráficos de densidad muestran el doble marcaje de HUVEC con los anticuerpos anti-integrina alfa-5 versus anti-HLA-DR. HUVEC se analizaron en una región correspondiente a las células alfa-5 positivas. Los porcentajes de HUVEC HLA-DR⁺ se indican en el cuadrante superior derecho.

Debido a que la preparación de células endoteliales columnares proviene de pacientes con algún tipo de patología que hace necesaria su extirpación, evaluamos si la expresión de MHC-II en HUTEK ocurre en cultivos primarios derivados de cuatro donantes diferentes. En todos los casos se observó la presencia de moléculas MHC-II después de la co-incubación con células Daudi, a pesar de observar distintos porcentajes de células endoteliales HLA-DR⁺ (Figura 5). Por lo tanto, el fenómeno observado es general e independiente del donante del cual deriva el cultivo primario endotelial.

Para evaluar si la expresión de MHC-II en HUTEK depende del contacto celular, utilizamos el anticuerpo bloqueador de la adhesión HP2/1 (anti-integrina $\alpha 4$ de VLA-4), el cual inhibe la adhesión de Ramos a HUTEK en un 80-90% (80). La presencia del anticuerpo bloqueador en el co-cultivo de Ramos y HUTEK redujo los niveles de mRNA de HLA-DRA en HUTEK (Figura 6). Estos resultados se obtuvieron mediante RT-PCR en co-cultivos de 3 horas debido a la dificultad para mantener bloqueada la adhesión de los linfocitos B durante tiempos muy prolongados. Este resultado nos sugiere que la presencia de MHC-II en HUTEK es dependiente de la adhesión de células B, por lo tanto en este proceso estarían participando moléculas de adhesión y sus receptores.

Por otra parte, se evaluó si la expresión de HLA-DR por efecto de la adhesión de linfocitos B es específica del endotelio tipo HEV. Para analizar esta posibilidad, se utilizó células endoteliales disociadas de cordón umbilical humano HUVEC, las cuales se incubaron con la línea celular B GU o con IFN- γ , como control positivo de inducción de MHC clase II. Al igual que lo observado anteriormente con HUTEK, se detectó la

expresión de HLA-DR en la superficie celular de HUVEC, aunque en un menor porcentaje de células comparado a HUVEC (Figura 7).

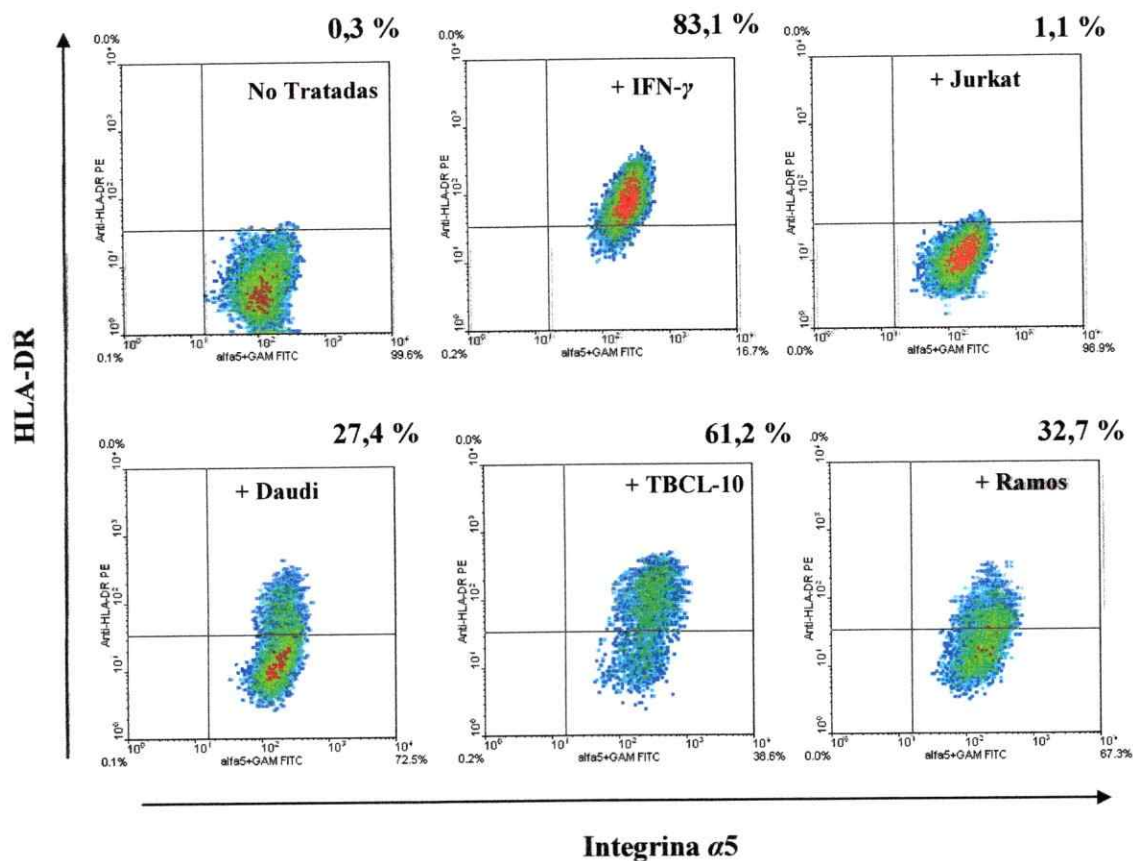


Figura 3. Sólo la co-incubación de células B induce la expresión en superficie celular de MHC-II en HUVEC. Las células endoteliales HUVEC se crecieron a confluencia y se incubaron por 96 horas con la línea celular B Daudi, Linfocitos B derivados de amígdala (TBCL-10), la línea celular B Ramos y la línea celular T Jurkat. Como control positivo de inducción de MHC-II se incubó con IFN- γ . HUVEC se analizaron en una región correspondiente a las células alfa-5 positivas. Los porcentajes de HUVEC HLA-DR⁺ se indican en el cuadrante superior derecho.

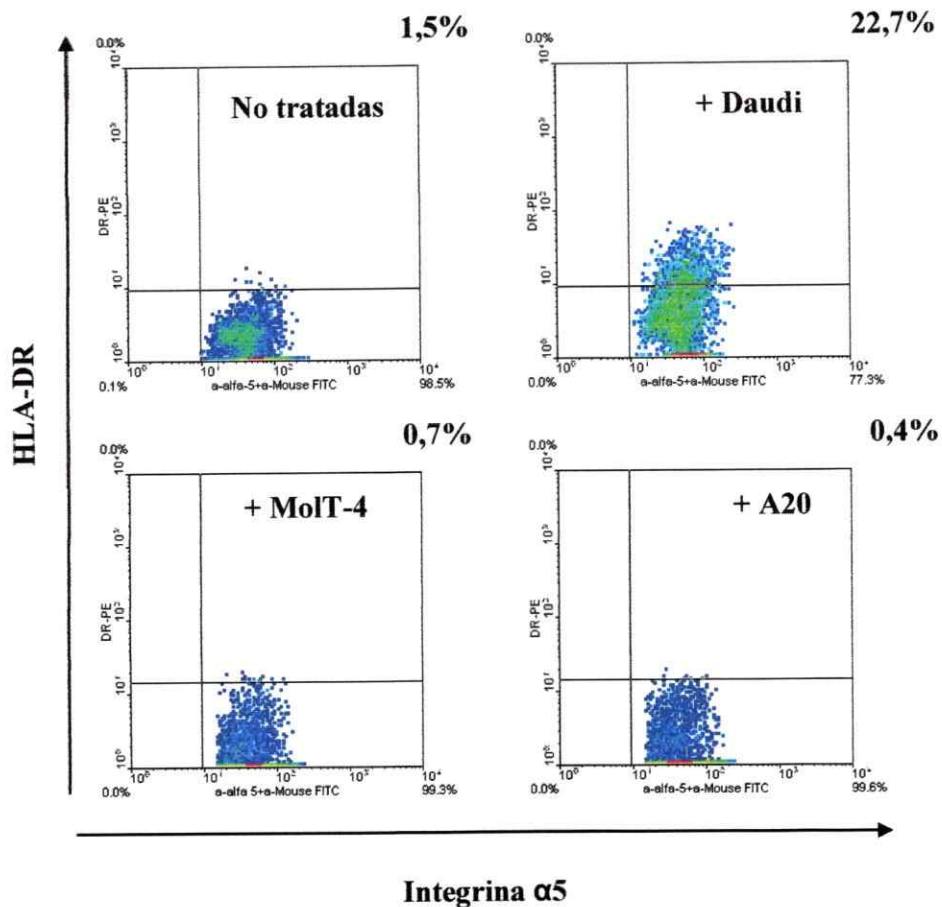


Figura 4. La expresión de MHC-II en HUTEc inducida por co-incubación con células B es especie-específica. Las células endoteliales HUTEc se crecieron a confluencia y se incubaron por 96 horas con la línea celular B humana Daudi, la línea celular T humana Molt-4 o la línea celular B murina A20. Los gráficos de densidad muestran el doble marcaje de HUTEc con los anticuerpos anti-integrina alfa-5 versus anti-HLA-DR. HUTEc se analizaron en una región correspondiente a las células alfa-5 positivas. Los porcentajes de HUTEc HLA-DR⁺ se indican sobre cada gráfico.

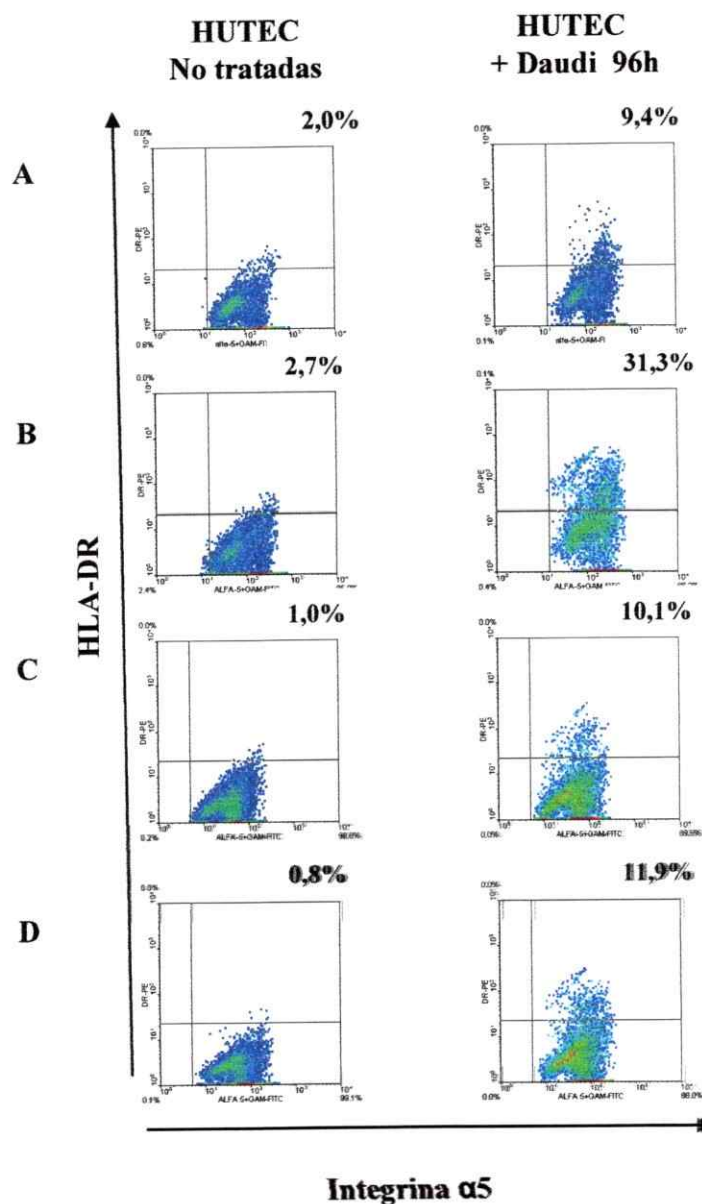


Figura 5. Las células B Daudi inducen la expresión de MHC-II en HUTEc obtenidas de diferentes donantes. Las células endoteliales HUTEc, denominadas AMG-9 (A), AMG-X (B), AMG-JL (C) y AMG-4 (D) se obtuvieron por amigdalactomía de rutina de diferentes donantes, se crecieron a confluencia y se dejaron sin tratar o se incubaron por 96 horas con la línea celular B Daudi.

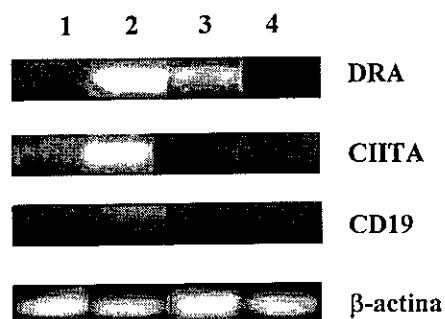


Figura 6. La expresión de mRNA de MHC-II en HUTEc por la interacción con células B es dependiente de la adhesión celular. Las células HUTEc sin tratar (carril 1), incubadas durante 3 horas con IFN- γ (carril 2) o con células linfoides B Ramos (carril 3) o con células Ramos pre-incubadas con el anticuerpo bloqueador de la adhesión, HP2/1 (anti-integrina α 4) (carril 4). Las células B se eliminaron por lisis con complemento con el anticuerpo GAP8.3 (anti-CD45). La expresión del RNAm para la cadena alfa de HLA-DR (DRA), CIITA, CD19 (marcador específico de células B) y β -actina (control de carga y de expresión) se analizaron por RT-PCR. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

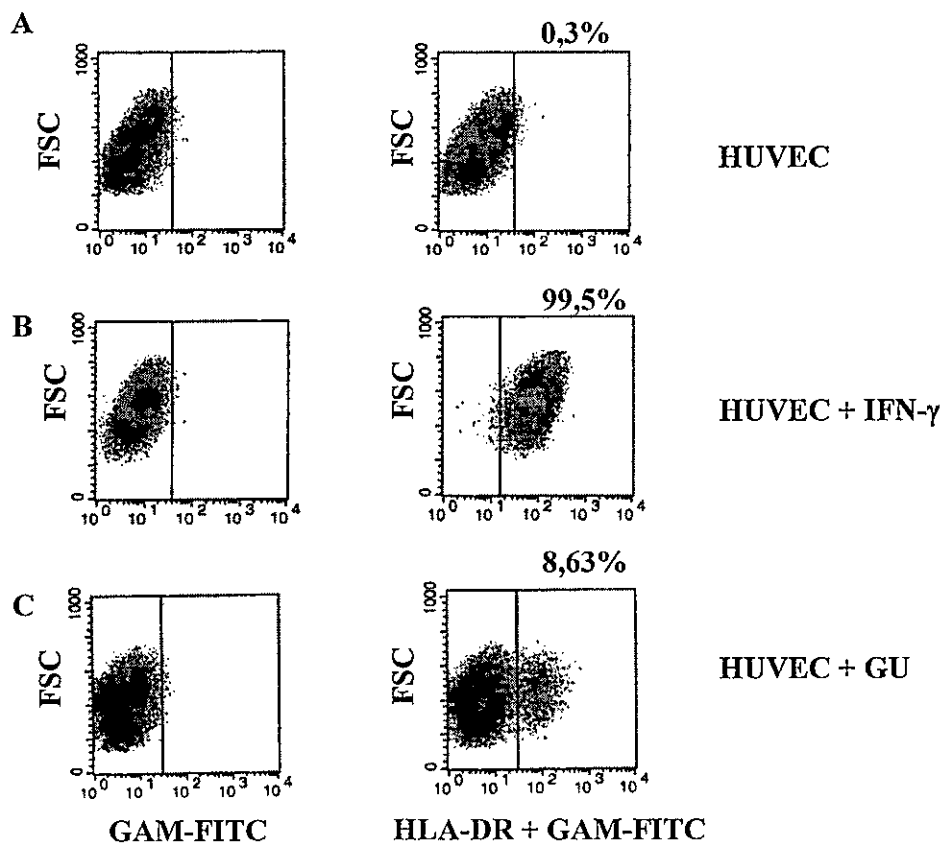


Figura 7. Las células B inducen la expresión de MHC-II en la superficie de células endoteliales de cordón umbilical. Las células endoteliales HUVEC se crecieron a confluencia, luego se dejaron sin tratar (A), se incubaron con IFN- γ como control positivo (B) o con la línea celular B GU (C) durante 96 horas. Las células endoteliales fueron analizadas en una región correspondiente al marcaje positivo para CD13. Los gráficos de puntos muestran tamaño celular (FSC) versus marcaje con el anticuerpo secundario conjugado con FITC (GAM-FITC) y el marcaje para el anticuerpo HLA-DR seguido por el anticuerpo secundario GAM-FITC.

Como se ha descrito, la expresión de MHC-II depende de la expresión del transactivador CIITA (83). Para evaluar la participación de CIITA en la expresión de MHC-II en HUTEc producida por la interacción con linfocitos B, co-incubamos HUTEc durante 6 horas con distintas células linfoides: línea celular B Daudi, línea celular T Jurkat, linfocitos obtenidos de sangre periférica (PBMC) y linfocitos de amígdalas humanas, luego de lo cual se analizó la expresión del mRNA de HLA-DR y CIITA en HUTEc mediante RT-PCR.

Debido a que los linfocitos B expresan constitutivamente MHC-II, fue necesario eliminarlos del co-cultivo mediante lisis por complemento con el anticuerpo monoclonal anti-CD45 GAP8.3. Luego, se extrajo el RNA total de las células endoteliales y se realizó la RT-PCR. En la figura 8 se observa la inducción de la expresión de mRNA para HLA-DRA en HUTEc co-incubadas con las líneas linfoides B (Daudi, Ramos), con linfocitos totales aislados de sangre periférica y con linfocitos derivados de amígdala. Al analizar la expresión de mRNA de CIITA, sólo se detectó la expresión en HUTEc tratadas con IFN- γ , utilizadas como control positivo. Como era de esperar, al co-incubar HUTEc con linfocitos T (Molt-4 y Jurkat) no se observó expresión de mRNA para HLA-DRA ni CIITA en HUTEc, confirmando los resultados obtenidos por inmunofluorescencia (Figura 3 y 4).

Debido a que la técnica de RT-PCR es muy sensible, evaluamos la presencia de linfocitos B residuales en las muestras de RNA, utilizando el marcador CD19 específico de células B. No obstante, sólo se observó mRNA de CD19 en los controles positivos de las células B recuperadas de los co-cultivos (Figura 9). Estos resultados muestran que la

expresión de MHC-II en HUTEc inducida por adhesión de células B es independiente de CIITA.

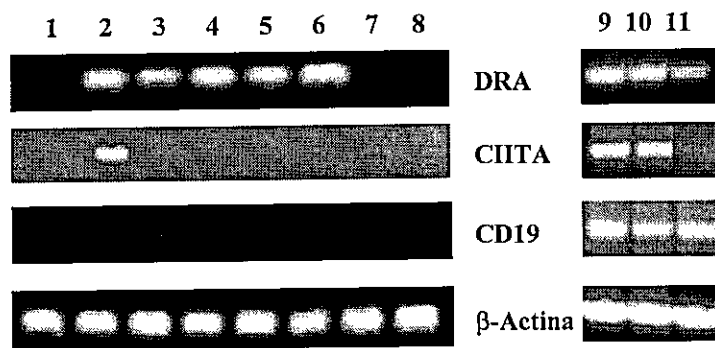


Figura 8. La expresión de mRNA de HLA-DRA inducida por adhesión de células B es independiente de CIITA. HUVEC se incubaron con IFN- γ (carril 2), Ramos (carril 3), Daudi (carril 4), PBMC (carril 5), linfocitos de amígdala (carril 6), Molt-4 (carril 7) and Jurkat (carril 8) durante 6 horas. Luego, el RNAm se aisló con Trizol y se analizó por RT-PCR para la expresión de mRNA de HLA-DRA, CIITA, CD19 (marcador de células B) y β -actina (control de carga y expresión). Como control positivo de la expresión de CD19 y CIITA se analizaron las células Ramos (carril 9), Daudi (carril 10) y PBL (carril 11) obtenidas de los co-cultivos del carril 3, 4 y 5.

