

UCH-FC-1  
nag - B  
C355  
C-1

**Células estromales en cultivo obtenidas de órganos  
linfoides secundarios. Un modelo para estudiar la  
participación de los receptores de adhesión en las  
interacciones linfocitos-estroma.**

Tesis  
entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con  
mención en  
Biología Celular y Molecular

Facultad de Ciencias

María Andrea Castro Gálvez

junio de 1995

Director de Tesis: Dr. Mario Rosemblatt

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Magister presentada por:

**MARIA ANDREA CASTRO GALVEZ**

ha sido aprobada por la Comisión informante de Tesis como parte de los requisitos para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular y Molecular, en el exámen de Defensa de Tesis rendido el día...22... del mes de.....*mayo*..... de 1995.

**Tutor:**

Dr. Mario Rosemblatt



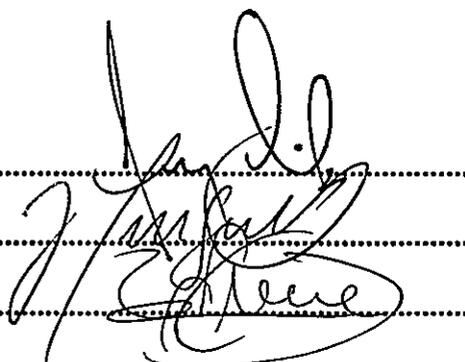
.....

**Comisión Informante de Tesis:**

Dr. Jorge Garrido

Dr. José Mingell

Dr. Tulio Núñez



.....  
.....  
.....

**A mi madre**

## AGRADECIMIENTOS

Ante todo quiero agradecer a Dios, quién me ha dado la capacidad y la fortaleza para vencer innumerables dificultades durante mis estudios de Postgrado y desarrollo de esta tesis.

Especialmente quiero agradecer a las siguientes personas:

Al Doctor Mario Roseblatt por su paciencia, gran apoyo profesional y personal.

A la Dra. María Rosa Bono por su espíritu siempre docente y de cooperación en aspectos teóricos y prácticos.

A Valeska Simon por su amistad, consejos prácticos en técnicas de laboratorio e inmensa colaboración en el trabajo de citometría de flujo.

Especialmente, agradezco, a mis compañeros y amigos Juan Antonio Iturrieta y Lilian Reyes por su siempre desinteresada ayuda en la realización de experimentos y discusión de los mismos.

A mis compañeros de laboratorio Paola Bravo, Alejandra Loyola, Rodrigo Naves, y Laura Salas, quienes me ayudaron muchas veces. Sobretudo les agradezco por su amistad.

A los profesores que integraron la Comisión Informante de Tesis, quienes me ayudaron a mejorar sustancialmente el manuscrito.

Quiero agradecer muy especialmente al Doctor Claudio Barros quién, en mis primeras experiencias en investigación, formó en mi un carácter crítico-científico, básico.

Agradezco al Doctor Luis Valladares, por su confianza y acogida en el Programa de Magister.

También agradezco a mis queridos compañeros y amigos Claudia Basso, Carolina Capote, Javier Crosby, Paulina Moraga, Claudio Pérez, y Clarisa Vial por el apoyo incondicional en todo este tiempo juntos.

Finalmente, agradezco a mi familia, especialmente a mis padres, mis hermanos y abuelos, gracias por su comprensión y amor.

# INDICE DE MATERIAS

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABLAS .....	xi
ABREVIATURAS .....	xii
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	4
INTRODUCCION .....	7
1. MOLECULAS DE ADHESION .....	7
1.1. FAMILIA DE LAS INTEGRINAS .....	7
1.1.1. Estructura .....	10
1.1.2. Ligandos .....	11
1.1.3. Sitios de reconocimiento en sus ligandos .....	11
1.1.4. Las integrinas $\beta$ 1 .....	13
1.1.5. Las integrinas $\beta$ 2 .....	14
1.1.6. Activación de las integrinas .....	16
1.1.7. Transducción de señales por las integrinas .....	19
1.2. SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS .....	19
1.3. LAS SELECTINAS .....	22
1.4. MOLECULAS DE ADHESION NO CLASIFICADAS .....	23
2. MOLECULAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR .....	24
2.1. FIBRONECTINA: .....	24

2.1.1. Estructura .....	20
2.1.2. Sitios de unión .....	20
2.2. LAMININA .....	21
2.3. COLAGENOS .....	21
<b>3. ORGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS .....</b>	<b>21</b>
3.1. Aspectos generales .....	21
3.2. Anatomía de los órganos linfoides secundarios .....	22
3.2.1. Bazo .....	23
3.2.2. Amígdalas palatinas .....	23
3.3. Células estromales .....	23
<b>4. RECIRCULACION DE LOS LINFOCITOS .....</b>	<b>25</b>
4.1. Aspectos generales .....	25
4.2. Tráfico a través de HEV .....	26
4.3. Recirculación de linfocitos vírgenes .....	26
4.3.1. Nódulos linfáticos periféricos .....	26
4.3.2. Placas de Peyer .....	26
4.4. Recirculación de linfocitos de memoria .....	27
4.4.1. Piel .....	27
4.4.2. Intestino .....	27
4.5. Alteración del tráfico linfocitario en inflamación .....	27
<b>PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO .....</b>	<b>29</b>
1. Problema propuesto .....	29
2. Objetivo general .....	29
3. Hipótesis de trabajo .....	29
4. Objetivos específicos .....	30
4	
<b>MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>1. REACTIVOS .....</b>	<b>31</b>

1.1 Medios de cultivos, sueros fetales y antibióticos .....	31
1.2. Enzimas .....	31
1.3. Mitógenos y PMA .....	31
1.4. Moléculas radiomarcadas .....	31
1.6. Generales .....	31
<b>2. CELULAS ESTROMALES .....</b>	<b>32</b>
2.1. Cultivos de células estromales murinas .....	32
2.2. Cultivo de células estromales de amígdala humana .....	32
<b>3. OTRAS CELULAS .....</b>	<b>33</b>
<b>4. ANTICUERPOS .....</b>	<b>34</b>
4.1 Anticuerpos Monoclonales .....	34
4.1.1. Anticuerpos dirigidos a moléculas humanas .....	34
4.1.2. Anticuerpos dirigidos a moléculas de ratón .....	34
4.2. Anticuerpos policlonales .....	36
<b>5. INMUNOFLUORESCENCIA .....</b>	<b>37</b>
5.1. Citometría de flujo. Antígenos intracelulares y de superficie .....	37
5.2. Inmunofluorescencia en células adheridas a cubreobjetos .....	37
<b>6. PURIFICACION DE LINFOCITOS .....</b>	<b>39</b>
6.1. Purificación de linfocitos T .....	39
6.2. Purificación de linfocitos B .....	39
<b>7. MARCAJE RADIOACTIVO DE CELULAS .....</b>	<b>40</b>
<b>8. PROTOCOLO DE ADHESION .....</b>	<b>40</b>
<b>9. EFECTO DE ANTICUERPOS EN LA ADHESION .....</b>	<b>42</b>

9.1 Efecto en células linfoides .....	42
9.2 Efecto en células estromales .....	42
<b>10. EFECTO DE ACTIVADORES POLICLONALES EN LA ADHESION .....</b>	<b>42</b>
10.1 Concanavalina A (Con A ) y Lipopolisacárido ( LPS ) .....	42
10.2. Ester de forbol, PMA .....	43
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
<b>1. CARACTERIZACION DE CELULAS DE BAZO .....</b>	<b>44</b>
1.1. Células estromales de bazo de ratón .....	44
1.2. Análisis de antígenos de superficie de células de bazo por citometría de flujo .....	48
1.3. Purificación de linfocitos a partir de células mononucleadas de bazo de ratón .....	53
<b>2. ADHESION CELULAR EN BAZO .....</b>	<b>56</b>
2.1. Sistema homólogo .....	56
2.1.1. Resultados de adhesión de células mononucleares .....	56
2.1.2. Resultados de adhesión de poblaciones enriquecidas en linfocitos B o T .....	56
2.2. Sistema heterólogo .....	59
2.3. Efecto de anticuerpos bloqueadores de la adhesión .....	60
2.3.1. Participación de moléculas de adhesión expresadas en los estromas .....	60
2.3.2. Participación de moléculas de adhesión expresadas en las células linfoides .....	61
<b>3. CARACTERIZACION DE CELULAS DE AMIGDALA .....</b>	<b>64</b>
3.1. Células estromales de amígdala humana .....	64
3.2. Citometría de flujo .....	64
<b>4. ADHESION CELULAR EN AMIGDALA .....</b>	<b>68</b>

4.1 Adhesión de células linfoides a células AMG .....	68
4.2. Efecto de anticuerpos en la adhesión .....	68
<b>5. MOLECULAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR .....</b>	<b>71</b>
5.1. Colágenos .....	71
5.2. Fibronectina .....	72
<b>DISCUSION .....</b>	<b>78</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>95</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Fotomicrografía óptica de estroma primario de bazo .	45
<b>FIGURA 2</b>	Fotomicrografía óptica de células de B-1 .....	46
<b>FIGURA 3</b>	Fotomicrografías ópticas de células de B-2 .....	47
<b>FIGURA 4</b>	Análisis de inmunofluorescencia por citometría de flujo de B-1 .....	50
<b>FIGURA 5</b>	Análisis de inmunofluorescencia por citometría de flujo de B-2 .....	51
<b>FIGURA 6</b>	Análisis de inmunofluorescencia por citometría de flujo de la línea celular L(tk <sup>-</sup> ) .....	52
<b>FIGURA 7</b>	Análisis por citometría de flujo de linfocitos T o B purificados .....	55
<b>FIGURA 8</b>	Adhesión de MNC a células estromales de bazo .....	57
<b>FIGURA 9</b>	Adhesión de MNC enriquecidas en linfocitos B o T a estromas de bazo .....	58
<b>FIGURA 10</b>	Efecto de anticuerpos monoclonales en la adhesión de la línea linfoide DAUDI a estromas de bazo .....	62
<b>FIGURA 11</b>	Efecto de anticuerpos monoclonales en la adhesión de las líneas linfoides RAMOS y MOLT-4 a células de B-2 .....	63
<b>FIGURA 12</b>	Fotomicrografías ópticas de células estromales de amígdala humana .....	65
<b>FIGURA 13</b>	Análisis de inmunofluorescencia por citometría de flujo de células estromales de amígdala humana .....	66
<b>FIGURA 14</b>	Efecto de anticuerpos monoclonales en la adhesión de linfocitos y líneas linfoides a células endoteliales (AMG y HUVEC) .....	70
<b>FIGURA 15</b>	Efecto del anticuerpo policlonal anti-fibronectina sobre la adhesión de la línea linfoide RAMOS a células endoteliales (AMG) .....	71