1.2 La adhesión de linfocitos B a HUTEc induce en éstas la expresión de todos los isotipos de las moléculas MHC-II: HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ.

Existen tres isotipos de moléculas MHC-II, las cuales se expresan en forma coordinada (58). Sin embargo, existen reportes que muestran que en células tumorales se produce una expresión diferencial de los isotipos de moléculas MHC-II y que esto estaría asociado a malignidad de las células tumorales (84). La presencia de los tres isotipos de MHC-II (HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ) en HUTEc co-cultivadas con células B fue evaluado al cabo de 96 horas por citometría de flujo. En la figura 9 se muestra que la adhesión de las células B Daudi a HUTEc induce la expresión en la superficie celular de HUTEc de los tres isotipos de las moléculas MHC-II (HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ). Al igual que para HLA-DR, los otros dos isotipos (DP y DQ) son inducidos en un pequeño porcentaje de las células endoteliales, a diferencia de lo que ocurre con IFN- γ que fue utilizado como control positivo. Por lo tanto, la adhesión de células B induce la expresión coordinada de los tres isotipos de MHC-II en HUTEc.

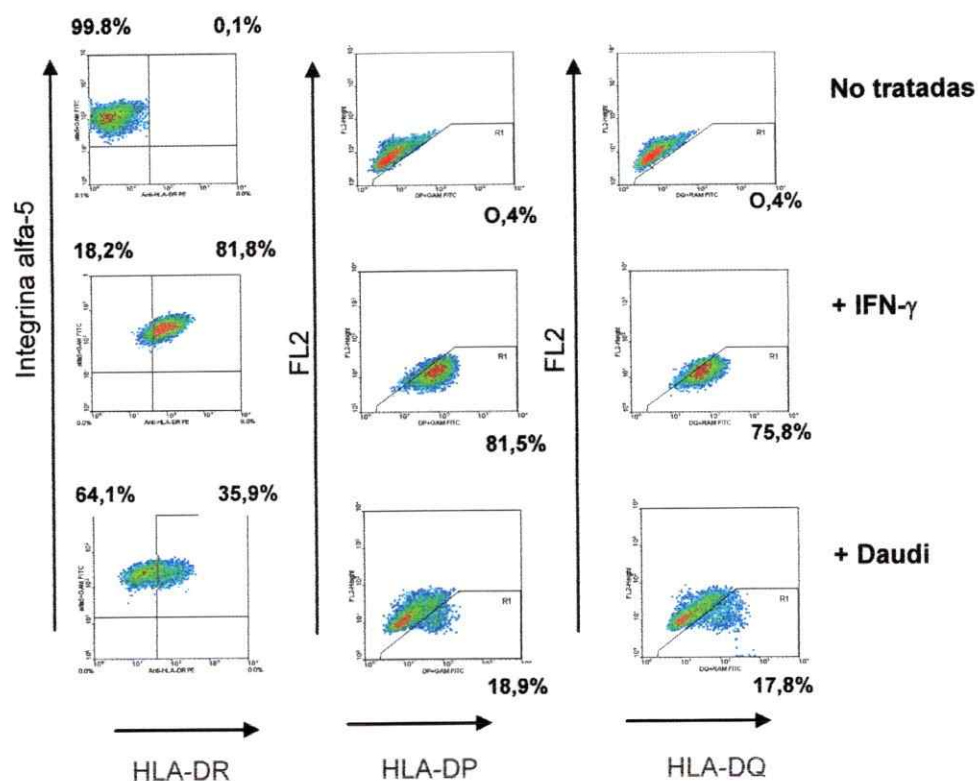


FIGURA 9. La adhesión de células B induce la expresión de HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ en la superficie de HUTEc. Las células HUTEc se trataron con IFN- γ (150 U/mL) o se co-incubaron con células DAUDI por 96 horas. Luego, HUTEc se analizaron por citometría de flujo para la expresión de HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ.

1.3 Cinética de la expresión de los RNA mensajeros de MHC-II inducida por la adhesión de linfocitos B a HUTEK.

Aunque IFN- γ y la adhesión de linfocitos B inducen la expresión de los tres isotipos de moléculas MHC-II en las células endoteliales, los porcentajes de células que presentan en la superficie celular las moléculas MHC-II inducidas por la adhesión de linfocitos B son siempre menores comparadas al tratamiento con IFN- γ . Para tratar de elucidar este punto comparamos por RT-PCR la inducción de los mRNA de los isotipos de MHC-II en HUTEK inducidas por IFN- γ o bien por la adhesión de linfocitos B. Para esto, las células HUTEK se coincubaron durante 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas con la línea celular Ramos o con 150 UI/mL IFN- γ . Después de sucesivos lavados con PBS a 4°C, los linfocitos B se eliminaron por lisis por complemento con el anticuerpo monoclonal anti-CD45, GAP8.3, y se extrajo el RNA total de las células endoteliales para el posterior análisis mediante RT-PCR. Para comparar los niveles relativos de expresión de los mRNA se realizó un análisis densitométrico, en el cual se normalizó con respecto a la expresión del mRNA de β -actina. En la figura 10 se observa que tanto IFN- γ como la línea celular B Ramos inducen la expresión de los mRNA de los tres isotipos de MHC-II. Sin embargo, las cinéticas de expresión de los mensajeros para los isotipos de MHC-II en HUTEK inducidos por IFN- γ y por la adhesión celular son diferentes en los tiempos analizados. En la figura 10A se observa que el mRNA de HLA-DRA en HUTEK co-incubadas con las células Ramos es fuertemente expresado a partir de las 3 horas, a diferencia de lo que ocurre por el tratamiento con IFN- γ , cuya expresión se observa a partir de las 6 horas. La máxima expresión del mRNA para HLA-

DRA inducida por la adhesión de células B es a las 3-6 horas y luego comienza a decaer hacia las 96 horas. En cambio, con el tratamiento con IFN- γ la expresión del mRNA para HLA-DRA aumenta gradualmente durante el tiempo del ensayo (Figura 10A). Los niveles de expresión de los mensajeros para HLA-DPA y DQA también se inducen tempranamente comparados al tratamiento con IFN- γ (Figura 10B y 10C y Anexo 1).

La expresión de los mensajeros para HLA-DRA, DPA y DQA inducidos en HUTEK por la adhesión de linfocitos B fue transitoria, ya que desde 12-24 horas se detectó una disminución en los niveles de expresión. Sin embargo, los niveles de expresión de estos mensajeros inducidos en HUTEK por IFN- γ continuaron elevados aún a las 96 horas de tratamiento (Figura 10, anexo 1), similar a lo que ocurre con HLA-DRA. Estos resultados muestran que la adhesión de linfocitos B induce la expresión del mRNA para HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ en HUTEK. Finalmente, la expresión de los mRNA de los tres isotipos de MHC-II inducidos por la adhesión de células B es más temprana y transitoria que la inducida por el tratamiento con IFN- γ .

Otros genes regulados en forma coordinada por IFN- γ son las moléculas HLA-DM y la cadena invariante (Ii), las cuales participan como moléculas accesorias en el procesamiento y presentación antigénica por moléculas MHC-II. Para evaluar la participación de estas moléculas en la expresión de MHC-II inducida por la adhesión de células B, se realizó una cinética de expresión de los mRNAs de HLA-DM, Ii y CIITA desde 3-96 horas y se comparó al tratamiento con IFN- γ . La expresión de mRNA para HLA-DM en HUTEK no se vio afectada por la adhesión de Ramos, a diferencia de la expresión del mRNA de HLA-DM inducida por IFN- γ , la cual aumenta a las 6 horas y

se mantiene constante durante el resto del tiempo analizado (Figura 11A, anexo 1). La figura 11B muestra que la adhesión de Ramos a HUTEK induce la expresión del mRNA para la cadena invariante (Ii), siendo máxima a las 12 horas y disminuyendo a las 96 horas, a diferencia de la inducción de Ii observada por el tratamiento con IFN- γ , que continúa aumentando a las 96 horas (Figura 11B, anexo 1).

La cinética de expresión de CIITA inducida por IFN- γ mostró un máximo a las 12 horas de tratamiento, disminuyendo gradualmente. Por otra parte, no se observó expresión de mRNA para CIITA en HUTEK después de la co-incubación con Ramos durante todo el período de tiempo evaluado (3-96 horas) (Figura 11C, anexo 1). Estos resultados muestran diferencias en las cinéticas de expresión de los mRNAs de las moléculas involucradas en presentación antigénica, inducidas por IFN- γ comparadas a la inducida por la adhesión de células B. Estos resultados confirman que la expresión de moléculas MHC-II inducidas por la adhesión de linfocitos B es independiente de CIITA.

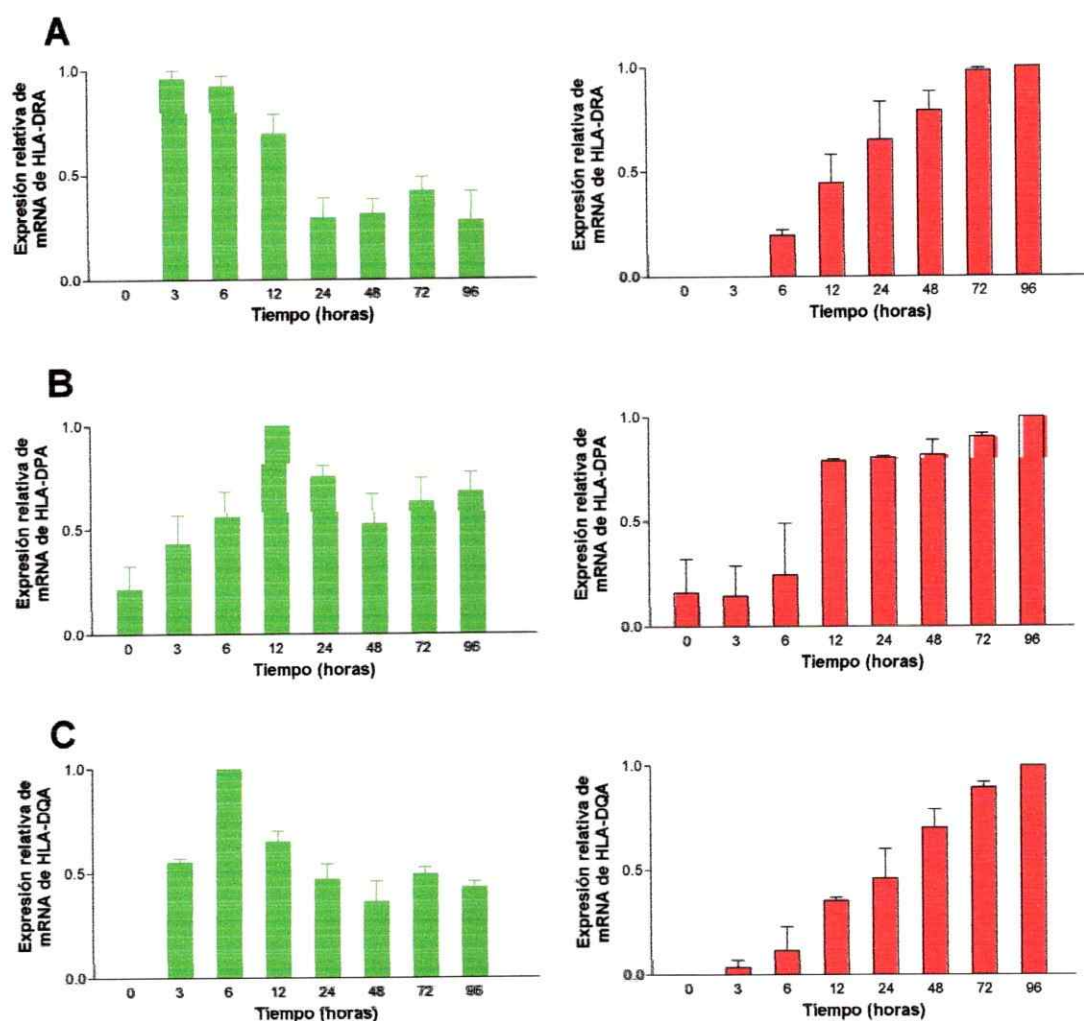


Figura 10. Cinética de expresión del mRNA de las moléculas MHC-II inducidas por IFN- γ y por la adhesión de células B en HUTEK. HUTEK se co-cultivaron con células Ramos (columnas verdes) o se trataron con IFN- γ (columnas rojas) durante 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas. Luego, se analizó por RT-PCR la expresión del mRNA de (A) HLA-DRA (B), HLA-DPA y (C) HLA-DQA. Como control de carga se amplificó el mRNA de β -actina. Los niveles de expresión de mRNA se determinaron usando el programa computacional Scion y se normalizaron con respecto a los niveles de mRNA de la banda control de beta actina correspondiente, calculando el promedio de la razón de mRNA del gen problema/mRNA de β actina en los tiempos analizados. Luego, al valor máximo de expresión se le asignó el valor de 1 y los demás valores se calcularon con respecto a este valor. Estos gráficos son representativos de tres experimentos independientes y las barras indican \pm el error estándar.

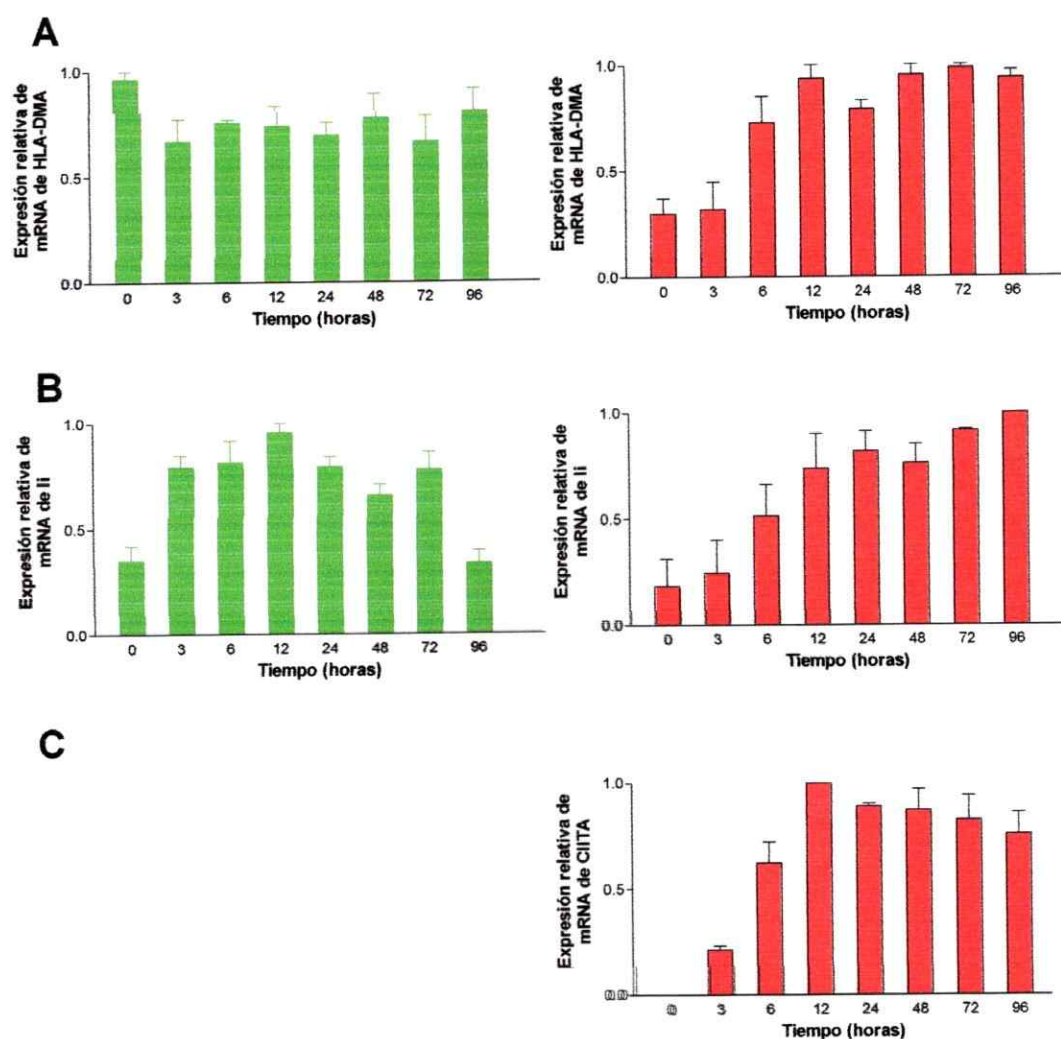


Figura 11. Cinética de expresión del mRNA de las moléculas accesorias de MHC-II inducidas por la adhesión de células B y por IFN- γ en HUTEc. HUTEc se co-cultivaron con células Ramos (columnas verdes) o se trataron con IFN- γ (columnas rojas) durante 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas. Luego, se analizó por RT-PCR la expresión del mRNA de (A) HLA-DMA (B), cadena invariante (Ii) y (C) CIITA. Como control de carga se amplificó el mRNA de β -actina. Los niveles de expresión de mRNA se determinaron usando el programa computacional Scion y se normalizaron con respecto a los niveles de mRNA de la banda control de beta actina correspondiente, calculando el promedio de la razón de mRNA del gen problema/mRNA de β actina en los tiempos analizados. Luego, al valor máximo de expresión se le asignó el valor de 1 y los demás valores se calcularon con respecto a este valor. Estos gráficos son representativos de tres experimentos independientes y las barras indican \pm el error estándar.

2.1 Evaluación de los posibles ligandos responsables de la expresión de MHC-II en HUTEK inducida por la adhesión de linfocitos B.

Para evaluar la participación de moléculas de adhesión en la inducción de la expresión de MHC-II en HUTEK inducida por la adhesión de linfocitos B, utilizamos una estrategia experimental basada en la activación de estas moléculas por entrecruzamiento con anticuerpos monoclonales.

Los ensayos de entrecruzamiento se realizaron con anticuerpos monoclonales dirigidos contra integrinas y moléculas de adhesión, conocidas como transductoras de señales y reguladoras de la expresión de MHC-II. Se analizó el papel funcional de ICAM-1, de las integrinas $\alpha 4$ y $\beta 1$ (que forman el complejo VLA-4) y de CD40, todas presentes en la superficie celular de HUTEK. Para activar ICAM-1, se utilizaron dos protocolos previamente descritos (81, 85, 86), en los cuales las células HUTEK se incuban con un anticuerpo monoclonal dirigido contra ICAM-1 a 37°C, o bien se incuban a 4°C. Luego, los anticuerpos monoclonales fueron entrecruzados utilizando un anticuerpo secundario anti-Ig de ratón. La inducción de la expresión de MHC-II fue analizada por RT-PCR. Los resultados obtenidos con ambos protocolos demuestran que no es posible inducir la expresión del mRNA de HLA-DRA en HUTEK después de activar ICAM-1 (Figura 12 carril 3 y 4 respectivamente).

Puesto que ICAM-1 ya había sido implicado en la inducción de la expresión de MHC-II, utilizamos otra estrategia experimental para confirmar nuestros resultados, en la cual bloqueamos la activación de ICAM-1 mediante la incubación con un anticuerpo

monoclonal anti-ICAM-1 que impide la unión a su ligando LFA-1, presente en las células Ramos. Tal como lo indica la Figura 12 carril 5 y 6, el bloqueo de la unión de ICAM-1 a su ligando no inhibió la expresión del mRNA de HLA-DR inducida por la adhesión de linfocitos B en HUTEc, corroborando los resultados anteriores. Estos resultados sugieren que la activación de ICAM-1 no estaría involucrada en la inducción de MHC-II en HUTEc.

La participación de otras moléculas de adhesión en la inducción de la expresión de MHC-II en HUTEc, fue evaluada mediante el entrecruzamiento de estas moléculas con anticuerpos monoclonales específicos contra las integrinas $\alpha 4$ (HP2/1), $\beta 1$ (LIA1/2) y la molécula de adhesión CD40 (G28-5). Se sabe que en procesos de tráfico linfocitario podrían participar más de un par de moléculas, por lo tanto, utilizamos además una mezcla de los anticuerpos antes mencionados.

La activación de las moléculas de adhesión por entrecruzamiento se realizó mediante la incubación con un anticuerpo primario a 4°C, seguido por la incubación con un anticuerpo secundario a 37°C. Posteriormente, se extrajo el RNA y se analizó el mRNA de MHC-II por RT-PCR. El entrecruzamiento de las moléculas de adhesión estudiadas no fue capaz de inducir la expresión del mRNA para HLA-DR en HUTEc.

Es importante destacar que sólo la activación de la integrina $\beta 1$ mostró un leve aumento de la expresión del mensajero para DRA (Figura 13). Como control de especificidad, se utilizó el anticuerpo anti-integrina $\beta 2$, ya que HUTEc no expresan esta molécula.

Estos resultados sugieren que ICAM-1, CD40 y la integrina $\alpha 4$ no estarían involucradas en la inducción de la expresión de MHC-II en HUTEc. Además, sugieren

que la integrina $\beta 1$ podría tener un papel en la inducción de la expresión de MHC-II, pero probablemente se necesite la contribución de algún factor soluble producido por los linfocitos B durante la interacción con las células endoteliales para que el efecto sea completo.

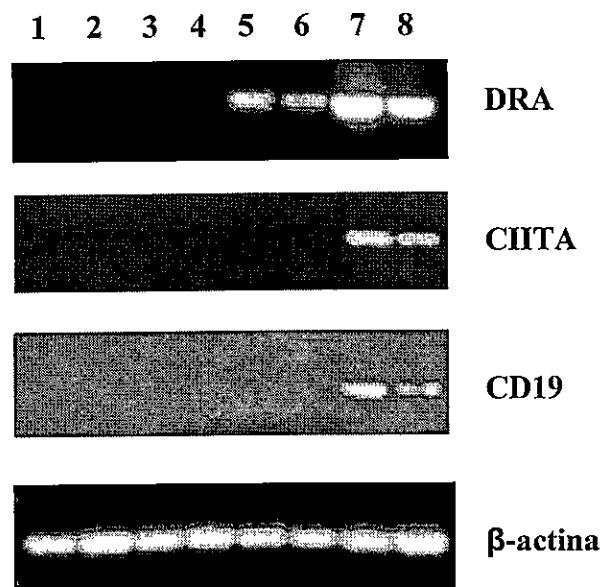


Figura 12. La expresión de mRNA de HLA-DRA es independiente de la activación de ICAM-1. HUTEc se crecieron a confluencia y se dejaron sin tratar (carril 1), incubadas con un anticuerpo secundario contra Ig de ratón hecho en cabra (carril 2), incubadas con un anticuerpo primario anti-ICAM-1 durante 30 minutos a 37°C (carril 3) o durante 30 minutos a 4°C (carril 4), seguido por la incubación con el anticuerpo secundario a 37°C por 3 horas para inducir el entrecruzamiento de las moléculas de ICAM-1, o incubadas durante 3 horas con células RAMOS (carril 5), o incubadas por 3 horas con células RAMOS que fueron pre-incubadas con el anticuerpo anti-ICAM-1 durante 30 minutos a 37°C (carril 6). Luego, se realizó la extracción de RNA total con TRIZOL y la RT-PCR para HLA-DRA, CIITA, CD19 a partir de 1 μ g de RNA. Como control de carga y de expresión se amplificó β -actina. Los carriles 7 y 8 corresponden a las células RAMOS retiradas de los co-cultivos de 5 y 6, respectivamente.

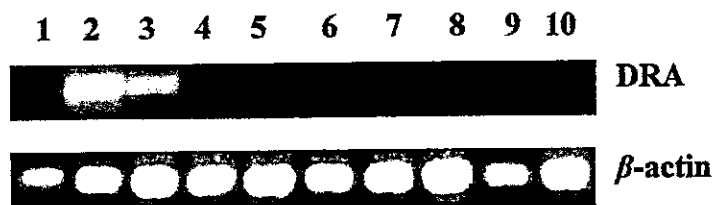


Figura 13. La activación de la integrina $\alpha 4$ y de la molécula de adhesión CD40 no están involucrada en la expresión de HLA-DR en HUTEc. HUTEc tratadas con IFN- γ (carril 2), co-incubadas con Ramos (carril 3) o co-incubadas durante 30 minutos a 4°C con Ramos en presencia de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los anticuerpos monoclonales anti-ICAM-1 (carril 4), anti-integrina $\alpha 4$ (carril 5), anti-CD40 (carril 6), anti-integrina $\beta 2$ (carril 7), anti-integrina $\beta 1$ (carril 8), y una mezcla de todos los anticuerpos utilizados (carril 9) seguidos del entrecruzamiento mediante la incubación con un anticuerpo secundario durante 3 horas a 37°C. El carril 1 corresponde a HUTEc no tratadas y el carril 10 a HUTEc tratadas sólo con el segundo anticuerpo.

2.2 Determinación de factores solubles involucrados en la expresión de MHC-II en HUTEK inducida por la adhesión de linfocitos B.

Para evaluar la participación de factores solubles en la inducción de la expresión de MHC-II en HUTEK por la adhesión de células B, analizamos la capacidad de inducir la expresión de MHC-II en HUTEK de los sobrenadantes obtenidos de los co-cultivos de 96 horas entre HUTEK con células Ramos.

El cultivo de HUTEK con los sobrenadantes de co-cultivos de 96 horas no produjo un aumento de la expresión de MHC-II en HUTEK. Sin embargo, es posible que durante el transcurso del experimento estos factores hayan sufrido degradación.

Puesto que IFN- γ es el inductor más potente de MHC-II y a pesar de que previamente no observamos expresión de mRNA de CIITA, evaluamos mediante ensayos de ELISA de captura la presencia de IFN- γ en los sobrenadantes obtenidos a las 12, 24 y 48 horas de los co-cultivos entre HUTEK y líneas celulares B y T.

La figura 14 muestra que los sobrenadantes de los co-cultivos entre HUTEK y las líneas celulares B presentan niveles de IFN- γ inferiores o similares al nivel basal de IFN- γ de las células HUTEK (34,9 pg/mL). En general, no observamos secreción de IFN- γ por sobre el nivel basal de HUTEK, excepto en la línea celular B llamada BLS-1, la cual secreta en forma endógena IFN- γ y que fue utilizada como control positivo del ensayo. Tampoco se detectaron niveles de IFN- γ en el sobrenadante de co-cultivo de HUTEK con la línea celular T Jurkat (Figura 14). Estos resultados sugieren que la expresión de

MHC-II en HUTEK inducida por la adhesión de células B es independiente de IFN- γ , lo cual está de acuerdo con nuestros resultados anteriores.

Aunque no existen antecedentes de la inducción de la expresión de MHC-II por TNF- α , se ha descrito que esta citoquina puede actuar en sinergia con otras citoquinas aumentando la expresión de MHC-II en determinados tipos celulares (87).

Para evaluar la presencia de TNF- α en los co-cultivos realizamos un ensayo biológico que detecta simultáneamente TNF- α y las linfoquinas alfa y beta (LT- α y LT- β) (82). No fue posible detectar estas citoquinas en los sobrenadantes de los co-cultivos entre HUTEK y las líneas celulares B (79). El conjunto de estos resultados sugiere que en el proceso no participan los factores solubles estudiados.

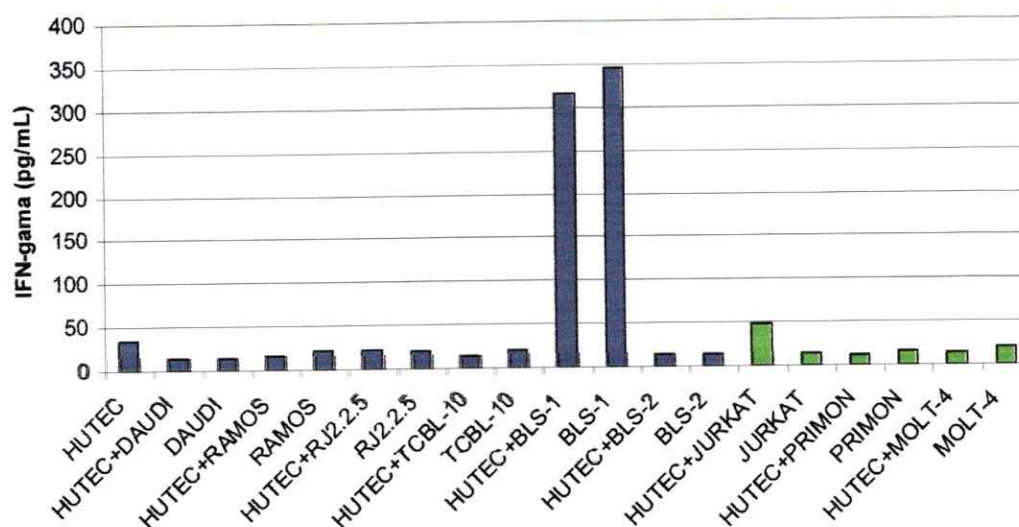


Figura 14: La co-incubación de HUTEc con líneas celulares derivadas de células B no induce la secreción de IFN- γ . HUTEc se crecieron a semi-confluencia y se co-incubaron con líneas celulares B (barras azules) y líneas celulares T (barras verdes) a una razón de 4:1 de células linfoides versus HUTEc, durante 48 horas. A las 48 horas se recolectaron los sobrenadantes de los cocultivos y de los cultivos de las mismas líneas celulares B y T. La concentración de IFN- γ humano se determinó mediante ELISA de captura en los sobrenadantes de cultivo utilizando IFN- γ humano recombinante como estándar.

3.1 Comparación de la composición estructural de las moléculas MHC-II inducida por la adhesión celular y por IFN- γ .

La biosíntesis de las moléculas MHC-II ha sido bastante caracterizada en células presentadoras de antígeno y en células tratadas con IFN- γ (88). Los complejos MHC-II-cadena invariante son transportados desde el retículo endoplásmico a los compartimentos intracelulares MIIC, donde la cadena invariante es degradada y los péptidos son cargados en las moléculas MHC-II. Con el objetivo de analizar la composición del complejo MHC-II recién sintetizado en HUTEc, ya sea producido por la adhesión de células B o por IFN- γ , realizamos marcación metabólica en HUTEc. Para esto, HUTEc se estimularon durante 96 horas con la línea celular B TBCL-10 o con IFN- γ , luego de lo cual se les dió un pulso de 30 minutos con metionina- S^{35} , se lisaron e inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR L112.

En la figura 15 se observa que tanto HUTEc coincubados con células B o con IFN- γ producen un patrón de bandas similares correspondientes a la cadena alfa y a la cadena beta del complejo MHC-II disociado. Además, se observa en ambos tratamientos la co-inmunoprecipitación de la cadena invariante junto a las cadenas alfa y beta de MHC-II (figura 15). Estos resultados muestran que la composición de las moléculas MHC-II en HUTEc inducidas por la adhesión de células B son similares a las inducidas por IFN- γ .

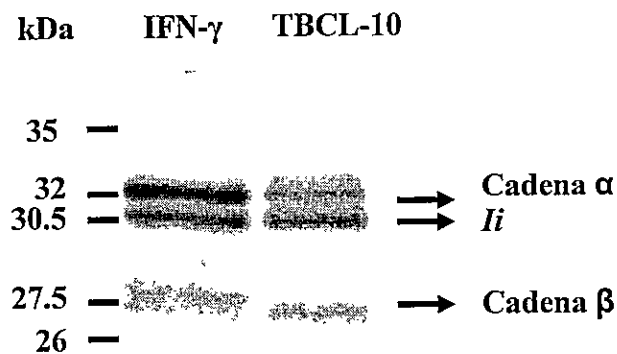


Figura 15. La composición del complejo MHC-II en HUTEc formado por la adhesión de células B es similar al formado por IFN- γ . HUTEc se crecieron a confluencia y se incubaron durante 96 horas con células B TBCL-10 o con IFN- γ , como control positivo de expresión de MHC-II. Luego, las células se incubaron con 1mCi de metionina/S³⁵-cisteína durante 30 minutos. Después de lisar e inmunoprecipitar MHC-II con el anticuerpo L112, las proteínas se separaron por SDS-PAGE en condiciones desnaturalantes y se expuso en un equipo Fosfoimager. En la figura se muestran las cadenas alfa (α), beta (β) de HLA-DR y la cadena invariante (*Ii*).

3.2 Efecto de la adhesión de células B a HUTEc sobre la activación, proliferación y supervivencia de los linfocitos.

Para evaluar el papel fisiológico de la expresión de MHC-II en HUTEc inducida por la adhesión celular, analizamos el efecto sobre el estado de activación de linfocitos T. Para esto, HUTEc pre-incubadas por 96 horas con las células B Ramos, fueron incubadas por distintos tiempos (24-72 horas) con linfocitos T aislados de sangre periférica. La activación de los linfocitos T se analizó mediante la detección de los marcadores de activación CD25, CD69 y HLA-DR en las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ (linfocitos T de ayuda) y linfocitos T CD8⁺ (linfocitos T citotóxicos). En la figura 16B se muestra que a las 24 horas de co-incubación, poblaciones de células T CD4⁺ y de células CD8⁺ expresan los marcadores de activación CD69 y HLA-DR, los cuales disminuyen a las 72 horas de incubación. Además, se observa a las 72 horas un aumento en una pequeña población de linfocitos T CD8⁺ que expresan CD25 (Figura 16B). La expresión de estos marcadores en los linfocitos T no se observa cuando los linfocitos T son incubados con HUTEc que no han sido pre-incubadas con células B (Figura 16A). Por lo tanto, HUTEc pre-incubadas con las células B inducen una activación transitoria de los linfocitos T. Esta activación transitoria podría tener un papel de acondicionamiento de los linfocitos para la posterior trans migración o en la activación de éstos en los órganos linfoides secundarios.

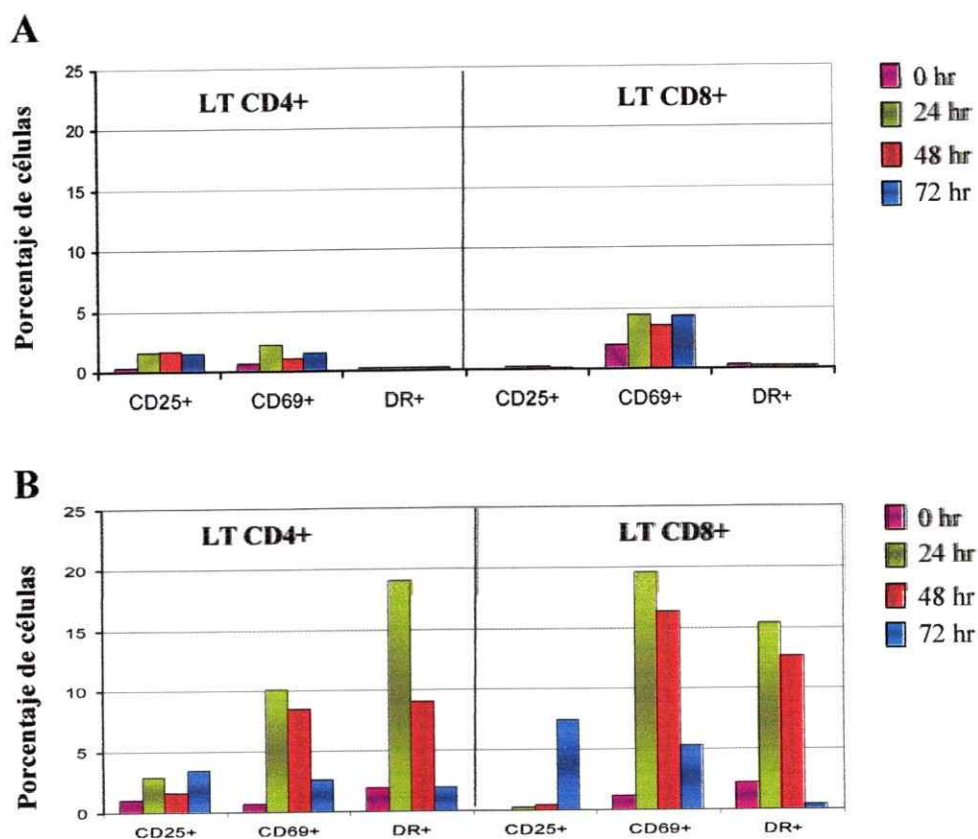


Figura 16. Cinética de inducción de marcadores de activación en linfocitos T incubados sobre HUTEc estimuladas por la adhesión de células B. HUTEc se crecieron a confluencia en placas de 60 mm, luego de estimular a las HUTEc con 3×10^6 de células B Daudi, se incubó por 24-72 horas con PBMC. El gráfico **A** muestra el porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ positivos para CD25, CD69 y HLA-DR después de incubar PBMC sobre HUTEc sin tratar (**A**) o HUTEc estimuladas durante 96 horas por la adhesión de Daudi (**B**). La expresión de los marcadores de CD25, CD69 y HLA-DR de los PBMC recuperados se analizaron por inmunofluorescencia mediante citometría de flujo, en las regiones correspondientes a linfocitos T CD4+ y CD8+. El resultado es representativo de tres experimentos independientes.

Para evaluar la proliferación de los linfocitos T que interactúan con HUTEc, utilizamos el marcador fluorescente CFSE que difunde a través de la membrana plasmática y se diluye proporcionalmente en cada división celular. Luego de marcar PBMC obtenidos de sangre periférica con CFSE, se incubaron durante 24-96 horas con HUTEc sin tratar y HUTEc pre-incubadas con células B por 96 horas. Posteriormente, se analizó mediante citometría de flujo la dilución del marcador fluorescente CFSE en la población de células CD3⁺ correspondiente a los linfocitos T. Durante todo el tiempo analizado no se observó proliferación de los linfocitos T (Figura 17), lo cual se correlaciona con la activación transitoria de los linfocitos T, previamente observada. Sin embargo, observamos la proliferación de una pequeña población de células CD3⁻, cuya identidad no pudo ser establecida, aunque podrían corresponder a células NK. Estos resultados muestran que la expresión de MHC-II en HUTEc inducida por adhesión celular no estimula la proliferación de los linfocitos T.

Por otra parte, analizamos si las células HUTEc co-incubadas con los linfocitos B tienen un efecto en la apoptosis de los linfocitos T. Para esto, HUTEc se co-incubaron por 96 horas con la línea celular B Daudi, luego se agregaron linfocitos T al co-cultivo y se incubaron por otras 96 horas adicionales. Enseguida, se analizó mediante la técnica de TUNEL la presencia de linfocitos T apoptóticos. Como controles negativo y positivo de apoptosis se utilizó células HL-60 no tratadas y tratadas con DMSO, respectivamente, incluidos en el ensayo (Anexo 2). Observamos que un 3,89 % de los linfocitos incubados sólo en medio de cultivo presentan apoptosis (Figura 18A). Esta población apoptótica aumenta a un 35,99 % al ser incubados con la línea celular B Daudi (Figura 18B). Al incubar los linfocitos con HUTEc pre-incubadas con las células B Daudi, la

población apoptótica disminuyó a 7,05 % (Figura 18D). Estos resultados nos indican que la adhesión de linfocitos B a HUTEK tiene un efecto anti-apoptótico sobre los linfocitos T, a pesar de la apoptosis inducida por la incubación con los linfocitos B.