<b>FIGURA 16</b>	Detección de colágenos en células de B-1 .....	73
<b>FIGURA 17</b>	Detección de colágenos en células de B-2 .....	74
<b>FIGURA 18</b>	Detección de colágenos en células endoteliales de amígdala humana (AMG) .....	75
<b>FIGURA 19</b>	Detección de fibronectina en células de B-1 y B-2 .....	76
<b>FIGURA 20</b>	Detección de Fibronectina en células endoteliales de amígdala humana (AMG) .....	77
<b>FIGURA 21</b>	Modelo de adhesión heterólogo en cultivo .....	85
<b>FIGURA 22</b>	Modelo de adhesión en cultivo de linfocitos a células endoteliales de amígdala .....	92
<b>FIGURA 23</b>	Modelo de interacción de linfocitos en amígdala y bazo .....	94

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA I</b>	La familia de las integrinas .....	9
<b>TABLA II</b>	Anticuerpos monoclonales dirigidos a moléculas humanas .....	35
<b>TABLA III</b>	Anticuerpos monoclonales dirigidos a moléculas de ratón .....	36
<b>TABLA IV</b>	Moléculas detectadas en células de bazo de ratón .....	53
<b>TABLA V</b>	Moléculas detectadas en células linfoides humanas ...	59
<b>TABLA VI</b>	Adhesión de líneas linfoides humanas a células estromales de bazo de ratón .....	60
<b>TABLA VII</b>	Moléculas detectadas en células de amígdala humana y HUVEC .....	67
<b>TABLA VIII</b>	Adhesión de células linfoides a las células endoteliales AMG y HUVEC .....	68

## ABREVIATURAS

ADN	:	ácido desoxiribonucleico
ADN <sub>c</sub>	:	ácido desoxiribonucleico complementario
AMG	:	células adherentes de amígdala
AMG <sub>t</sub>	:	células totales de amígdalas
ARN	:	ácido ribonucleico
ARN <sub>m</sub>	:	ácido ribonucleico mensajero
ATCC	:	American Type Culture Collection
B-1	:	subcultivo de B-C tipo 1
B-2	:	subcultivo de B-C tipo 2
B-C	:	cultivo completo de bazo
BSA	:	seroalbúmina de bovino
c.p.m.	:	cuentas radioactivas por minuto
CD	:	grupo de diferenciación
Ci	:	Curie
Col	:	colágeno
ConA	:	concanavalina A
CR	:	receptor de complemento
CS-1	:	segmento conectante 1
DABCO	:	1,4-diazabicyclo-(2,2,2) octano
DMEM	:	Medio Eagle modificado de Dulbecco
EDTA	:	ácido etilendiaminotetracético
ELAM-1	:	molécula de adhesión de leucocitos al endotelio 1
FAK	:	tirosina quinasa de adhesión focal
FCS	:	suero fetal de bovino
FDC	:	células dendríticas foliculares
FG	:	fibrinógeno
FITC	:	isotiocianato de fluoresceína
FN	:	fibronectina
FSC	:	dispersión longitudinal
Fx	:	factor x
GAC	:	glicosaminoglicán

GlyCAM-1	:	glicano de adhesión celular 1
HEPES	:	ácido N-(hidroxietyl)piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
HEV	:	endotelio columnar de vénulas
HUVEC	:	células endoteliales de vena de cordón umbilical humano
ICAM	:	molécula de adhesión intercelular
IDC	:	células dendríticas interdigitantes
IFN- $\alpha$	:	interferón gamma
IL <sub>1</sub>	:	interleuquina 1
IMF-1	:	factor modulador de integrina
kD	:	kilo Dalton
LAD-1	:	deficiencia de adhesión de leucocitos 1
LFA	:	antígeno funcional de leucocitos
LM	:	laminina
LPS	:	lipopolisacárido
LVAP2	:	proteína de adhesión de leucocitos a vasculatura 2
MadCAM-1	:	molécula de adhesión mucosal 1
MCP-1	:	proteína quimiotáctica de monocitos 1
MEC	:	matriz extracelular
MHC	:	complejo mayor de histocompatibilidad
MIP-1 $\beta$	:	proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta
MNC	:	células mononucleares
NF $\kappa$ B	:	factor nuclear kappa B
NLP	:	nódulos linfáticos periféricos
OLS	:	órganos linfoides secundarios
PBS	:	tampón de fosfato salino
PKC	:	proteína quinasa C
PMA	:	forbol 12-miristoil 13-acetato
POPOP	:	1,4- bis (5-fenil-2-oxazolil)-benceno
PPO	:	2,5-difeniloxazol
rpm	:	revoluciones por minuto
SDS	:	dodecil sulfato de sodio
SSC	:	dispersión lateral
TCR	:	receptor antigénico del linfocito T
tk	:	timidina quinasa
TNF- $\alpha$	:	factor de necrosis tumoral alfa
TSP	:	trombospondina
VAP-1	:	proteína de adhesión vascular 1