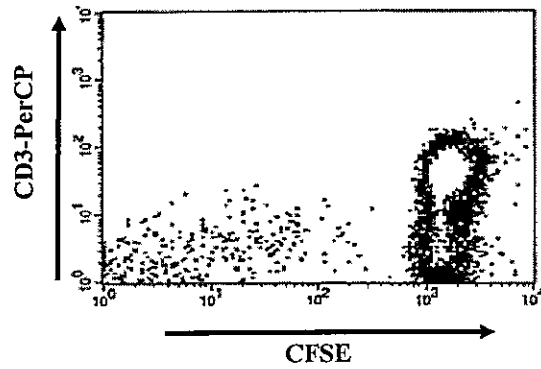


Figura 17 . La estimulación de HUTEc por la adhesión de células B no induce la proliferación de linfocitos T. HUTEc se crecieron a semi-confluencia en placas de 24 pozos y se estimularon durante 96 horas con la línea linfocitoide B Daudi. Luego, se incubó durante 24-96 horas con 10^6 de linfocitos T y marcados con CFSE para evaluar la proliferación. Los linfocitos T recuperados de HUTEc se marcaron con el anticuerpo anti-CD3-PerCP. En la figura se muestra el resultado obtenido de los linfocitos incubados durante 96 horas con HUTEc pre-incubadas con las células Daudi.

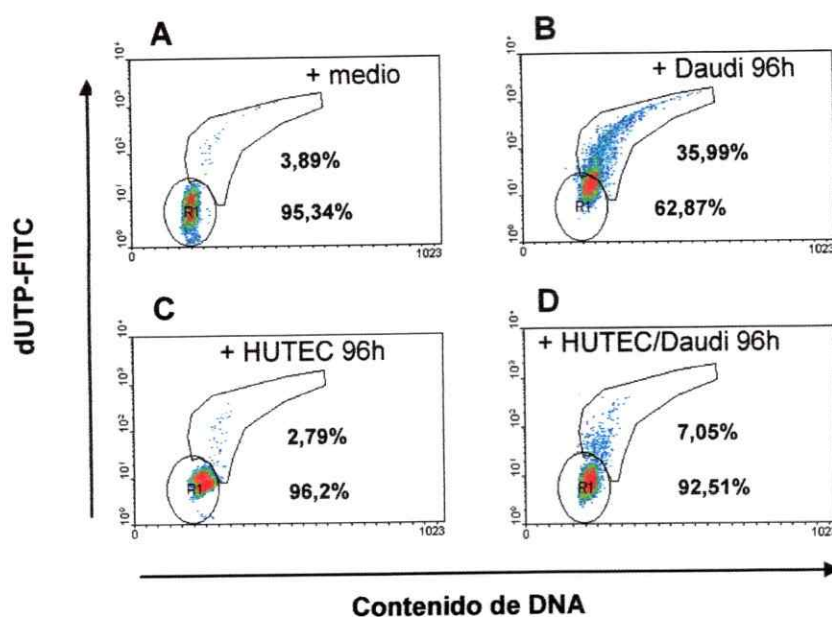


Figura 18. La estimulación de HUTEK por la adhesión de células B protege de la apoptosis a PBMC. PBMC aisladas por gradiente de Ficoll, fueron incubadas por 96 horas sólo con medio RPMI-1640 con 10% suero normal de bovino (A), con la línea celular B Daudi (B), con HUTEK (C) o con HUTEK pre-estimuladas por 96 horas con 10⁶ de células B Daudi (D). Luego, se analizó la apoptosis de PBMC mediante la técnica de TUNEL mediante citometría de flujo. El marcaje con dUTP-FITC corresponde a las células en apoptosis, cuyos porcentajes son mostrados.

3.3 Efecto de la adhesión de células B a HUTEc sobre la trans migración de linfocitos.

Para evaluar si existe selectividad en la migración transendotelial de subclases de linfocitos a través de HUTEc estimuladas por la adhesión de células B, realizamos ensayos de migración transendotelial *in vitro*. Las células HUTEc fueron crecidas hasta alcanzar confluencia en la parte superior de un sistema bicameral de cultivo celular, luego se incubaron con las líneas celulares B Daudi o Ramos durante 96 horas para inducir la expresión de MHC-II en las células endoteliales. Enseguida se agregaron, sobre HUTEc no tratadas y sobre HUTEc pre-incubadas con las células B, las células mononucleares obtenidas de sangre periférica y depletadas de células presentadoras de antígeno, las cuales se incubaron por 3 o 18 horas a 37°C. Después de este tiempo, los linfocitos que transmigraron se recuperaron, se contaron y analizaron fenotípicamente por citometría de flujo. Tal como se observa en la figura 19 A, a las 3 horas sólo transmigran las células mononucleares (PBMC) incubadas sobre HUTEc pre-incubadas con las células B Ramos. Transcurridas 18 horas, observamos una diferencia significativa en la trans migración de PBMC a través de HUTEc pre-incubadas con células Ramos comparadas con HUTEc no tratadas (Figura 19A). Cabe señalar que HUTEc no tratadas o tratadas con IFN- γ no permiten la trans migración de PBMC. Al analizar el fenotipo de las células que transmigraron a través de HUTEc o de HUTEc pre-incubadas con células Ramos, observamos una trans migración selectiva de linfocitos T CD4⁺ (54,9 \pm 8%) respecto de otras poblaciones celulares, tales como linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (24,5 \pm

0,5%) , linfocitos B CD20⁺ ($0,5 \pm 0,15$ %), células NK CD56⁺CD16⁺ ($2,08 \pm 0,12$ %) y células HLA-DR⁺ ($14,39 \pm 2,41$ %), probablemente monocitos y linfocitos T activados (Figura 19 A-D). El número de linfocitos T CD4⁺ que transmigraron a través de HUTEc pre-incubadas con las células B fue significativamente mayor que aquel de los linfocitos T CD4⁺ transmigrados a través de HUTEc no tratadas ($3,3 \pm 0,5 \times 10^5$ versus $1,4 \pm 0,15 \times 10^5$, respectivamente) (Figura 19C). A diferencia de lo observado con linfocitos T CD4⁺, los linfocitos T CD8⁺ no muestran un patrón de trans migración diferencial a través de HUTEc pre-incubadas con las células B (Figura 19B y C). Es interesante destacar, que se observó una disminución en la trans migración de los linfocitos B CD20⁺ a través de HUTEc estimuladas con Ramos con respecto a HUTEc no tratadas ($0,5 \pm 0,15$ % versus $5,6 \pm 2,1$ %, respectivamente). Estos resultados en conjunto sugieren que existe una migración preferencial de linfocitos T CD4⁺ a través de HUTEc pre-incubadas con linfocitos B y la exclusión en la trans migración de otras poblaciones celulares, tales como linfocitos B CD20⁺ (Figura 19D).

Enseguida, evaluamos en los linfocitos T el estado de diferenciación determinado por los marcadores CD45RA (fenotipo virgen) y CD45RO (fenotipo de memoria). El análisis fenotípico de las células transmigradas a través de HUTEc estimuladas con las células B Ramos mostró un mayor número de linfocitos con fenotipo memoria/efector CD45RO⁺ comparada con HUTEc no tratadas ($4,1 \pm 0,5 \times 10^5$ células versus $1,7 \pm 0,1 \times 10^5$ células, respectivamente; Figura 20A). La población linfocitaria CD45RA⁺ no mostró diferencias significativas de trans migración a través de HUTEc pre-incubadas con las células B Ramos comparadas con HUTEc no tratadas ($1,45 \pm 0,17 \times 10^5$ células

versus $2,18 \times 10^5$ células, respectivamente; Figura 20A). Al comparar la trans migración de células $CD45RO^+$ con la trans migración de células $CD45RA^+$ a través de HUTEc estimuladas con células B Ramos se observó una significativa mayor trans migración de linfocitos $CD45RO^+$ que de linfocitos $CD45RA^+$ ($4,05 \pm 0,47 \times 10^5$ células versus $2,18 \pm 0,45 \times 10^5$ células, respectivamente; Figura 20A). Estos resultados muestran que los linfocitos con fenotipo de memoria ($CD45RO^+$) migran preferencialmente a través de HUTEc estimuladas por la adhesión de células B.

Cuando analizamos la expresión de $CD45RA$ y $CD45RO$ en una región correspondiente a los linfocitos T $CD4^+$, encontramos que el número de células T $CD4^+CD45RO^+$ trans migradas a través de HUTEc pre-activadas con linfocitos B fue significativamente mayor a las células T $CD4^+CD45RA^+$ trans migradas ($3,12 \pm 0,4 \times 10^5$ células versus $0,33 \pm 0,2 \times 10^5$ células, respectivamente; Figura 20B)

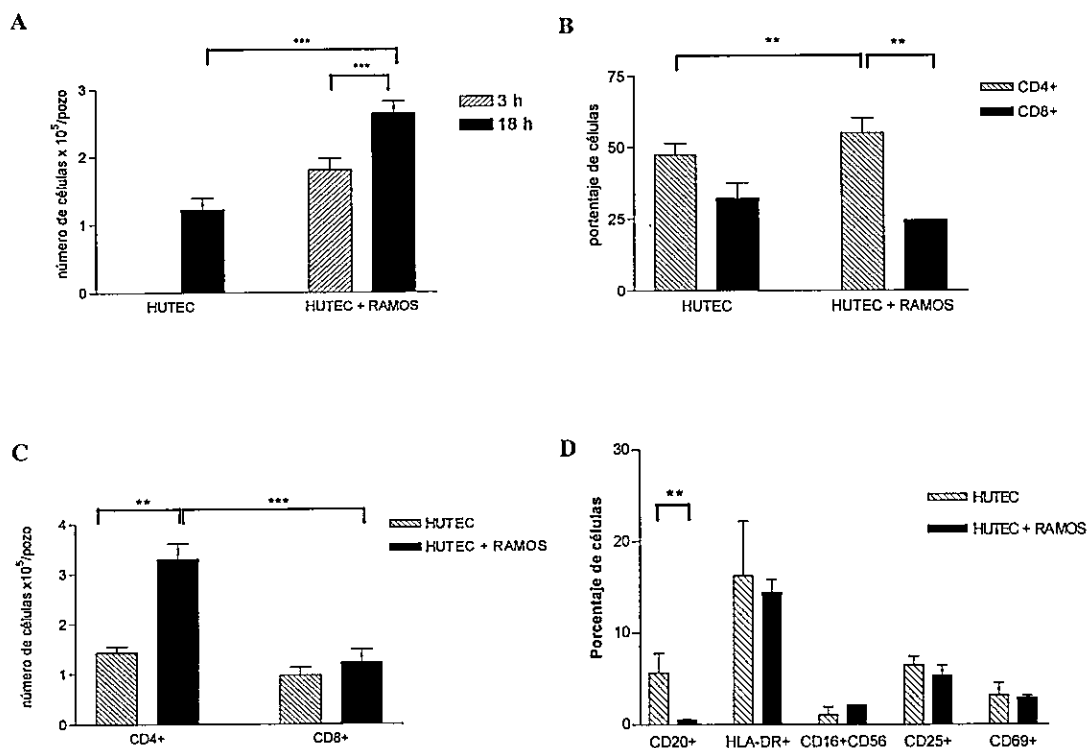


Figura 19. Transmisión preferencial de células T CD4⁺ a través de HUTC co-incubadas con linfocitos B. HUTC se crecieron a confluencia en cámaras "transwell" de 35 mm, se dejaron sin tratar (HUTC) o se pre-incubaron por 96 horas con 3×10^6 de células B Ramos (HUTC + RAMOS). Luego, se agregó 3×10^6 de PBMC y se incubaron durante 3 y 18 horas. Enseguida, se recuperaron las células que transmigraron y se analizaron por citometría de flujo. En (A) se muestra el número de células transmigradas a través de HUTC y HUTC + RAMOS. En (B) se muestra el porcentaje de células transmigradas a través de HUTC y HUTC + RAMOS, en (C) se muestra el número de células CD4⁺ y CD8⁺ transmigradas a través de HUTC y HUTC + RAMOS y en (D) se muestra el porcentaje de células CD20⁺, HLA-DR⁺, CD16⁺CD56⁺, CD25⁺ y CD69⁺ transmigradas a través de HUTC y HUTC + RAMOS. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes \pm media del error estándar (SEM). El análisis estadístico se realizó con el test de varianza ANOVA, con corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. Los niveles mínimos de significancia estadística utilizados fueron $P < 0,01$ (**) y $P < 0,001$ (***)

Aunque en menor escala, en HUTEK no tratadas también se observó una mayor trans migración de linfocitos T $CD4^+CD45RO^+$ con respecto a los linfocitos T $CD4^+CD45RA^+$ ($1,2 \pm 0,2 \times 10^5$ células versus $0,34 \pm 0,2 \times 10^5$ células, respectivamente; Figura 20B). Además, se observó un mayor número de células T $CD4^+CD45RO^+$ trans migradas a través de HUTEK pre-incubadas con las células B que a través de HUTEK no tratadas ($3,1 \pm 0,4 \times 10^5$ células versus $1,9 \pm 0,2 \times 10^5$ células, respectivamente; Figura 20B). Sin embargo, no se observó una diferencia significativa entre los linfocitos T $CD4^+CD45RA^+$ trans migrados a través de HUTEK más Ramos y HUTEK no tratadas ($0,34 \pm 0,2 \times 10^5$ células versus $0,33 \pm 0,1 \times 10^5$ células, respectivamente; Figura 20B). Estos resultados muestran que la subpoblación de células T $CD4^+$ de memoria ($CD4^+CD45RO^+$) trans migran de manera preferencial a través de HUTEK estimuladas por adhesión de linfocitos B.

Al analizar la trans migración de células T $CD8^+$, no encontramos diferencias significativas en las células T $CD8^+CD45RA^+$ trans migradas a través de HUTEK estimuladas por la adhesión de células B comparadas con HUTEK no tratadas ($1,26 \pm 0,4$ % versus $0,8 \pm 0,3$ %, respectivamente; Figura 20C). Del mismo modo, no hubo diferencias significativas al comparar la población de células $CD8^+CD45RO^+$ que trans migraron a través de HUTEK pre-incubadas con las células B comparadas con HUTEK no tratadas ($0,57 \pm 0,15$ % versus $0,4 \pm 0,07$ %, respectivamente; Figura 20C). Es interesante destacar, que el número de células T $CD8^+CD45RA^+$ (fenotipo vírgen) trans migradas a través de HUTEK pre-incubadas con las células B fue significativamente mayor a las células T $CD8^+CD45RO^+$ (fenotipo de memoria) trans migradas ($1,26 \pm 0,4$ %

versus $0,57 \pm 0,15\%$, respectivamente; Figura 20C). Estos resultados sugieren que existiría una trans migración preferencial de linfocitos T $CD8^+CD45RA^+$ (fenotipo virgen) a través de HUTEc estimuladas con células B.

Luego, analizamos el fenotipo de activación de los linfocitos transmigrados con respecto a la expresión de los marcadores CD25, CD69 y HLA-DR. No observamos diferencias significativas en la expresión de estos marcadores en los linfocitos T transmigrados a través de HUTEc pre-incubadas con las células B con respecto a HUTEc no tratadas (Figura 19D).

En conjunto, los resultados obtenidos en la trans migración de PBMC sugieren que los linfocitos T $CD4^+$ de memoria ($CD45RO^+$) y los linfocitos T $CD8^+$ vírgenes ($CD45RA^+$) transmigran preferencialmente a través de HUTEc estimuladas por la adhesión de células B. Además, estos resultados indican que los linfocitos T activados no transmigran a través de HUTEc estimuladas por la adhesión de células B.

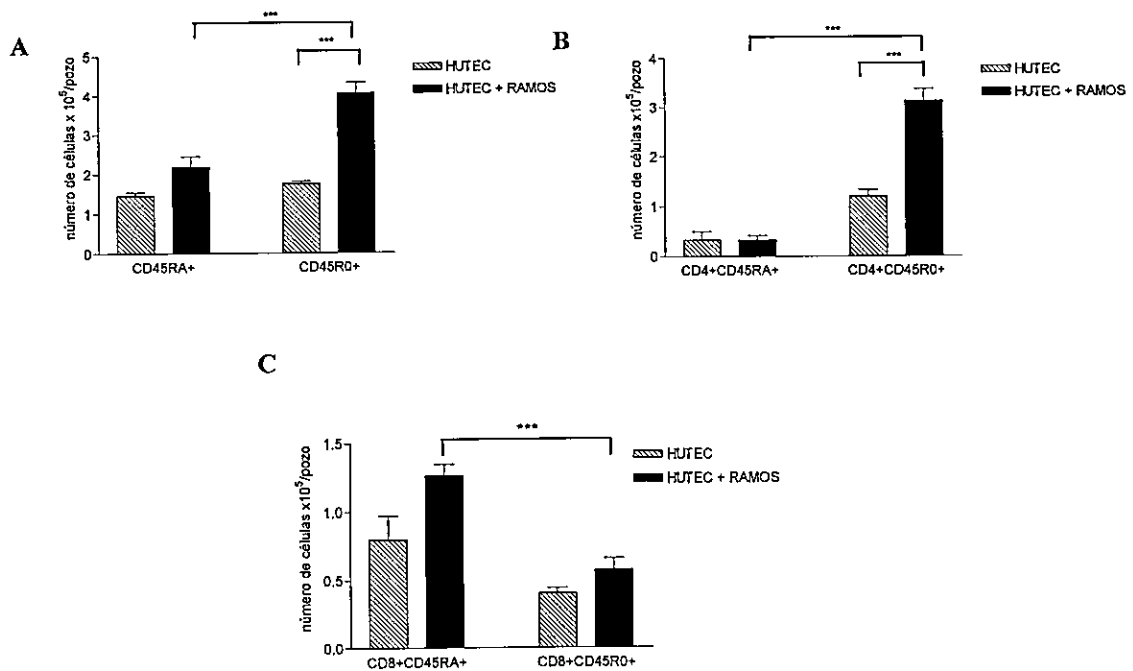


Figura 20. Transmigración preferencial de linfocitos T de memoria CD4⁺CD45RO⁺ a través de HUTEc co-incubadas con células B. HUTEc se crecieron a confluencia en cámara de “transwell” de 35 mm. Las células endoteliales no tratadas (HUTEc) y pre-incubadas por 96 horas con 3x10⁶ de células B Ramos (HUTEc + RAMOS), se incubaron con 3x10⁶ PBMC, a las cuáles se les eliminó previamente las APC, durante 3 y 18 horas. Las células transmigradas se recuperaron y se analizaron para la expresión de los marcadores de diferenciación CD45RA (fenotipo virgen) y CD45RO (fenotipo memoria) mediante citometría de flujo (A). Se analizó la expresión de CD45RA y CD45RO en la subclase de linfocitos T CD4⁺ (B) y la subclase de linfocitos T CD8⁺ (C). Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes ± media del error estándar (SEM). El análisis estadístico se realizó con el test de varianza ANOVA, con corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. El nivel mínimo de significancia estadística utilizado fue P<0,001(***).

Para corroborar que los linfocitos T activados no transmigran a través de HUTEK pre-incubadas con células B, preparamos líneas de linfocitos T activados a partir de cultivos de linfocitos T primarios. Los linfocitos T fueron activados por incubación con el activador policlonal fitohematoglutina (PHA) y bajas dosis de IL-2 durante 1-4 semanas. El fenotipo de las células obtenidas después del cultivo fue 70-80% CD8⁺ y 20-30% de linfocitos T CD4⁺. Además, 30-40% de las células CD8⁺ fue CD25⁺ y un 5-10% fue CD69⁺ (Figura 21). Todos los linfocitos T CD4⁺ presentes en el cultivo expresaron los marcadores CD25 y CD69. Por lo tanto, obtuvimos una población de linfocitos T heterogénea, enriquecida principalmente de linfocitos T CD8⁺.

En cuanto a la expresión de los marcadores de diferenciación, determinamos que 80% de los clones T son CD45RA⁺ y 20% son CD45R0⁺ (Figura 21). Las "células T activadas", se incubaron en "transwell" por 18 horas con HUTEK pre-incubadas con las células B. Después de este período se analizó el fenotipo de las células transmigradas mediante citometría de flujo. Las células que transmigraron corresponden principalmente a linfocitos T CD8⁺ (62,1%), de las cuales 43% presentan fenotipo CD45RA⁺ (virgen). Además, se observó que 11,4% corresponden a linfocitos T CD4⁺ con fenotipo virgen CD45R0⁻CD25⁻CD69⁻ (Figura 22). Estos resultados indican que al incubar linfocitos activados policlonalmente con HUTEK pre-incubadas con las células B, sólo pueden migrar los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ vírgenes, excluyendo a los linfocitos T activados.

Por lo tanto, el conjunto de los resultados de migración *in vitro* nos indican que HUTEK estimuladas por la adhesión de células B permiten la migración preferencial de linfocitos T CD4⁺CD45R0⁺ (fenotipo de memoria) y linfocitos T

CD8⁺CD45RA⁺ (fenotipo vírgen) y no permiten el paso de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ activados.

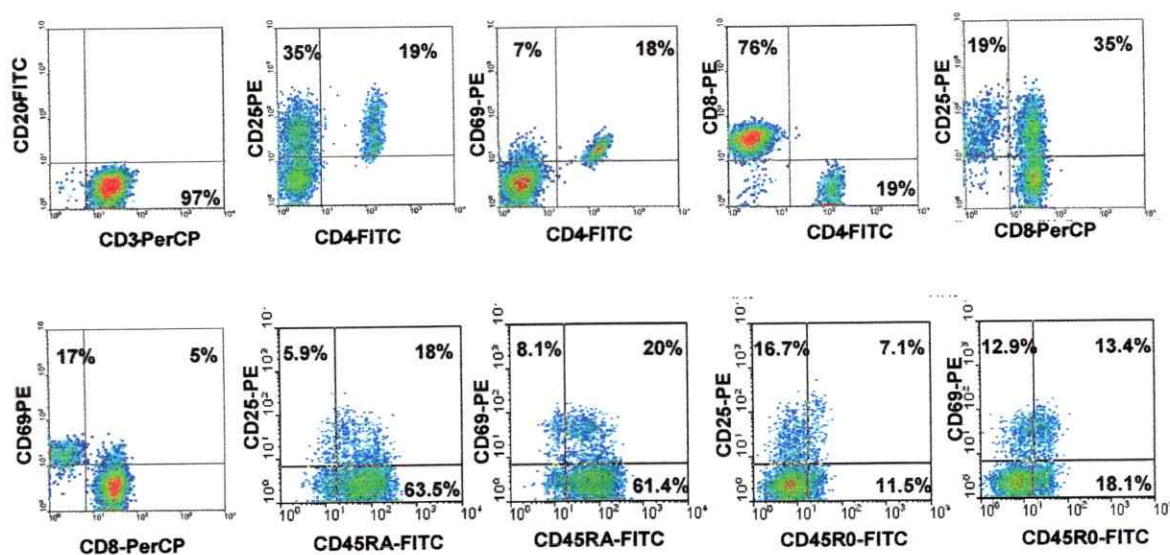


Figura 21. Fenotipo de los linfocitos T activados con PHA e IL-2. Los clones de linfocitos T se prepararon a partir de células aisladas de sangre periférica de donadores sanos por gradiente de Ficoll-Hystopaque. Posteriormente, las células fueron activadas con PHA durante 3 días en medio RPMI-1640 más 10% suero normal de bovino. Luego de lavar, las células se recultivaron en presencia de bajas dosis de IL-2 (2 nM) por 1-4 semanas. Después, se analizaron por citometría de flujo para la expresión de CD3, CD4, CD8, CD20, CD25, CD69; CD45RA y CD45R0. En la figura se muestra el análisis de inmunofluorescencia directa mediante gráficos de densidad de los clones marcados con anticuerpos conjugados directamente con fluoróforo. Los porcentajes de células detectados son indicados en los extremos superiores de los gráficos.

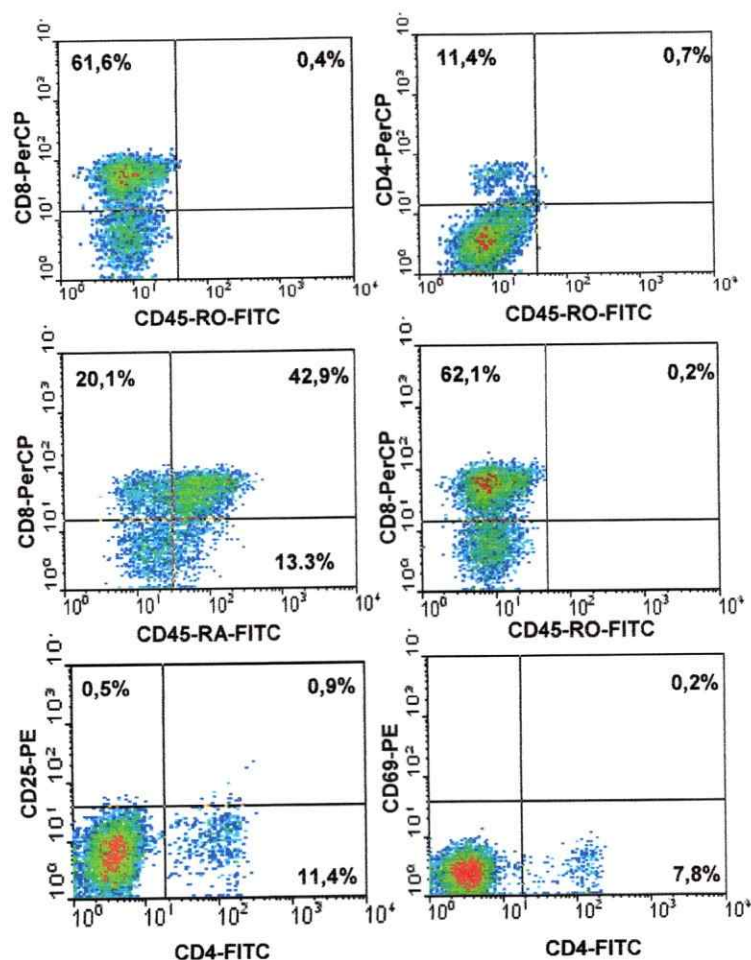


Figura 22. Fenotipo de los linfocitos T transmigrados a través de HUTEc co-incubadas con células B. HUTEc se co-incubaron por 96 horas con las células B Ramos, luego se agregaron linfocitos T activados y se les permitió transmigrar durante 18 horas. Los linfocitos transmigrados fueron marcados con los anticuerpos anti-CD4, CD8, CD25, CD69, CD45RA y CD45R0 y se analizó por citometría de flujo. Los porcentajes de células positivas para cada marcador son indicados en los extremos superiores de los gráficos.

IV. DISCUSIÓN

1. La adhesión de linfocitos B induce la expresión de las moléculas MHC-II en células endoteliales de amígdala humana por un mecanismo independiente de CIITA.

Las vénulas endoteliales columnares (HEV) están formadas por células especializadas que permiten la adhesión y la transmigración de linfocitos dentro de los órganos linfoides secundarios, tales como nódulos linfáticos, placas de Peyer y amígdalas (9, 89). A diferencia de las células endoteliales planas, las HEV presentan características particulares que permiten que los linfocitos se adhieran y transmigren al interior del órgano linfoide (3, 16, 17). Se ha descrito que las células que atraviesan las HEV expresan en su superficie determinadas moléculas de adhesión y receptores de quimioquinas que interactúan con sus ligandos expresados en HEV (51). Las moléculas L-Selectina y CCR7 expresadas en los linfocitos T y B vírgenes y en los linfocitos T de memoria central son determinantes para el ingreso a los OLS. En cambio, los linfocitos T activados y los linfocitos T de memoria/efectores no son capaces de interactuar con HEV, debido a que no expresan L-Selectina ni CCR7 (35, 90). Por lo tanto, la

interacción entre linfocitos y el endotelio a través de determinadas moléculas es esencial para que exista trans migración preferencial de linfocitos al interior del órgano linfoide secundario.

Previamente demostramos, que cultivos primarios de células endoteliales columnares derivadas de amígdala humana (HUTEC), al interactuar con linfocitos B, cambian transitoriamente el patrón de fosforilación de los residuos tirosinas de proteínas como la proteína quinasa de adhesión focal (FAK), paxilina y la proteína quinasa activada por mitógeno-2 (ERK-2), involucradas en la transducción de señales (78). Además, durante el desarrollo de esta tesis demostramos que la interacción de los linfocitos B con HUTEC induce la activación de NF- κ B, lo cual es mediado por la participación de factores solubles (79). Estos trabajos demuestran que la interacción de los linfocitos B con las células endoteliales columnares activa o prepara al endotelio, posiblemente para permitir la posterior trans migración de los linfocitos al interior de los OLS.

Los resultados de esta tesis muestran que la interacción de los linfocitos B con HUTEC permite la expresión de las moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) en HUTEC (Figura 2 y 3). La expresión de las moléculas MHC-II en HUTEC no se produce por la adhesión de linfocitos T (Figura 4). Aunque en nuestro laboratorio demostramos que las líneas celulares B Daudí y Ramos, y las líneas celulares T Jurkat y MolT-4 se adhieren de manera similar a HUTEC (80). Sin embargo, las moléculas involucradas en la adhesión de las líneas celulares B y T son diferentes, ya que la adhesión de las células B Ramos es dependiente de la interacción de VLA-4 (compuesta

por las integrinas $\alpha 4$ y $\beta 1$) y la adhesión de las células T Jurkat depende principalmente de VLA-5 (80). La incubación con el anticuerpo anti-integrina $\alpha 4$, HP2/1, inhibe 80% de la adhesión de las células B Ramos a HUTEc (80, 91). Al utilizar este mismo anticuerpo para analizar la dependencia de la adhesión en la inducción de MHC-II en HUTEc, observamos inhibición de la inducción del mRNA de MHC-II en HUTEc. Por lo tanto, la inducción de MHC-II en HUTEc es dependiente de la adhesión de las células B. Existen algunos trabajos en la literatura en los que se muestra que el contacto celular induce la expresión de moléculas de adhesión y citoquinas (92, 93). Se ha demostrado, que la adhesión de las células NK y los linfocitos T a células endoteliales derivadas de cordón umbilical humano HUVEC, induce la expresión de MHC-II a través de la activación de moléculas de adhesión, o de la expresión y secreción de IFN- γ (71-73, 94).

El objetivo de esta tesis fue determinar cómo se producen las moléculas MHC-II mediada por la adhesión celular, pero además estudiar el papel funcional de estas moléculas. Pensamos que esta expresión debía afectar principalmente a los linfocitos T CD4⁺, ya que estos interactúan con las moléculas MHC-II.

Se ha descrito, que tanto la expresión constitutiva (67) como inducible (63, 83) de MHC-II dependen de la expresión del transactivador de clase II, CIITA (95). Sin embargo, en esta tesis mostramos que la expresión de MHC-II no se acompañó de la expresión de mRNA para CIITA en HUTEc co-incubadas con células B (Figura 6 y 9).

La confirmación de la eliminación de las células B de los co-cultivos con HUTEc fue primordial para los experimentos de RT-PCR, ya que las células B expresan

constitutivamente MHC-II. Por esta razón, utilizamos lisis por complemento después de la co-incubación con las células B, logrando la eliminación de los linfocitos B.

Se ha descrito que la expresión de MHC-II es inducida en diversos tipos celulares por varios estímulos, de los cuales IFN- γ es el más potente (63, 64). Los resultados de esta tesis confirman que IFN- γ no estaría involucrado en la expresión de MHC-II en HUTEK inducida por la adhesión de células B, ya que no se detectó IFN- γ en los sobrenadantes de los co-cultivos mediante ELISA de captura. Además, las cinéticas de expresión de los mRNA de los isotipos de MHC-II inducidos por la adhesión de células B son diferentes de las inducidas por IFN- γ (Figura 10). En todos los casos la expresión de los mRNA es más temprana y disminuye al cabo de 96h.

Varios estudios han demostrado expresión de MHC-II independiente de CIITA (96, 97). Se ha descrito que ratones deficientes en la expresión de CIITA expresan MHC-II en células reticulares interdigitantes de la corteza del timo (74). Además, se ha reportado la expresión independiente de CIITA del isotipo HLA-DQ en una línea celular deficiente en CIITA (96, 97).

Otros investigadores han informado que el virus de parainfluenza humana de tipo 3, HPVI3, induce la expresión de MHC-II en células epiteliales de manera independiente de STAT-1 y CIITA (77). En un trabajo publicado recientemente, Buch y colaboradores utilizaron ratones doble deficientes de CIITA y de otro factor de transcripción que regula la expresión de MHC-II, RFX-5, en los cuales se indujo un aumento en la expresión de MHC-II en las células epiteliales medulares y en células dendríticas de timo y bazo mediante la infusión de linfocitos T CD4⁺ (76). Además, estos autores encontraron niveles aún mayores de MHC-II en células dendríticas de los ganglios linfáticos de los

ratones “*knockout*” para CIITA y en los dobles mutantes RFX-5^{-/-}/CIITA^{-/-}. Estos autores no determinaron el mecanismo por el cual se induce la expresión de MHC-II de manera independiente de CIITA en estos ratones deficientes, pero sí determinaron que esta inducción depende del contacto celular y del estado de madurez de las células dendríticas (76).

Otro reporte interesante ha mostrado que la adhesión de las células NK induce la expresión de MHC-II de manera independiente de IFN- γ y CIITA en células endoteliales derivadas de cordón umbilical HUVEC. Estos autores demostraron que la interacción entre ICAM-1 y la integrina β 2 (LFA-1) es crítica para la inducción de MHC-II (72, 73). Por lo tanto, la inducción de MHC-II independiente de CIITA parece ser un mecanismo utilizado por varios tipos celulares, además de las células endoteliales. Además, la expresión de MHC-II de manera independiente de CIITA parece ocurrir por un mecanismo altamente regulado, dado que se ha observado sólo bajo determinadas condiciones (73, 77, 87, 96).

2. Análisis de las moléculas de adhesión y de factores solubles implicados en la inducción de MHC-II en HUTEK mediada por la adhesión de células B.

Puesto que demostramos que la expresión de MHC-II en HUTEK depende de la adhesión de las células B, intentamos identificar las moléculas de adhesión o factores solubles involucrados en la inducción. Como se mencionó previamente, se ha informado

que las moléculas MHC-II pueden ser expresadas en forma independiente de CIITA en células endoteliales debido al contacto con las células NK (72, 73). Estos autores demostraron que la expresión de MHC-II depende de la interacción LFA-1/ICAM-1. Por lo tanto, evaluamos la participación de ICAM-1 en la inducción de MHC-II en HUTEc. Para esto utilizamos dos estrategias experimentales: activar ICAM-1 en HUTEc mediante el entrecruzamiento con anticuerpos monoclonales o bien bloquear la interacción de ICAM-1 con su ligando mediante la incubación con un anticuerpo bloqueador de ICAM-1 en los co-cultivos de HUTEc con células B (Figura 12 y Figura 13). El análisis de la expresión de MHC-II en HUTEc se hizo a nivel de mRNA y ninguna de las dos estrategias afectó la expresión de MHC-II en HUTEc inducida por la adhesión de células B.

Enseguida evaluamos el aporte de otras moléculas de adhesión importantes en la función endotelial expresadas en HUTEc, tales como la integrina $\beta 1$, la integrina $\alpha 4$ y CD40. Nosotros, previamente demostramos que estas mismas moléculas son importantes en la transducción de señales en HUTEc (78). La participación de estas moléculas de adhesión en la inducción de MHC-II en HUTEc fue evaluada mediante ensayos de entrecruzamiento con anticuerpos monoclonales. Los resultados mostraron que la activación de las integrina $\alpha 4$ y CD40 no inducen la expresión de MHC-II en HUTEc. En cambio, al activar la integrina $\beta 1$ en HUTEc, observamos un leve aumento en la expresión de MHC-II (Figura 13). Es probable que la integrina $\beta 1$ participe en la inducción de MHC-II en HUTEc combinada con la activación de otras moléculas o en sinergia con éstas. Al menos, en esta tesis descartamos la participación cooperativa de la

integrina $\alpha 4$ y CD40, ya que no observamos aumento en la inducción de la expresión de MHC-II después de incubar con la mezcla de anticuerpos dirigidos contra estas moléculas. Por lo tanto, los resultados de esta tesis sugieren que al menos la integrina $\beta 1$ estaría involucrada en la inducción de MHC-II en HUTEc.

Se ha descrito que la integrina $\beta 1$ es importante en la transvasación de los linfocitos T a los ganglios linfáticos (17, 29, 30, 34, 98). Existen numerosos reportes que demuestran la participación de la integrina $\beta 1$ en la expresión de diversos genes (99-102). En monocitos humanos, la activación de las integrinas $\beta 1$ mediante entrecruzamiento con anticuerpos monoclonales induce la expresión de genes tempranos mediadores de la inflamación, tales como IL-1 β y el antagonista del receptor de IL-1 (99). Además, Fan y colaboradores mostraron que en la línea celular derivada de monocitos humanos THP-1, la activación de la integrina $\beta 1$ indujo la expresión del Factor de Tejido (TF) y TNF- α (100, 101). Otro ejemplo de esto se ha descrito en linfocitos T CD4⁺, donde se determinó que la unión del ligando de la integrina $\beta 1$, fibronectina, induce la transcripción de genes activados por el factor transcripcional AP-1, la cual fue inhibida por la unión de anticuerpos bloqueadores de la integrina $\beta 1$ (102). En las células endoteliales columnares, hemos descrito que la activación de la integrina $\beta 1$ por entrecruzamiento con anticuerpos monoclonales induce la expresión transitoria de mRNA para IL-6 (78). Además, como mencionamos anteriormente, al activar la integrina $\beta 1$ se induce la fosforilación en residuos tirosina de las proteínas FAK, paxilina y ERK-2, las cuales están involucradas en la transducción de señales que conducen a la transcripción génica de numerosos genes (78, 103, 104).

Es sabido que el contacto célula-célula activa cascadas de transducción de señales que conllevan a la secreción de quimioquinas y citoquinas por parte de las células endoteliales columnares (93, 105-108). Por lo tanto, es probable que factores solubles secretados por HUTEc activadas por la adhesión de linfocitos B, induzcan la expresión de MHC-II.

Se ha descrito que células endoteliales de cornea y cerebro, que no expresan normalmente MHC-II y que no responden a IFN- γ , expresen MHC-II después de ser tratadas con una mezcla de TNF- α e IFN- γ . Estos autores demostraron que la expresión de MHC-II en esas células fue independiente de CIITA (87). Para evaluar la participación de factores solubles en nuestro sistema, incubamos HUTEc con los sobrenadantes obtenidos de los co-cultivos entre células B y HUTEc. Sin embargo, no observamos inducción de MHC-II en HUTEc después de dicho tratamiento. Aún así, evaluamos la presencia de IFN- γ y otras citoquinas como TNF- α , LT- α y LT- β en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA y un bioensayo. Los sobrenadantes no presentaron actividad biológica atribuible a la presencia de tales citoquinas (79), lo que demuestra que estas citoquinas, al menos, no están involucradas en la expresión de MHC-II en HUTEc inducida por la adhesión de células B.

3. Las moléculas MHC-II expresadas en HUTEK por la adhesión de células B podrían potencialmente participar en la presentación antigénica.

La función de las moléculas MHC-II es la presentación de antígenos exógenos por parte de las células presentadoras de antígeno (células dendríticas, linfocitos B y macrófagos) a linfocitos T CD4⁺. La presentación antigénica puede ocurrir en diversos tipos celulares como células endoteliales y células epiteliales por la acción de IFN- γ , la citoquina más potente en la inducción de moléculas MHC-II (58). Los péptidos antigénicos son presentados en el contexto de las moléculas MHC-II a los linfocitos T CD4⁺, los cuales reconocen las moléculas MHC-II a través de su receptor para el antígeno o TCR.