VCAM-1 : molécula de adhesión vascular 1  
VLA : antígeno de expresión tardía  
VN : vitronectina  
vW : factor de von Willebrand

## RESUMEN

Las interacciones adhesivas entre los linfocitos y las células del microambiente de los órganos linfoides secundarios (OLS) son importantes, tanto en la migración de los linfocitos a los OLS, como también, en la proliferación y diferenciación de los linfocitos. Sin embargo, los modelos hasta ahora utilizados para estudiar estas interacciones son escasos o no incluyen a células estromales purificadas. Para investigar los receptores de adhesión involucrados en el establecimiento de interacciones entre los linfocitos y las células estromales de los OLS, hemos desarrollado modelos de adhesión *in vitro* utilizando bazo murino y amígdala humana.

Sistema murino: A partir de cultivos primarios de bazo hemos aislado y mantenido dos líneas de células estromales, B-1 y B-2, respectivamente con uno y dos tipos celulares morfológicamente distintos. Tanto los estromas completos, como las células adherentes derivadas de B-1 y B-2, se utilizaron en estudios de adhesión de linfocitos de ratón. También, hemos desarrollado un modelo xenogéneo para identificar los receptores de adhesión utilizados por linfocitos humanos en su interacción con las células estromales de bazo murino.

El análisis por citometría de flujo indicó que las células de B-1 y B-2 expresan en su superficie a las moléculas CD44 y VCAM-1. El cultivo B-2 presenta al menos dos tipos de células, debido a que un porcentaje de las células presenta receptores Fc y la molécula CD11b. No se encontraron marcadores para células dendríticas interdigitantes, dendríticas foliculares o macrófagos. Lo anterior sugiere la presencia de células reticulares en estos cultivos.

Las células mononucleares (MNC) preparadas de bazo de ratón se adhieren a los estromas completos de bazo y a las células de B-1 y B-2 en un 30-40%. La activación de MNC con ConA (pero no con LPS) aumentó la unión

a los estromas completos por un factor de dos. En cambio, la adhesión de MNC a B-1 y B-2 no cambió después de activación. Los linfocitos B se adhieren a los estromas completos y a las células de B-1 y B-2 en un 25%, 17% y 35% respectivamente, mientras que las células T se unen aproximadamente en un 12% a los tres estromas. Luego de activación con ConA, la adhesión de los linfocitos T aumentó en un factor de tres.

La adhesión de la línea celular humana Daudi a cultivos de B-1 y B-2 fue inhibida por un anticuerpo dirigido a la subunidad  $\alpha_4$  de las integrinas  $\beta_1$  (humana) en un 95% y 60% y por un anticuerpo anti-VCAM-1 (murino) en un 80% y un 50%, respectivamente. También, la adhesión de la línea celular Ramos a B-2 fue inhibida por los anticuerpos anti- $\alpha_4$  y anti-VCAM-1 en un 75% y un 50%, respectivamente. Estos resultados sugieren que los linfocitos humanos emplean el par VLA-4/VCAM-1 para unirse a las células estromales de bazo. Por otra parte, aunque la adhesión de la línea celular Daudi a los estromas completos de bazo fue bloqueada por el anti-VCAM-1 murino en un 60%, el anticuerpo anti- $\alpha_4$  humano no bloqueó esta adhesión.

Se concluye que en cultivo las células adherentes de bazo murino son un modelo válido para estudiar las interacciones linfocitos humanos-células estromales de bazo. Nuestros resultados sugieren que los linfocitos emplean el par VLA-4/VCAM-1 para unir a las células estromales de bazo.