Se desconoce el papel funcional de las moléculas MHC-II expresadas en HEV de los órganos linfoides secundarios. Posiblemente, estas moléculas MHC-II también participen en la presentación antigénica a linfocitos T CD4⁺, ya que se ha descrito que células endoteliales vasculares derivadas de cordón umbilical activadas previamente con citoquinas son capaces de presentar aloantígenos y de estimular la proliferación de linfocitos T CD4⁺ (109-112).

En humanos existen tres isotipos de moléculas MHC-II, las cuales se expresan en forma coordinada. Sin embargo, se ha informado en ciertas patologías una descoordinación en la expresión de los isotipos MHC-II (113, 114). La existencia de estos isotipos ha sido planteada como una ventaja evolutiva, ya que permite presentar

una mayor variedad de péptidos antigénicos a los linfocitos T CD4⁺. Puesto que desconocemos el papel funcional de las moléculas MHC-II expresadas por la adhesión de células B en HUTEc nos pareció interesante investigar si la adhesión celular permitía la expresión de todos los isotipos MHC-II.

Los resultados de esta tesis muestran que la co-incubación de células B con HUTEc induce la expresión de los tres isotipos de MHC-II, HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP en la superficie de HUTEc (Figura 8). Aunque existen diferencias en los niveles de expresión de los distintos isotipos MHC-II al incubar con diferentes células B, es posible que estas diferencias estén dadas por diferencias en la densidad o grado de activación de moléculas de adhesión expresadas en los distintos cultivos de linfocitos B que interactúan con HUTEc. Los resultados de este trabajo nos permiten concluir que las moléculas MHC-II producidas por la adhesión de células B en HUTEc se inducen de manera independiente de CIITA, las cuales podrían estar participando en la presentación antigénica, ya que se expresan en la superficie celular de HUTEc, los tres isotipos de MHC-II y las moléculas accesorias Ii y HLA-DM.¹

Otra forma de evaluar si las moléculas MHC-II en HUTEc son potencialmente capaces de presentar antígenos es analizando la biosíntesis de las moléculas MHC-II y de las moléculas accesorias como la cadena invariante y los derivados de su degradación proteolítica CLIP y LIP. La biosíntesis de las moléculas MHC-II ha sido extensamente caracterizada en células presentadoras de antígeno profesionales y en células tratadas con IFN- γ (para revisión ver (61)). En esta tesis comparamos la composición de las moléculas MHC-II en HUTEc inducidas por IFN- γ con la inducida por la adhesión de

células B. No observamos diferencias en la composición de las moléculas MHC-II ni en su asociación a la cadena invariante (Figura 14). Sin embargo, al analizar por RT-PCR la cinética de inducción de la expresión de los mRNAs de los isotipos de MHC-II: HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ y de las moléculas accesorias HLA-DM e *Ii*, observamos diferencias significativas entre IFN- γ y la adhesión de células B (Figura 10 y Figura 11). La presencia de los RNA mensajeros de los isotipos de MHC-II en HUTEc inducidos por la adhesión de células B es transitoria, en cambio en HUTEc tratadas con IFN- γ los mRNA aumentan progresivamente a lo largo del tratamiento. Esto último sugiere que las moléculas MHC-II inducidas por la adhesión de células B podrían tener una función diferente a la presentación antigénica. Debido a que las HEV interactúan activamente con los linfocitos durante la trans migración linfocitaria, postulamos que la expresión de las moléculas MHC-II en estas células inducidas por la adhesión de células B, podrían tener un papel en la activación, proliferación o trans migración de linfocitos T.

4. La adhesión de células B a HUTEc permite la trans migración preferencial de los linfocitos T CD4⁺ de memoria.

El efecto que ejerce el reconocimiento de las moléculas MHC-II en células endoteliales por los linfocitos T CD4⁺ ha sido controversial. Por una parte, algunos investigadores han propuesto que esta interacción podría afectar la supervivencia de los linfocitos T (115-118) y otros han propuesto que induciría la proliferación de éstos (112, 119, 120). Además, se ha descrito que las células endoteliales activadas con IFN- γ son

capaces de aumentar la producción de IL-2 y por ende la proliferación de los linfocitos T de memoria (112, 120). En esta tesis se evaluó la expresión de marcadores de activación en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ después de la co-incubación con HUTEc pre-incubadas con las células B. Si bien observamos una población linfocitaria en la cual se inducía la expresión de los marcadores CD25 y CD69, esta expresión fue temporal, disminuyendo a los niveles basales después de 72 horas de estimulación y en ningún caso se observó proliferación, la cual debería ser una consecuencia de la activación (Figura 16). Esta falta de proliferación en los linfocitos T, puede deberse a la ausencia de moléculas co-estimuladoras B7 en HUTEc.

Se ha descrito, que células endoteliales vasculares activadas con IFN- γ , en ausencia de las moléculas co-estimuladoras B7, inducen anergia en los linfocitos T (121). Debido a que HUTEc pre-incubadas con los linfocitos B fueron capaces de activar temporalmente a los linfocitos T, sin estimular la proliferación, investigamos si en los linfocitos así tratados, se induce apoptosis. Observamos una disminución en la apoptosis de células mononucleares después de incubarlas con HUTEc pre-incubadas con los linfocitos B con respecto a las células mononucleares co-incubadas sólo con los linfocitos B (Figura 17). Se ha descrito que clones de linfocitos T generados *in vitro* en presencia de IL-2, mueren por apoptosis al privarlos de IL-2. Sin embargo, al permitirles transmigrar a través de células endoteliales de cordón umbilical tratadas con IFN- γ , se inhibe la apoptosis, por un mecanismo dependiente de adhesión (81). Por lo tanto, es posible que las HEV inhiban la apoptosis de los linfocitos que transmigran al interior de los órganos linfoides secundarios.

Se ha demostrado a través de experimentos *in vitro*, que la interacción de linfocitos con células endoteliales vasculares activadas con citoquinas, juega un papel importante en la trans migración linfocitaria (98, 122-124). Además, se ha descrito que células endoteliales vasculares tratadas con IFN- γ son capaces de presentar antígenos bacterianos en moléculas MHC-II, aumentando la trans migración de linfocitos, sin aumentar la proliferación de las células transmigradas (125). Debido a que la función principal de las HEV en los OLS es permitir la transvasación de los linfocitos, analizamos si existía migración preferencial de alguna sub-población linfocitaria al interactuar con HUTEK pre-incubadas con las células B. Es importante destacar, que en esta tesis determinamos que los linfocitos T con fenotipo de memoria (CD45RO⁺), presentaron una trans migración preferencial a través de HUTEK pre-incubadas con células B (Figura 18A). La información que existe acerca de las señales que dirigen el “homing” de linfocitos T de memoria a los OLS es escasa, a diferencia del “homing” de linfocitos T vírgenes a ganglios linfáticos, el cual ha sido bastante caracterizado y donde se conocen determinantes moleculares involucrados en este proceso, tales como CCR7 y L-selectina (29, 126).

Sallusto y colaboradores, clasificaron los linfocitos de memoria en linfocitos de memoria efectoros (T_{ME}) y linfocitos de memoria central (T_{MC}), los cuales presentan diferentes patrones de migración (23). Los T_{MC} pueden recircular por el organismo e ingresar a los órganos linfoides secundarios y los T_{ME} sólo migran a los tejidos linfoides terciarios para ser activados rápidamente frente al estímulo antigénico (23). Según estos autores, la expresión de CCR7 y L-Selectina permitiría el ingreso de los linfocitos a los

OLS y la ausencia de estas moléculas determinaría la salida de los OLS (9, 23). Sin embargo, no basta con la ausencia de estas moléculas para definir la migración de las células de memoria central, ya que los ratones deficientes en CCR7 presentan un compartimiento de células B poco afectado y con numerosas células de memoria (127, 128). Esto indica que los linfocitos B y T de memoria responden a señales diferentes o adicionales en las HEV de ganglios linfáticos que no son reconocidas por los linfocitos T vírgenes (9, 23).

En esta tesis demostramos que los linfocitos T CD4⁺ de memoria transmigran preferencialmente a través de HUTEK activadas con células B. Recientemente, se ha descrito que el receptor de quimioquina CXC de tipo 3 (CXCR3) es un marcador de superficie de linfocitos T CD4⁺ de memoria/efectora que transmigran a través de células endoteliales derivadas de microvasculatura de cerebro activadas con citoquinas. Sin embargo, CXCR3 no tiene un papel importante en la extravasación de estos linfocitos (129). Además, Manes y colaboradores demostraron que células endoteliales derivadas de cordón umbilical (HUVEC), sólo después de ser tratadas con TNF- α inducen una trans migración rápida y dependiente de flujo de linfocitos T de memoria (130). Un estudio reciente realizado *in vivo*, en el cual se transfirieron linfocitos de memoria obtenidos de un ratón con artritis inducida por inyección de colágeno a un ratón SCID (inmunodeficiente), mostró un "homing" similar de los linfocitos transferidos, tanto a tejido inflamado, como a los órganos linfoides secundarios(131). En ese trabajo, no se identificaron los determinantes de "homing" a órgano linfoide secundario, excepto las moléculas descritas previamente ICAM-1 y CCR7, las cuales son importantes, pero no

esenciales, para el "homing" (131). En el contexto de este trabajo, hubiese sido interesante determinar la expresión de CCR7 y L-selectina en los linfocitos T CD4⁺CD45RO⁺ transmigrados a través de HUTEc pre-incubadas con las células B, de manera de determinar si efectivamente corresponden a T_{EM} o T_{CM}, pero la falta de anticuerpos contra CCR7 no hizo posible obtener este resultado.

Previamente, se reportó que el reconocimiento de antígenos presentados por células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC) activadas con IFN- γ , aumentaban la trans migración de las células T CD4⁺ con fenotipo de memoria (125). Además, se informó que HUVEC crecidas en geles de colágeno permitían la trans migración de una subclase de las células T CD4⁺ de memoria, las cuales expresan CD45RO⁺, L-selectina⁻, CD11a⁺, CD26⁺, CD44⁺ y CD49⁺ (123). Además, estos autores demostraron que la activación de células endoteliales con citoquinas tales como IFN- γ , IL-1 y TNF- α permiten la trans migración de una población de células T CD69⁺ (123). Existen numerosos reportes que demuestran que los linfocitos activados migran a los sitios de inflamación, es decir a los tejidos linfoides terciarios para realizar su función efectora y no a los órganos linfoides secundarios (9, 21-23). En los sitios de inflamación, las células endoteliales están bajo la acción de citoquinas proinflamatorias, tales como IFN- γ y TNF- α , las cuales inducen el fenotipo tipo HEV que permite la trans migración linfocitaria. En esta tesis no se detectó la presencia de estas citoquinas en el sobrenadante de las células HUTEc co-incubadas con células B, posiblemente es la razón por la cual no se observó la trans migración de los linfocitos T CD4⁺CD25⁺CD69⁺ (activados) (Figura 18). Estos resultados sugieren que los linfocitos activados y linfocitos de memoria/efectores no

transmigran a través de HUVEC previamente estimuladas por la adhesión de células B. Nuestros resultados de migración preferencial de los linfocitos T CD4⁺ de memoria a través de HUVEC activadas por la adhesión de células B fueron corroborados con los experimentos de trans migración *in vitro* de clones de células T activados policlonalmente con PHA en presencia de IL-2 (Figura 19D). Las células activadas *in vitro* no fueron capaces de trans migrar a través de HUVEC preincubadas con las células B.

Los experimentos de trans migración de esta tesis fueron realizados *in vitro*, por lo tanto constituyen una base para iniciar estudios de "homing" *in vivo* dirigidos específicamente a evaluar el papel de MHC-II en la trans migración. Es importante señalar que estos experimentos se realizaron con células primarias humanas, lo cual permite una extrapolación más directa a lo que podría ocurrir normalmente en humano. De todas maneras, sería interesante realizar estos estudios en modelos murinos deficientes en la expresión de MHC-II, por ejemplo, para determinar el patrón de "homing" de células T de memoria central reinfundidas en estos animales.

Por otra parte, sería interesante analizar la expresión de MHC-II en células endoteliales columnares de los OLS de ratones deficientes en CIITA. Sin embargo, estos ratones poseen menor número de linfocitos B, los cuales no presentan moléculas MHC-II, por lo que sería conveniente inyectar previamente linfocitos B provenientes de un ratón silvestre (74-76).

Los resultados de esta tesis nos permiten proponer el siguiente modelo, en el cual, como un proceso homeostático, los linfocitos B que fluyen por el torrente sanguíneo, se adhieren al endotelio columnar en los órganos linfoides secundarios e inducen la expresión de MHC-II. Estas moléculas MHC-II son reconocidos por los linfocitos T

CD4⁺, lo cual gatilla señales que permiten la trans migración, específicamente de células T CD4⁺ de memoria. Estas señales son insuficientes para inducir la activación y la proliferación de los linfocitos, ya que las HEV carecen de las moléculas co-estimuladoras apropiadas para activar eficientemente a los linfocitos. Sin embargo, estas señales aumentarían la sobrevivencia de los linfocitos al interior del órgano linfóide secundario, permitiendo que se mantengan viables frente a un cambio en el microambiente.

Por lo tanto, esta tesis hace una importante contribución al estudio de los mecanismos moleculares que regulan la migración de linfocitos T CD4⁺ de memoria a los órganos linfoides secundarios. Determinamos que la adhesión de linfocitos B induce la expresión de MHC-II en HEV, permitiendo una migración preferencial de linfocitos T con el fenotipo de memoria (CD4⁺RO⁺CD25⁻CD69⁻). Estos resultados constituyen antecedentes nuevos y datos importantes para el estudio de la respuesta inmune durante el proceso homeostático de la recirculación linfocitaria.

V. RESUMEN DE RESULTADOS

1. La adhesión de linfocitos B, pero no de linfocitos T, a células endoteliales columnares de amígdala humana induce la expresión del RNA mensajero y la presencia en la superficie celular de moléculas MHC-II, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ. La presencia de los isotipos de MHC-II en HUTEc inducidos por la adhesión de linfocitos B es transitoria, a diferencia de los mRNA inducidos después del tratamiento con IFN- γ , cuya expresión aumenta en función del tiempo.

2. La adhesión de células B a HUTEc induce la expresión de los mRNA de las moléculas accesorias HLA-DM y la cadena invariante (*Ii*), cuya cinética de expresión también difiere de la inducida por IFN- γ .

3. La composición bioquímica de las moléculas MHC-II inducidas por IFN- γ y por adhesión de células B son similares, lo cual sugiere la participación de estas moléculas en presentación antigénica.

4. La inducción de la expresión de las moléculas MHC-II en HUTEc por adhesión de células B es independiente de la expresión de CIITA y de la activación de

las moléculas de adhesión ICAM-1, LFA-1 y CD40. El entrecruzamiento de la integrina $\beta 1$ del complejo VLA-4 induce un leve aumento de la expresión del RNA mensajero de MHC-II en HUVEC, sugiriendo un posible papel en la inducción de estos mensajeros en las células endoteliales columnares.

5. Las citoquinas IFN- γ , TNF- α , LT- α y LT- β no participan en la inducción de moléculas MHC-II en células endoteliales columnares mediada por adhesión de linfocitos B.

6. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ adquieren transitoriamente los marcadores de activación CD69 y HLA-DR al ser incubados con HUVEC pre-tratadas con linfocitos B. Esta activación no es suficiente para permitir la proliferación de los linfocitos, pero sí un aumento en la sobrevivencia de los linfocitos.

7. HUVEC co-incubadas con células B permiten la trans migración preferencial de linfocitos T CD4⁺CD45R0⁺ de memoria y excluyen a los linfocitos T activados.

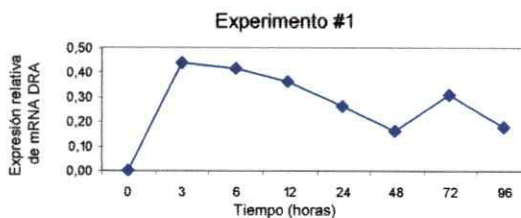
VI. ANEXOS

Anexo 1. Cinética de expresión del mRNA de las moléculas MHC-II inducidas por IFN- γ y por la adhesión de células B en HUTEc. En el anexo se muestran 3 experimentos independientes de HUTEc co-cultivadas con células Ramos durante 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas y analizadas por RT-PCR para la expresión de mRNA de HLA-DRA , HLA-DPA, HLA-DQA y de la cadena invariante (Ii), HLA-DMA y CIITA. Como control de carga y de expresión se amplificó β -actina. El anexo incluye 2 experimentos independientes realizados como control positivo de expresión de mRNA de los genes analizados, en los cuales se utilizó HUTEc tratadas con IFN- γ durante los mismos tiempos.

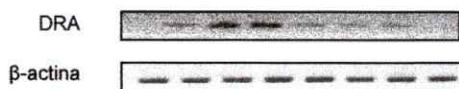
Anexo 1

Cinética de expresión de mRNA de DRA en HUTEc co-incubadas con Ramos

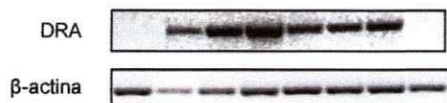
TIEMPO (horas) 0 3 6 12 24 48 72 96



TIEMPO (horas) 0 3 6 12 24 48 72 96

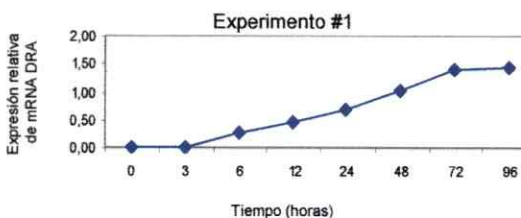
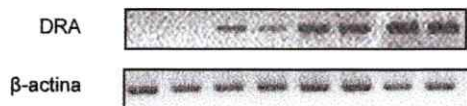


TIEMPO (horas) 0 3 6 12 24 48 72 96

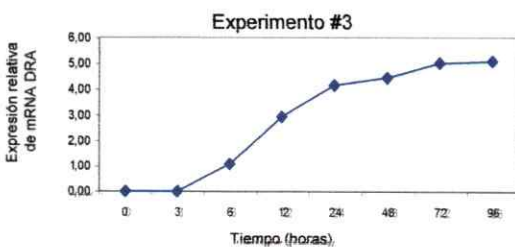
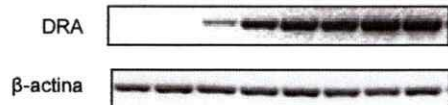


Cinética de expresión de mRNA de DRA en HUTEc tratadas con IFN-gama

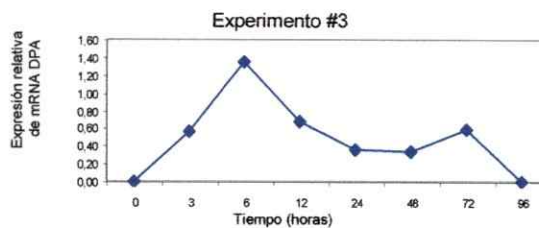
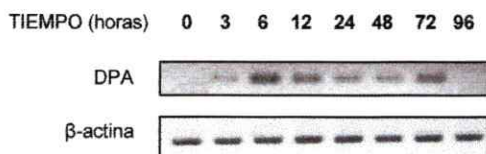
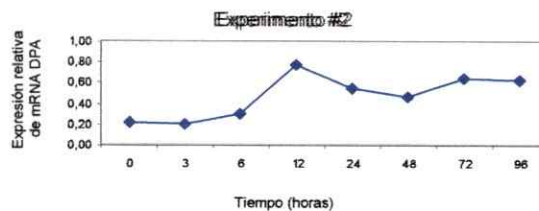
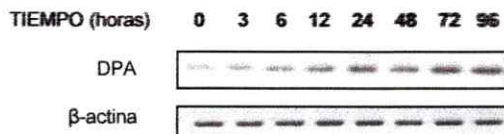
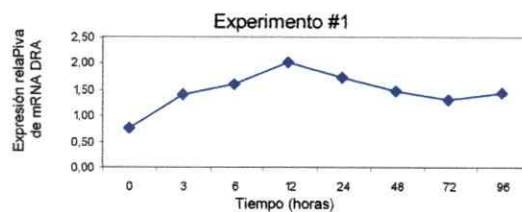
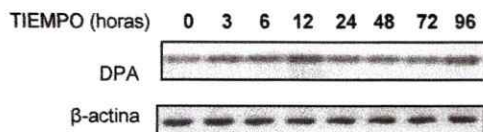
TIEMPO (horas) 0 3 6 12 24 48 72 96



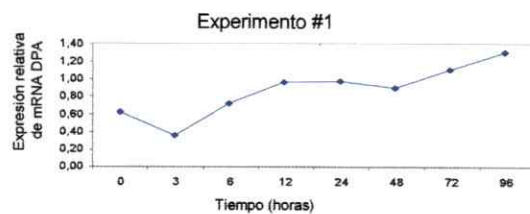
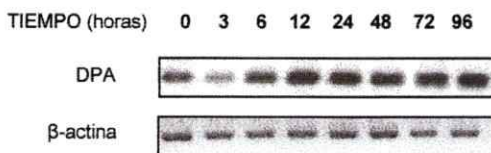
TIEMPO (horas) 0 3 6 12 24 48 72 96



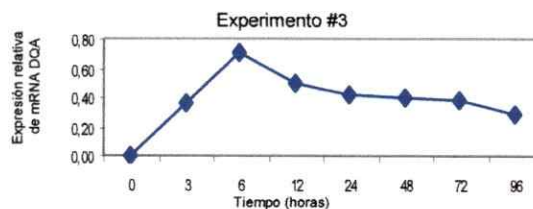
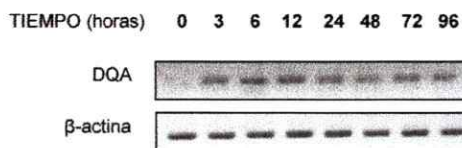
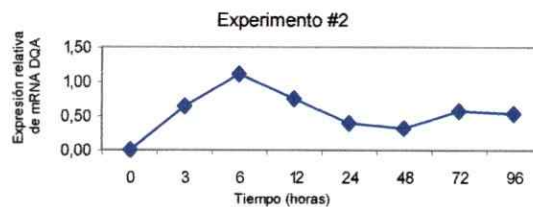
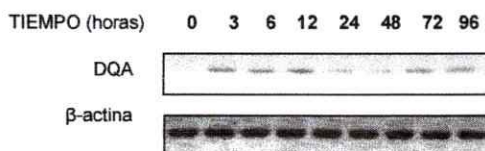
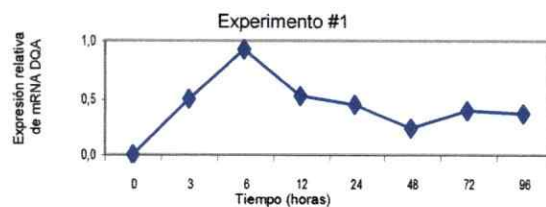
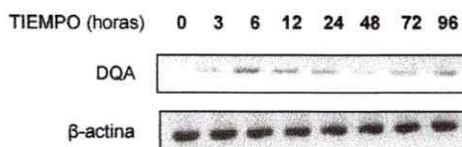
Cinética de expresión de mRNA de DPA en HUTEc co-incubadas con Ramos



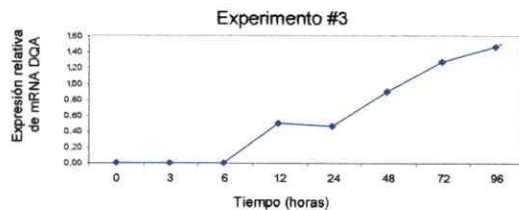
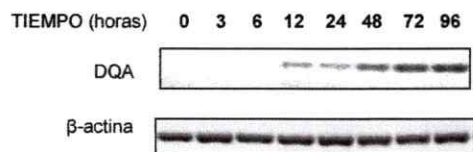
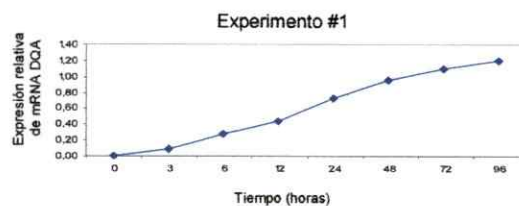
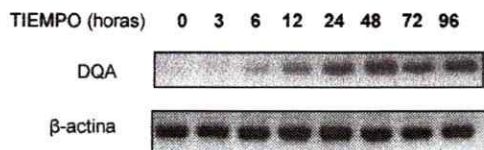
Cinética de expresión de mRNA de DPA en HUTEc tratadas con IFN-gama



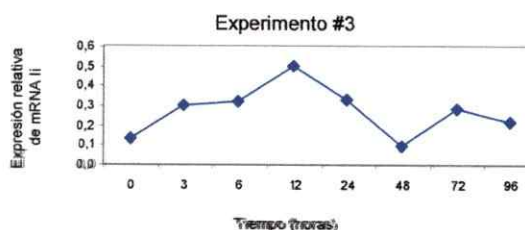
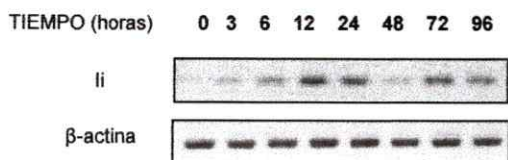
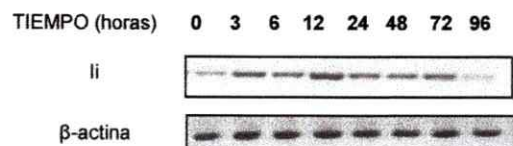
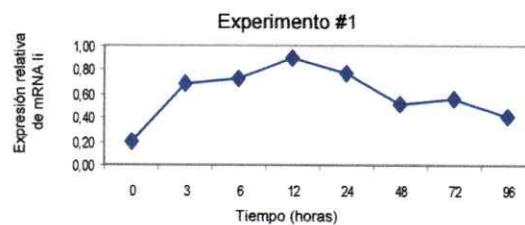
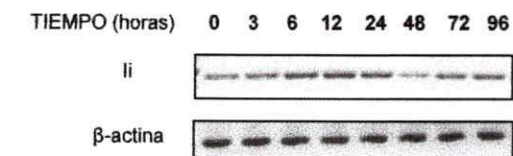
Cinética de expresión de mRNA de DQA en HUTEc co-incubadas con Ramos



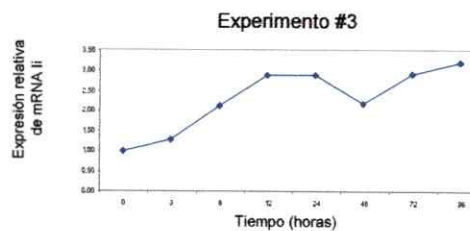
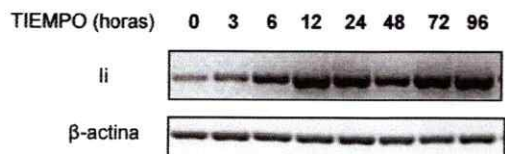
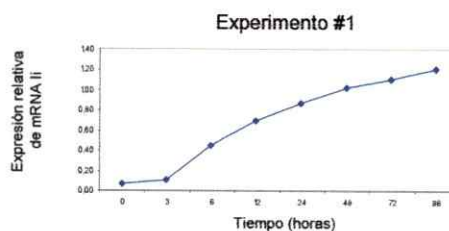
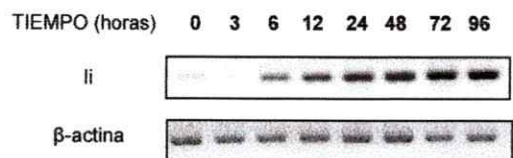
Cinética de expresión de mRNA de DQA en HUTEc tratadas con IFN-gama



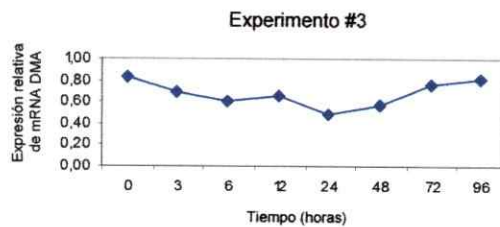
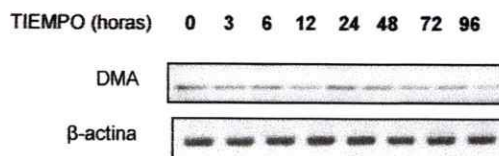
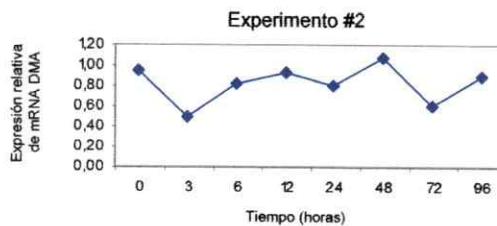
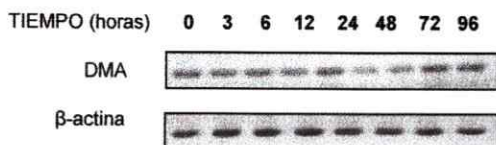
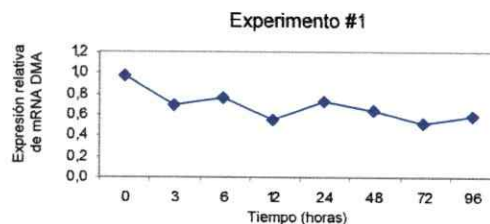
Cinética de expresión de mRNA de li en HUTEc co-incubadas con Ramos



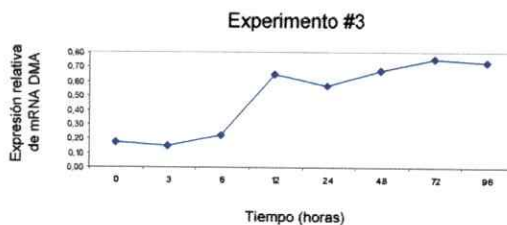
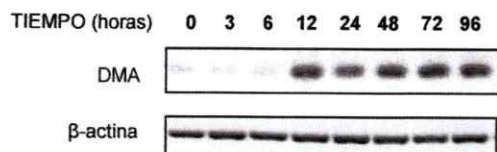
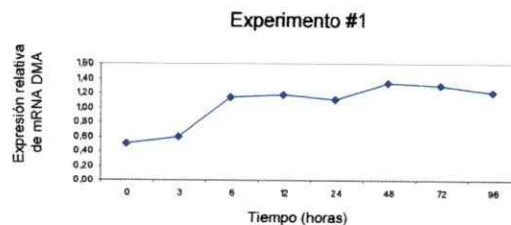
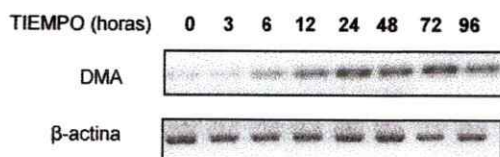
Cinética de expresión de mRNA de li en HUTEc tratadas con IFN-gama



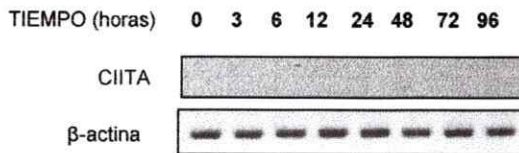
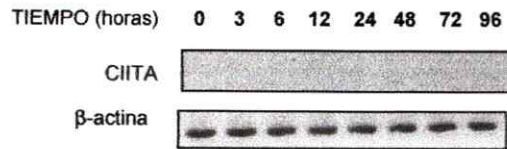
Cinética de expresión de mRNA de DMA en HUTEc co-incubadas con Ramos



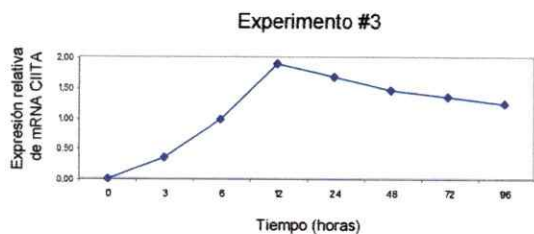
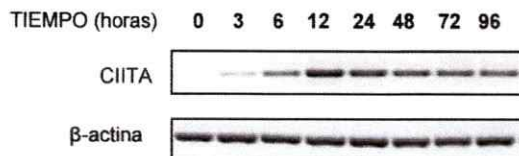
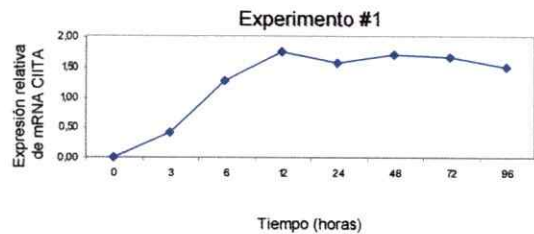
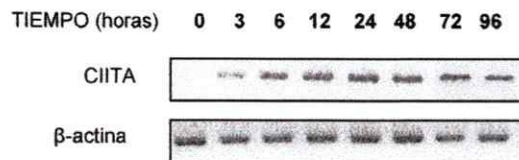
Cinética de expresión de mRNA de DMA en HUTEc tratadas con IFN-gama



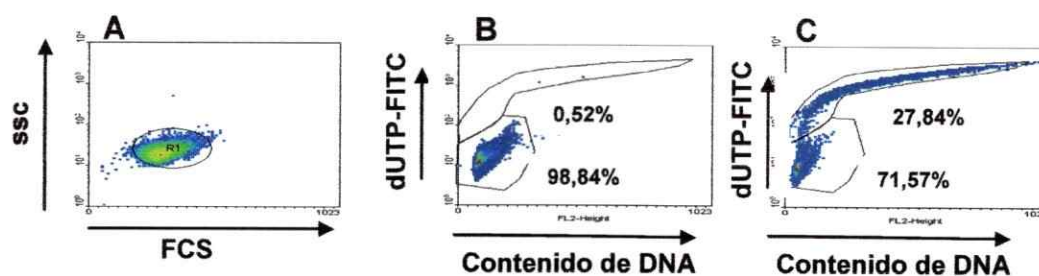
Cinética de expresión de mRNA de CIITA en HUTEc co-incubadas con Ramos



Cinética de expresión de mRNA de CIITA en HUTEc tratadas con IFN-gama



Anexo 2



Anexo 2. Determinación de apoptosis en la línea celular HL-60 tratadas con DMSO. Los lisados de células HL-60 no tratadas (B) o tratadas con DMSO (B) se utilizaron como controles negativo y positivo de apoptosis, respectivamente. El análisis de apoptosis se realizó mediante la técnica de TUNEL en una región correspondiente a las células HL-60 según tamaño celular (FCS) y granulosidad (SSC) (A). El marcaje con dUTP-FITC corresponde a las células en apoptosis, cuyos porcentajes son mostrados junto a cada región. El porcentaje de células no apoptóticas se indica en la figura.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Girard, J. P., E. S. Baekkevold, T. Yamanaka, G. Haraldsen, P. Brandtzaeg, and F. Amalric. 1999. Heterogeneity of endothelial cells: the specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. *Am J Pathol* 155:2043.
2. Girard, J. P., and T. A. Springer. 1995. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* 16:449.
3. Miyasaka, M., and T. Tanaka. 2004. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol* 4:360.
4. Gauguet, J. M., S. D. Rosen, J. D. Marth, and U. H. von Andrian. 2004. Core 2 branching beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase and high endothelial cell N-acetylglucosamine-6-sulfotransferase exert differential control over B- and T-lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *Blood* 104:4104.
5. Samulowitz, U., A. Kuhn, G. Brachtendorf, R. Nawroth, A. Braun, A. Bankfalvi, W. Bocker, and D. Vestweber. 2002. Human endomucin: distribution pattern, expression on high endothelial venules, and decoration with the MECA-79 epitope. *Am J Pathol* 160:1669.
6. Berlin, C., E. L. Berg, M. J. Briskin, D. P. Andrew, P. J. Kilshaw, B. Holzmann, I. L. Weissman, A. Hamann, and E. C. Butcher. 1993. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74:185.
7. Tangemann, K., M. D. Gunn, P. Gibling, and S. D. Rosen. 1998. A high endothelial cell-derived chemokine induces rapid, efficient, and subset-selective arrest of rolling T lymphocytes on a reconstituted endothelial substrate. *J Immunol* 161:6330.
8. Baekkevold, E. S., T. Yamanaka, R. T. Palframan, H. S. Carlsen, F. P. Reinholt, U. H. von Andrian, P. Brandtzaeg, and G. Haraldsen. 2001. The CCR7 ligand e1c (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J Exp Med* 193:1105.
9. von Andrian, U. H., and T. R. Mempel. 2003. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 3:867.
10. Vestweber, D. 2002. Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation. *Curr Opin Cell Biol* 14:587.

11. Hendriks, H. R., and I. L. Eestermans. 1983. Disappearance and reappearance of high endothelial venules and immigrating lymphocytes in lymph nodes deprived of afferent lymphatic vessels: a possible regulatory role of macrophages in lymphocyte migration. *Eur J Immunol* 13:663.
12. Carley, W. W., A. J. Milici, and J. A. Madri. 1988. Extracellular matrix specificity for the differentiation of capillary endothelial cells. *Exp Cell Res* 178:426.
13. Girard, J. P., and T. A. Springer. 1995. Cloning from purified high endothelial venule cells of hevin, a close relative of the antiadhesive extracellular matrix protein SPARC. *Immunity* 2:113.
14. Freemont, A. J. 1988. Functional and biosynthetic changes in endothelial cells of vessels in chronically inflamed tissues: evidence for endothelial control of lymphocyte entry into diseased tissues. *J Pathol* 155:225.
15. Freemont, A. J. 1987. Molecules controlling lymphocyte-endothelial interactions in lymph nodes are produced in vessels of inflamed synovium. *Ann Rheum Dis* 46:924.
16. Butcher, E. C., and L. J. Picker. 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272:60.
17. Springer, T. A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301.
18. Hay, J. B., and B. B. Hobbs. 1977. The flow of blood to lymph nodes and its relation to lymphocyte traffic and the immune response. *J Exp Med* 145:31.
19. Bargatze, R. F., and E. C. Butcher. 1993. Rapid G protein-regulated activation event involved in lymphocyte binding to high endothelial venules. *J Exp Med* 178:367.
20. von Andrian, U. H., and C. R. Mackay. 2000. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 343:1020.
21. Campbell, D. J., and E. C. Butcher. 2002. Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J Exp Med* 195:135.
22. Mora, J. R., M. R. Bono, N. Manjunath, W. Weninger, L. L. Cavanagh, M. Roseblatt, and U. H. Von Andrian. 2003. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 424:88.
23. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708.
24. Frenette, P. S., and D. D. Wagner. 1997. Insights into selectin function from knockout mice. *Thromb Haemost* 78:60.
25. Khan, A. I., R. C. Landis, and R. Malhotra. 2003. L-Selectin ligands in lymphoid tissues and models of inflammation. *Inflammation* 27:265.
26. Mebius, R. E., and S. R. Watson. 1993. L- and E-selectin can recognize the same naturally occurring ligands on high endothelial venules. *J Immunol* 151:3252.
27. Crockett-Torabi, E. 1998. Selectins and mechanisms of signal transduction. *J Leukoc Biol* 63:1.