**Sistema humano:** A partir de cultivos primarios de amígdalas humanas se aisló una población homogénea de células adherentes (AMG). El análisis por FACScan demostró que éstas corresponden a células endoteliales de vénula, debido a su reacción positiva para el factor de von Willebrand y LVAP2, una molécula presente exclusivamente en endotelio de vénulas. Las células son negativas para marcadores presentes en células dendríticas interdigitantes, dendríticas foliculares o macrófagos. Expresan ICAM-1, VCAM-1, CD40 y luego de inducción por IFN- $\gamma$ , expresan antígenos MHC clase II. A diferencia de las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC), el modelo clásico de estudio *in vitro*, las células AMG no necesitan ser activadas por citoquinas para unir células linfoides via VLA-4. Los anticuerpos anti- $\alpha_4$  y anti- $\beta_1$ , bloquearon la adhesión de la línea celular RAMOS a HUVEC tratadas

con TNF- $\alpha$  y a AMG no tratadas. Por otra parte, un anticuerpo anti VCAM-1 que bloquea la adhesión de RAMOS a HUVEC tratadas con TNF- $\alpha$ , no bloqueó la adhesión de estas células a AMG, sugiriendo la presencia sobre las células endoteliales de amígdala de un ligando de VLA-4 diferente de VCAM-1. Nuestros datos indican que este ligando no sería fibronectina. La adhesión de la línea celular DAUDI a AMG y el efecto de los anticuerpos anti- $\alpha_4$  y anti-VCAM-1, en esta adhesión, fortalece la idea de un ligando de VLA-4 distinto de VCAM-1 y de fibronectina.

Se concluye que las células endoteliales de amígdala humana son un modelo útil para estudiar las interacciones de los linfocitos con el endotelio linfoide puesto que pueden ser mantenidas en cultivo en un estado adhesivo funcional.

Tissue culture

## ABSTRACT

The adhesive interactions between lymphocytes and the cells conforming the microenvironment of secondary lymphoid organs (SLO) are essential for lymphocyte migration as well as lymphocyte proliferation and differentiation. However, present models utilized to study these interactions are sparing and do not include purified stromal cells. To investigate the adhesion receptors involved in the establishment of the interactions between lymphocytes and stromal cells in SLO, we have developed adhesion models *in vitro* with stromal cells from mouse spleen and human tonsil.

Murine system: Starting from primary spleen cultures we have isolated and maintained two stromal cell lines, B-1 and B-2, with one and two morphological cell types respectively. We have used complete stromas as well as the two derived adherent cell cultures, B-1 and B-2, in adhesion studies of murine lymphocytes. Also, we have developed a xenogeneic model to identify the adhesion receptors utilized by human lymphocytes in their interaction with murine spleen stromal cells.

Flow cytometry analysis indicates that the B-1 and B-2 cells express CD44 and VCAM-1 molecules in their surface. The B-2 culture presents at least two types of cells as indicated by the presence, in a percentage of the cells, of Fc receptors and the CD11b molecule. These cells are negative for characteristic markers of interdigitant dendritic cells, follicular dendritic cells or macrophages. These results suggest the presence of reticular cells in these cultures.

Mononuclear cells prepared from murine spleen adhere to the complete spleen stromas and to the B-1 and B-2 cell lines by 30-40%. Activation of mononuclear cells with ConA (but not with LPS) increases binding to complete stromas by a factor two. In contrast, adhesion of mononuclear to the B-1 and B-2 does not change after activation. Isolated B lymphocytes adhere to the complete stromas and to the B-1 and B-2 cultures by 25%, 17%

and 35% respectively, while T cells bind by approximately 12% to all three stromas. After activation with ConA the T lymphocytes adhesion increases by a factor three.

Adhesion of the human DAUDI cell line to B-1 and B-2 cultures was inhibited by an antibody to the  $\alpha_4$  subunit of human  $\beta_1$  integrins by 95% and 60% and by an anti-(murine) VCAM-1 antibody by 80% and 50% respectively. Also, adhesion of the RAMOS cell line to B-2 cells was inhibited by anti- $\alpha_4$  and anti-VCAM-1 antibodies by 75% and 50% respectively. These results suggest that lymphocytes use the VLA-4/VCAM-1 pair to bind to spleen stromal cells. On the other hand, although adhesion of the DAUDI cell line to complete spleen stromas was blocked by the anti-(murine) VCAM-1 by 60%, was not blocked by the anti-(human)  $\alpha_4$  antibody.

It is concluded that adherent murine spleen cells in culture are a valid model to study human lymphocyte-spleen stromal cell interactions and that human lymphocytes employ the VLA-4/VCAM-1 pair to bind to spleen stromal cells.

#### Human system:

Starting from primary cultures of human tonsils we isolated a homogeneous population of adherent cells (AMG). FACScan analyses demonstrate that these cells correspond to endothelial venule cells. They are positive for von Willebrand factor and LVAP2, a molecule present in endothelial venule cells. The cells are negative for markers present in interdigitant dendritic cells, follicular dendritic cells and macrophages. They express ICAM-1, VCAM-1, CD40 and can be induced by IFN- $\gamma$  to express MHC class II antigens. As opposed to endothelial cells from human umbilical cord (HUVEC), the classic model for in vitro adhesion studies, the AMG cells do not need to be activated by cytokines to bind lymphoid cells via VLA-4. Anti- $\alpha_4$  and anti- $\beta_1$  antibodies block adhesion of the RAMOS cell line to TNF- $\alpha$  treated HUVEC and to untreated AMG. On the other hand, an anti-VCAM-1 antibody that blocks adhesion of RAMOS to TNF- $\alpha$  treated HUVEC, does not block adhesion of these cells to AMG, suggesting the presence on the tonsillar endothelial cells of a ligand for VLA-4 different from VCAM-1. Our

data indicate that this ligand is not fibronectin. Adhesion of the DAUDI cells to AMG and the effect of the anti- $\alpha_4$  and anti-VCAM-1 antibodies on this binding strengthen the idea of a VLA-4 ligand different from VCAM-1 and fibronectin.