28. Dustin, M. L., and T. A. Springer. 1989. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341:619.
29. Warnock, R. A., S. Askari, E. C. Butcher, and U. H. von Andrian. 1998. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 187:205.
30. Hynes, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673.
31. Johnson, Z., A. E. Proudfoot, and T. M. Handel. 2005. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:625.
32. Cyster, J. G. 1999. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286:2098.
33. van Buul, J. D., and P. L. Hordijk. 2004. Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:824.
34. Hamann, A., D. P. Andrew, D. Jablonski-Westrich, B. Holzmann, and E. C. Butcher. 1994. Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol* 152:3282.
35. Bargatze, R. F., M. A. Jutila, and E. C. Butcher. 1995. Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined. *Immunity* 3:99.
36. Arroyo, A. G., P. Sanchez-Mateos, M. R. Campanero, I. Martin-Padura, E. Dejana, and F. Sanchez-Madrid. 1992. Regulation of the VLA integrin-ligand interactions through the beta 1 subunit. *J Cell Biol* 117:659.
37. Hogg, N., A. Smith, A. McDowall, K. Giles, P. Stanley, M. Laschinger, and R. Henderson. 2004. How T cells use LFA-1 to attach and migrate. *Immunol Lett* 92:51.
38. Feng, D., J. A. Nagy, K. Pyne, H. F. Dvorak, and A. M. Dvorak. 1998. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med* 187:903.
39. Wakelin, M. W., M. J. Sanz, A. Dewar, S. M. Albelda, S. W. Larkin, N. Boughton-Smith, T. J. Williams, and S. Nourshargh. 1996. An anti-platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane. *J Exp Med* 184:229.
40. Burns, A. R., C. W. Smith, and D. C. Walker. 2003. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiol Rev* 83:309.
41. Liu, Y., S. K. Shaw, S. Ma, L. Yang, F. W. Luscinskas, and C. A. Parkos. 2004. Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signaling events. *J Immunol* 172:7.
42. Luscinskas, F. W., S. Ma, A. Nusrat, C. A. Parkos, and S. K. Shaw. 2002. Leukocyte transendothelial migration: a junctional affair. *Semin Immunol* 14:105.
43. Muller, W. A. 2003. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* 24:327.

44. Liao, F., H. K. Huynh, A. Eiroa, T. Greene, E. Polizzi, and W. A. Muller. 1995. Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *J Exp Med* 182:1337.
45. Bogen, S., J. Pak, M. Garifallou, X. Deng, and W. A. Muller. 1994. Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J Exp Med* 179:1059.
46. Liao, F., J. Ali, T. Greene, and W. A. Muller. 1997. Soluble domain 1 of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Exp Med* 185:1349.
47. Campbell, J. J., J. Hedrick, A. Zlotnik, M. A. Siani, D. A. Thompson, and E. C. Butcher. 1998. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 279:381.
48. Sallusto, F., C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 18:593.
49. Mackay, C. R. 2000. Follicular homing T helper (Th) cells and the Th1/Th2 paradigm. *J Exp Med* 192:F31.
50. Muller, G., and M. Lipp. 2003. Shaping up adaptive immunity: the impact of CCR7 and CXCR5 on lymphocyte trafficking. *Microcirculation* 10:325.
51. Willimann, K., D. F. Legler, M. Loetscher, R. S. Roos, M. B. Delgado, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and B. Moser. 1998. The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur J Immunol* 28:2025.
52. Ansel, K. M., L. J. McHeyzer-Williams, V. N. Ngo, M. G. McHeyzer-Williams, and J. G. Cyster. 1999. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J Exp Med* 190:1123.
53. Bonecchi, R., G. Bianchi, P. P. Bordignon, D. D'Ambrosio, R. Lang, A. Borsatti, S. Sozzani, P. Allavena, P. A. Gray, A. Mantovani, and F. Sinigaglia. 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187:129.
54. Austrup, F., D. Vestweber, E. Borges, M. Lohning, R. Brauer, U. Herz, H. Renz, R. Hallmann, A. Scheffold, A. Radbruch, and A. Hamann. 1997. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 385:81.
55. Lim, Y. C., L. Henault, A. J. Wagers, G. S. Kansas, F. W. Luscinskas, and A. H. Lichtman. 1999. Expression of functional selectin ligands on Th cells is differentially regulated by IL-12 and IL-4. *J Immunol* 162:3193.
56. Sallusto, F., C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 1997. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 277:2005.
57. Abbas, A., A. H. Lichtman, and J. S. Pober. 2000. in *Cellular and Molecular Immunology* 4th edition, Ch. 4.63.
58. Reith, W., S. LeibundGut-Landmann, and J. M. Waldburger. 2005. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol* 5:793.

59. Ting, J. P., and J. Trowsdale. 2002. Genetic control of MHC class II expression. *Cell 109 Suppl*:S21.
60. Wolf, P. R., and H. L. Ploegh. 1995. How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol 11*:267.
61. Villadangos, J. A. 2001. Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol Immunol 38*:329.
62. Villadangos, J. A., P. Schnorrer, and N. S. Wilson. 2005. Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces. *Immunol Rev 207*:191.
63. Steimle, V., C. A. Siegrist, A. Mottet, B. Lisowska-Grosj Pierre, and B. Mach. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science 265*:106.
64. McDouall, R. M., P. Batten, A. McCormack, M. H. Yacoub, and M. L. Rose. 1997. MHC class II expression on human heart microvascular endothelial cells: exquisite sensitivity to interferon-gamma and natural killer cells. *Transplantation 64*:1175.
65. LeibundGut-Landmann, S., J. M. Waldburger, M. Krawczyk, L. A. Otten, T. Suter, A. Fontana, H. Acha-Orbea, and W. Reith. 2004. Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur J Immunol 34*:1513.
66. Waldburger, J. M., T. Suter, A. Fontana, H. Acha-Orbea, and W. Reith. 2001. Selective abrogation of major histocompatibility complex class II expression on extrahematopoietic cells in mice lacking promoter IV of the class II transactivator gene. *J Exp Med 194*:393.
67. Muhlethaler-Mottet, A., W. Di Bernardino, L. A. Otten, and B. Mach. 1998. Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity 8*:157.
68. Palmeri, D., F. R. Zuo, S. D. Rosen, and S. Hemmerich. 2004. Differential gene expression profile of human tonsil high endothelial cells: implications for lymphocyte trafficking. *J Leukoc Biol 75*:910.
69. Pober, J. S. 1999. Immunobiology of human vascular endothelium. *Immunol Res 19*:225.
70. Turner, R. R., J. H. Beckstead, R. A. Warnke, and G. S. Wood. 1987. Endothelial cell phenotypic diversity. In situ demonstration of immunologic and enzymatic heterogeneity that correlates with specific morphologic subtypes. *Am J Clin Pathol 87*:569.
71. Pardi, R., J. R. Bender, and E. G. Engleman. 1987. Lymphocyte subsets differentially induce class II human leukocyte antigens on allogeneic microvascular endothelial cells. *J Immunol 139*:2585.
72. Watson, C. A., P. Petzelbauer, J. Zhou, R. Pardi, and J. R. Bender. 1995. Contact-dependent endothelial class II HLA gene activation induced by NK cells is mediated by IFN-gamma-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol 154*:3222.

73. Collinge, M., R. Pardi, and J. R. Bender. 1998. Class II transactivator-independent endothelial cell MHC class II gene activation induced by lymphocyte adhesion. *J Immunol* 161:1589.
74. Chang, C. H., S. Guerder, S. C. Hong, W. van Ewijk, and R. A. Flavell. 1996. Mice lacking the MHC class II transactivator (CIITA) show tissue-specific impairment of MHC class II expression. *Immunity* 4:167.
75. Williams, G. S., M. Malin, D. Vremec, C. H. Chang, R. Boyd, C. Benoist, and D. Mathis. 1998. Mice lacking the transcription factor CIITA--a second look. *Int Immunol* 10:1957.
76. Buch, T., B. Polic, B. E. Clausen, S. Weiss, O. Akilli-Ozturk, C. H. Chang, R. Flavell, A. Schulz, S. Jonjic, A. Waisman, and I. Forster. 2006. MHC class II expression through a hitherto unknown pathway supports T helper cell-dependent immune responses: implications for MHC class II deficiency. *Blood* 107:1434.
77. Gao, J., B. P. De, and A. K. Banerjee. 1999. Human parainfluenza virus type 3 up-regulates major histocompatibility complex class I and II expression on respiratory epithelial cells: involvement of a STAT1- and CIITA-independent pathway. *J Virol* 73:1411.
78. Reyes, L. I., P. Escobar, M. R. Bono, and M. Roseblatt. 2002. Adhesion of B cell lines to endothelial cells from human lymphoid tissue modulates tyrosine phosphorylation and endothelial cell activation. *J Immunol* 169:5881.
79. Naves, R., L. I. Reyes, M. Roseblatt, S. Jacobelli, A. Gonzalez, and M. R. Bono. 2006. Lymphoid B cells induce NF- κ B activation in high endothelial cells from human tonsils. *Int Immunol* 18:259.
80. Castro, A., M. R. Bono, V. Simon, and M. Roseblatt. 1996. Lymphocyte adhesion to endothelium derived from human lymphoid tissue. *Eur J Cell Biol* 70:61.
81. Borthwick, N. J., A. A. Akbar, C. Buckley, D. Pilling, M. Salmon, A. P. Jewell, and K. L. Yong. 2003. Transendothelial migration confers a survival advantage to activated T lymphocytes: role of LFA-1/ICAM-1 interactions. *Clin Exp Immunol* 134:246.
82. Jeffes, E. W., 3rd, K. Schmitz, R. Yamamoto, J. M. Tomich, M. Beckman, R. Nep, and M. Knauer. 1991. A simple nonisotopic in vitro bioassay for LT and TNF employing sodium fluoride-treated L-929 target cells that detects picogram quantities of LT and TNF and is as sensitive as TNF assays done with ELISA methodology. *Lymphokine Cytokine Res* 10:147.
83. Chang, C. H., and R. A. Flavell. 1995. Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation. *J Exp Med* 181:765.
84. Alcaide-Loridan, C., A. M. Lennon, M. R. Bono, R. Barbouche, K. Dellagi, and M. Fellous. 1999. Differential expression of MHC class II isotype chains. *Microbes Infect* 1:929.
85. Wang, Q., and C. M. Doerschuk. 2001. The p38 mitogen-activated protein kinase mediates cytoskeletal remodeling in pulmonary microvascular endothelial cells upon intracellular adhesion molecule-1 ligation. *J Immunol* 166:6877.

86. Holland, J., and T. Owens. 1997. Signaling through intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in a B cell lymphoma line. The activation of Lyn tyrosine kinase and the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 272:9108.
87. Arancibia-Carcamo, C. V., H. Osawa, H. A. Arnett, Z. Haskova, A. J. George, S. J. Ono, J. P. Ting, and J. W. Streilein. 2004. A CIITA-independent pathway that promotes expression of endogenous rather than exogenous peptides in immune-privileged sites. *Eur J Immunol* 34:471.
88. Cresswell, P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 12:259.
89. Marchesi, V. T., and J. L. Gowans. 1964. The Migration Of Lymphocytes Through The Endothelium Of Venules In Lymph Nodes: An Electron Microscope Study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 159:283.
90. Bradley, L. M., S. R. Watson, and S. L. Swain. 1994. Entry of naive CD4 T cells into peripheral lymph nodes requires L- selectin. *J Exp Med* 180:2401.
91. Bono, M. R., L. I. cReyes, and M. Roseblatt. 1999. A flow cytometric procedure for the quantification of cell adhesion in complex mixtures of cells. *J Immunol Methods* 223:27.
92. Hughes, C. C., C. O. Savage, and J. S. Pober. 1990. Endothelial cells augment T cell interleukin 2 production by a contact- dependent mechanism involving CD2/LFA-3 interaction. *J Exp Med* 171:1453.
93. Roseblatt, M., and M. R. Bono. 2004. Functional consequences of immune cell adhesion to endothelial cells. *Curr Pharm Des* 10:109.
94. Pober, J. S., M. A. Gimbrone, Jr., R. S. Cotran, C. S. Reiss, S. J. Burakoff, W. Fiers, and K. A. Ault. 1983. Ia expression by vascular endothelium is inducible by activated T cells and by human gamma interferon. *J Exp Med* 157:1339.
95. Steimle, V., L. A. Otten, M. Zufferey, and B. Mach. 1993. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 75:135.
96. Douhan, J., R. Lieberson, J. H. Knoll, H. Zhou, and L. H. Glimcher. 1997. An isotype-specific activator of major histocompatibility complex (MHC) class II genes that is independent of class II transactivator. *J Exp Med* 185:1885.
97. Zhou, H., H. S. Su, X. Zhang, J. Douhan, 3rd, and L. H. Glimcher. 1997. CIITA-dependent and -independent class II MHC expression revealed by a dominant negative mutant. *J Immunol* 158:4741.
98. Masuyama, J., J. S. Berman, W. W. Cruikshank, C. Morimoto, and D. M. Center. 1992. Evidence for recent as well as long term activation of T cells migrating through endothelial cell monolayers in vitro. *J Immunol* 148:1367.
99. Yurochko, A. D., D. Y. Liu, D. Eierman, and S. Haskill. 1992. Integrins as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9034.
100. Fan, S. T., N. Mackman, M. Z. Cui, and T. S. Edgington. 1995. Integrin regulation of an inflammatory effector gene. Direct induction of the tissue factor promoter by engagement of beta 1 or alpha 4 integrin chains. *J Immunol* 154:3266.

101. Lin, T. H., A. Yurochko, L. Kornberg, J. Morris, J. J. Walker, S. Haskill, and R. L. Juliano. 1994. The role of protein tyrosine phosphorylation in integrin-mediated gene induction in monocytes. *J Cell Biol* 126:1585.
102. Yamada, A., T. Nikaido, Y. Nojima, S. F. Schlossman, and C. Morimoto. 1991. Activation of human CD4 T lymphocytes. Interaction of fibronectin with VLA-5 receptor on CD4 cells induces the AP-1 transcription factor. *J Immunol* 146:53.
103. Takahashi, M., T. Ishida, O. Traub, M. A. Corson, and B. C. Berk. 1997. Mechanotransduction in endothelial cells: temporal signaling events in response to shear stress. *J Vasc Res* 34:212.
104. Govindarajan, G., D. M. Eble, P. A. Lucchesi, and A. M. Samarel. 2000. Focal adhesion kinase is involved in angiotensin II-mediated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 87:710.
105. Yellin, M. J., J. Brett, D. Baum, A. Matsushima, M. Szabolcs, D. Stern, and L. Chess. 1995. Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals. *J Exp Med* 182:1857.
106. Lukacs, N. W., R. M. Strieter, V. Elner, H. L. Evanoff, M. D. Burdick, and S. L. Kunkel. 1995. Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte: endothelial cell interactions. *Blood* 86:2767.
107. Fan, S. T., K. Hsia, and T. S. Edgington. 1994. Upregulation of human immunodeficiency virus-1 in chronically infected monocytic cell line by both contact with endothelial cells and cytokines. *Blood* 84:1567.
108. del Pozo, M. A., P. Sanchez-Mateos, M. Nieto, and F. Sanchez-Madrid. 1995. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol* 131:495.
109. Pober, J. S., T. Collins, M. A. Gimbrone, Jr., R. S. Cotran, J. D. Gitlin, W. Fiers, C. Clayberger, A. M. Krensky, S. J. Burakoff, and C. S. Reiss. 1983. Lymphocytes recognize human vascular endothelial and dermal fibroblast Ia antigens induced by recombinant immune interferon. *Nature* 305:726.
110. Geppert, T. D., and P. E. Lipsky. 1985. Antigen presentation by interferon-gamma-treated endothelial cells and fibroblasts: differential ability to function as antigen-presenting cells despite comparable Ia expression. *J Immunol* 135:3750.
111. Savage, C. O., C. C. Hughes, B. W. McIntyre, J. K. Picard, and J. S. Pober. 1993. Human CD4⁺ T cells proliferate to HLA-DR⁺ allogeneic vascular endothelium. Identification of accessory interactions. *Transplantation* 56:128.
112. Marelli-Berg, F. M., R. E. Hargreaves, P. Carmichael, A. Dorling, G. Lombardi, and R. I. Lechler. 1996. Major histocompatibility complex class II-expressing endothelial cells induce allospecific nonresponsiveness in naive T cells. *J Exp Med* 183:1603.
113. Glimcher, L. H., and C. J. Kara. 1992. Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription. *Annu Rev Immunol* 10:13.
114. Paulnock-King, D., K. C. Sizer, Y. R. Freund, P. P. Jones, and J. R. Parnes. 1985. Coordinate induction of Ia alpha, beta, and Ii mRNA in a macrophage cell line. *J Immunol* 135:632.

115. Takeda, S., H. R. Rodewald, H. Arakawa, H. Bluethmann, and T. Shimizu. 1996. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4⁺ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* 5:217.
116. Rooke, R., C. Waltzinger, C. Benoist, and D. Mathis. 1997. Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity* 7:123.
117. Kirberg, J., A. Berns, and H. von Boehmer. 1997. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J Exp Med* 186:1269.
118. Witherden, D., N. van Oers, C. Waltzinger, A. Weiss, C. Benoist, and D. Mathis. 2000. Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med* 191:355.
119. Le Campion, A., C. Bourgeois, F. Lambolez, B. Martin, S. Leaument, N. Dautigny, C. Tanchot, C. Penit, and B. Lucas. 2002. Naive T cells proliferate strongly in neonatal mice in response to self-peptide/self-MHC complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4538.
120. Ma, W., and J. S. Pober. 1998. Human endothelial cells effectively costimulate cytokine production by, but not differentiation of, naive CD4⁺ T cells. *J Immunol* 161:2158.
121. Kawai, T., M. Seki, H. Watanabe, J. W. Eastcott, D. J. Smith, and M. A. Taubman. 2000. T(h)1 transmigration anergy: a new concept of endothelial cell-T cell regulatory interaction. *Int Immunol* 12:937.
122. Kawai, T., M. Seki, K. Hiromatsu, J. W. Eastcott, G. F. Watts, M. Sugai, D. J. Smith, S. A. Porcelli, and M. A. Taubman. 1999. Selective diapedesis of Th1 cells induced by endothelial cell RANTES. *J Immunol* 163:3269.
123. Brezinschek, R. I., P. E. Lipsky, P. Galea, R. Vita, and N. Oppenheimer-Marks. 1995. Phenotypic characterization of CD4⁺ T cells that exhibit a transendothelial migratory capacity. *J Immunol* 154:3062.
124. Pietschmann, P., J. J. Cush, P. E. Lipsky, and N. Oppenheimer-Marks. 1992. Identification of subsets of human T cells capable of enhanced transendothelial migration. *J Immunol* 149:1170.
125. Marelli-Berg, F. M., L. Frasca, L. Weng, G. Lombardi, and R. I. Lechler. 1999. Antigen recognition influences transendothelial migration of CD4⁺ T cells. *J Immunol* 162:696.
126. Stein, J. V., and C. Nombela-Arrieta. 2005. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology* 116:1.
127. Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf, and M. Lipp. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99:23.
128. Gunn, M. D., S. Kyuwa, C. Tam, T. Kakiuchi, A. Matsuzawa, L. T. Williams, and H. Nakano. 1999. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 189:451.

129. Callahan, M. K., K. A. Williams, P. Kivisakk, D. Pearce, M. F. Stins, and R. M. Ransohoff. 2004. CXCR3 marks CD4⁺ memory T lymphocytes that are competent to migrate across a human brain microvascular endothelial cell layer. *J Neuroimmunol* 153:150.
130. Manes, T. D., J. S. Pober, and M. S. Kluger. 2006. Endothelial cell-T lymphocyte interactions: iP-10 stimulates rapid transendothelial migration of human effector but not central memory CD4⁺ T cells. Requirements for shear stress and adhesion molecules. *Transplantation* 82:S9.
131. Zhang, X., T. Nakajima, J. J. Goronzy, and C. M. Weyand. 2005. Tissue trafficking patterns of effector memory CD4⁺ T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 52:3839.