The demonstration that endothelial cells from human tonsils can be maintained in a functional adhesive state in culture provides a useful model to study lymphocyte-lymphoid endothelium interactions.

# INTRODUCCION

## 1. MOLECULAS DE ADHESION

Se han descrito cuatro familias de moléculas de adhesión, agrupadas en base a su estructura: familia de las integrinas, superfamilia de las inmunoglobulinas, familia de las selectinas y la familia de las caderinas. En las tres primeras existen moléculas de adhesión importantes en el sistema inmune.

### 1.1. FAMILIA DE LAS INTEGRINAS

Las integrinas son un grupo de moléculas de amplia distribución tanto en vertebrados como en invertebrados y representan importantes estructuras adhesivas en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (Long, 1992; Springer, 1990).

#### 1.1.1. Estructura

Todas las integrinas son heterodímeros  $\alpha\beta$  unidos no covalentemente. Tanto las subunidades  $\alpha$  como las  $\beta$  son glicoproteínas de transmembrana, con un pequeño dominio carboxilo terminal citoplasmático, a excepción de  $\beta_4$ , y un gran dominio amino-terminal en la región extracelular. Las subunidades  $\beta$  contienen 4 repeticiones de un dominio de 40 residuos aminoácidos ricos en cisteínas, indicativo de enlaces disulfuros intracatenarios (Hynes, 1987). En el extremo amino terminal de las subunidades  $\alpha$  existen siete dominios de aproximadamente 60 aminoácidos cada uno (dominios I-VII). Los tres o cuatro últimos son sitios de unión para cationes divalentes semejantes a los encontrados en proteínas que requieren magnesio y/o calcio, tal como calmodulina. Todas las integrinas  $\beta_2$ , junto con las integrinas  $\beta_1$  VLA-1 y

ii.

7

VLA-2, contienen un dominio  $\hat{i}$  (o Insertado) de aproximadamente 200 aminoácidos entre los dominios II y III, cuya función es desconocida (Hogg, 1992; Long, 1992). Los dominios intracelulares de muchas integrinas interactúan con el citoesqueleto a través de proteínas como talina y  $\alpha$ -actinina (Hynes, 1992).

En la familia de las integrinas se conocen 14 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$  encontradas en 20 combinaciones heterodiméricas (Hynes, 1992). Las subunidades  $\alpha$  varían en tamaño entre 120 y 180 Kd y las  $\beta$  entre 90 y 110 Kd. Aunque la mayoría de las subunidades  $\alpha$  se encuentran asociadas con la misma subunidad, otras pueden asociarse con más de una subunidad  $\beta$ , de ahí que la nomenclatura más aplicable es la de  $\alpha\beta$  (Hynes, 1992). Según las subunidades  $\beta$  se distinguen a lo menos cuatro subfamilias, las  $\beta_1$  (o VLA),  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  y  $\beta_7$ . En la tabla I se muestran las diferentes asociaciones del heterodímero, los nombres alternativos más comunes y los sitios de reconocimiento en sus ligandos.

### 1.1.2. Ligandos

Las funciones de las integrinas se han dilucidado mediante ensayos de adhesión celular, anticuerpos monoclonales y cromatografía de afinidad. La mayoría de los ligandos que aparecen en la Tabla 1 son elementos ya sea de la matriz extracelular (FN, LM, Col, vW, TSP, etc.) o contrareceptores celulares miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, tales como: ICAM-1, ICAM-2 y VCAM-1.

### 1.1.3. Sitios de reconocimiento en sus ligandos

*Secuencia RGD*: La secuencia RGD (arg-gly-asp) presente en FN, VN y otras moléculas de la matriz extracelular fue el primer sitio de reconocimiento experimentalmente definido. Las integrinas VLA-5, GPIIb/IIIa, y casi todas las  $\alpha_v\beta$  reconocen RGD en sus ligandos.

*CS-1*: La integrina VLA-4 reconoce la secuencia LDV (leu-asp-val) en el segmento variable de la fibronectina (CS-1). Los sitios de reconocimiento en la integrina VLA-4 para sus ligandos fibronectina y VCAM-1 son diferentes, pero se ubican próximos (Elices y col., 1990).

**TABLA I**  
**LA FAMILIA DE LAS INTEGRINAS**

Asociación $\alpha\beta$	Nombre Común	Nomenclatura CD	Ligandos	
$\beta_1^a$	$\alpha_1$	VLA-1	CD49a/CD29	col.I (DGEA), col IV, LM
	$\alpha_2$	VLA-2	CD49b/CD2	col.I, col IV, LM, TSP
	$\alpha_3^a$	VLA-3 <sup>e</sup>	CD49c/CD29	epiligrina, col I, Col III, FN, LM.
	$\alpha_4$	VLA-4	CD49d/CD29	FN (V25/EILDV), VCAM-1, TSP
	$\alpha_5$	VLA-5	CD49e/CD29	FN(RGD), TSP
	$\alpha_6^a$	VLA-6	CD49f/CD29	LM
	$\alpha_7$	VLA-7		LM
	$\alpha_8$	VLA-8		?
	$\alpha_v$			FN (?) VN (RGD)
$\beta_2$	$\alpha_L$	LFA-1	CD11a/CD18	ICAM-1, ICAM-2
	$\alpha_M$	Mac-1	CD11b/CD18	C3b, FG, Fx, ICAM-1
		p150/90	CD11c/CD18	FG(GPRP), C3b?
$\beta_3^a$	$\alpha_{IIb}$	GPIIb/IIIa	CD41/CD61	FG(KQAGDV), TSP, vW, VN, FN (RGD) <sup>f</sup>
	$\alpha_v$		CD51/CD61	VN, FG, vW, TSP, Col, FN (RGD) <sup>f</sup>
$\beta_4^a$	$\alpha_6^a$			LM ?? <sup>d</sup>
$\beta_5$	$\alpha_v$			VN(RGD)
$\beta_6$	$\alpha_v$			FN(RGD)
$\beta_7(=\beta_p)$	$\alpha_4$	LPAM-1 <sup>c</sup>		MAdCAM1, FN, VCAM1 (V25/EILDV)
	$\alpha_{IEL}^b$			?
$\beta_8$	$\alpha_v$			?

**CONOCIMIENTO ACTUAL DE LAS INTEGRINAS DE VERTEBRADOS.** Se conocen las secuencias de ADNc para todas las subunidades, excepto  $\alpha_7$  y  $\alpha_{IEL}$ . Las subfamilias comparten la subunidad  $\beta$  ( $\beta_1, \beta_2, \beta_3$  y  $\beta_7$ ). Varias de las subunidades  $\alpha$  pueden interactuar con más de una subunidad  $\beta$ . Cada receptor reconoce una o más proteínas de la matriz extracelular o contrareceptores, sobre otras células. Entre paréntesis se muestra la secuencia aminoácídica reconocida por la Integrina en el ligando. FN, fibronectina; FG, fibrinógeno; vW, factor de von Willebrand; Fx, factor x; LM, laminina; VN, vitronectina; TSP, trombospondina; ICAM: molécula de adhesión intercelular; VCAM, molécula de adhesión vascular; MAdCAM, adhesina de la mucosa; RGD, arg-gly-asp; DGEA, asp-gly-glu-ala; EILDV, glu-ile-leu-asp-val, V25, segmento de 25 aminoácidos o CS-1; KQAGDV, lys-gln-ala-gly-asp-val.

a: Dominios citoplasmáticos pueden sufrir procesamiento diferencial.

b:  $\alpha_{IEL}$  es expresada exclusivamente en linfocitos intraepiteliales.

c: La especificidad de este receptor no es clara en cuanto a si une a los mismos ligandos que VLA-4 (FN y VCAM-1). En algunas células une a los mismos ligandos (Rægg y col., 1992) pero en otras es mucho más débil que VLA-4 (Chan y col., 1992).

d: Especificidad controversial

e: No está claro si este receptor reconoce la secuencia RGD en sus ligandos.

f: RGD es reconocida en todos los ligandos (se muestra sólo en FN) y KQAGDV sólo en FG.

?: desconocido.

*Otras secuencias:* GPIIb/IIIa reconoce, además de la secuencia RGD en sus ligandos, la secuencia lys-gln-ala-gly-asp-val (KQAGDV) en fibrinógeno. La integrina VLA-2 reconoce asp-gly-glu-ala (DGEA) en colágeno tipo I. Aquellos receptores que unen laminina reconocen diferentes regiones en la molécula, en sitios aún no bien caracterizados.

#### 1.1.4. Las integrinas $\beta_1$

Las integrinas  $\beta_1$  se denominan VLA ("very late antigen") porque las dos primeras moléculas identificadas (VLA-1 y VLA-2) aparecen tardíamente después de la activación de las células T por antígenos o mitógenos. Además de expresarse en leucocitos no neutrófilos (Szekanecz y col., 1992) se expresan en plaquetas, células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos. Se han identificado al momento 8 moléculas VLA. La cadena  $\alpha$  presenta regiones de unión a calcio y magnesio esenciales en la adhesión. Las integrinas VLA median importantes funciones, particularmente VLA-4.

**VLA-4:** La integrina VLA-4 está presente en linfocitos, líneas T y B, monocitos, macrófagos, fibroblastos, líneas tumorales de melanomas y osteosarcomas, y en varios tejidos en desarrollo (Dean y col., 1993; Springer, 1990).

La integrina VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ ) y su contrareceptor VCAM-1 median interacciones celulares importantes en la diferenciación y reparación del músculo esquelético (Dean y col., 1993; Menko & Boettiger, 1987), en metástasis tumorales (Dean y col., 1993) y en linfo y mielopoiesis (Miyake y col., 1991). La interacción tiene consecuencias que se extienden más allá de la simple colocación entre células VLA-4<sup>+</sup> y células VCAM-1<sup>+</sup>, puesto que induce la activación de células CD4<sup>+</sup> dependiente del TCR y la expresión génica. VLA-4 transduce una señal en células B, ya que el entrecruzamiento de esta molécula con anticuerpos anti-VLA-4 o por sus ligandos naturales induce la fosforilación de una proteína de 110 kD de función desconocida (Kornberg & Juliano, 1992).

Al parecer la síntesis de  $\alpha_4$  controla la expresión de VLA-4 en la membrana. Recientemente se ha descrito, en el gen de VLA-4, una secuencia silenciadora activa sólo en líneas  $\alpha_4^-$ , y la presencia de un enhancer 3' de la caja TATA que explicaría la expresión constitutiva en miotubos, semejante a lo encontrado para VCAM-1 (Dean y col., 1993).

**LPAM-1 ( $\alpha_4/\beta_7$ ):** Esta integrina une a la molécula MadCAM-1, que se encuentra en vénulas del tipo columnar (HEV) de tejidos linfoides asociados a mucosa. VLA-4 no reconoce a este ligando (Springer, 1994). Existe evidencia en conflicto respecto de si  $\alpha_4\beta_7$  también une a VCAM-1 y a fibronectina (Chan y col., 1992; Ruegg y col., 1992).

**VLA-5:** Esta molécula ha sido descrita como el receptor de fibronectina. Actúa como mediador en la migración de los linfocitos a través de HEV de nódulos linfáticos periféricos (NLP) de rata (Szekanecz y col., 1992) y se ha sugerido que es capaz de inducir, por interacción con su ligando, señales de proliferación (Kornberg & Juliano, 1992). La molécula VLA-5 se encuentra presente en un amplio número de células (Tabla I).

### 1.1.5. Las integrinas $\beta_2$

Las integrinas LFA-1, Mac-1 y p150,95 componen a la subfamilia  $\beta_2$ . La expresión de las integrinas  $\beta_2$  está restringida a los leucocitos, donde juegan roles de importancia en la migración de estas células a los tejidos inflamados.

**LFA-1:** Esta molécula está presente en todos los leucocitos humanos y murinos (Sánchez-Madrid, 1982). En murinos se la ha encontrado en el linaje granulocítico, desde la célula progenitora hasta la célula madura (Long, 1992; Sánchez-Madrid, 1982).

LFA-1 participa en las interacciones de los linfocitos T de ayuda con las células presentadoras de antígenos, en la unión de los linfocitos citotóxicos y los "natural killer" a las células blanco, y en la interacción de los leucocitos con el endotelio (Springer, 1990; Long, 1992).

Su función es activada por  $Mg^{++}$  e inhibida por  $Ca^{++}$  (Hogg, 1992). LFA-1 es el contrareceptor de ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3 y se une al primer dominio semejante a inmunoglobulina de ICAM-1.

**Mac-1:** En humanos y murinos, Mac-1 se encuentra presente en monocitos, macrófagos, granulocitos y células "natural killer". También está presente en células dendríticas foliculares (FDC) y en algunas líneas linfoides. Mac-1 se expresa en la mayoría de los neutrófilos maduros y en un pequeño porcentaje de monocitos maduros (Long, 1992). Al igual que p150,95 se puede encontrar intracitoplasmáticamente, movilizándose rápidamente luego de un estímulo fisiológico. Sus ligandos son ICAM-1 y el componente C3bi del complemento. Mac-1 une a ICAM-1 en el tercer dominio semejante a inmunoglobulina (Diamond y col., 1991).

**P150,95:** Esta molécula de adhesión tiene una función similar a Mac-1. Se encuentra en monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (Metlay y col., 1990) y está ausente en linfocitos normales. Se encuentra también en algunas líneas de células B y clones de linfocitos T citotóxicos (Hogg, 1993).

### 1.1.6. Activación de las integrinas

Un carácter distintivo de las integrinas presentes en los leucocitos, es que éstas no se encuentran normalmente activas para unir a sus ligandos. Se piensa que la activación ocurre gracias a interacciones del dominio citoplasmático con otros elementos intracelulares. En el caso de GPIIb-IIIa, la eliminación de gran parte de la región citoplasmática de la subunidad  $\alpha$  activa a la integrina en su unión a fibrinógeno (O'Toole y col., 1991). También, se ha sugerido que la especificidad de las integrinas por sus distintos ligandos estaría regulada por el estado de activación de la integrina (Hynes y col., 1992; Hogg y col., 1993; Masumoto & Hemler, 1993). Se ha sugerido que, la señal inicial de activación es una señal "inside out" (desde dentro de la célula), que puede ser gatillada a través del entrecruzamiento de otras moléculas de superficie, o por unión del ligando inmovilizado ("señal outside in").

La adhesión puede ser controlada en varias formas:

**a. Cambios en la expresión de superficie:** Es bien conocido que las citoquinas producidas en la inflamación aumentan la expresión de superficie de ICAM-1 y VCAM-1 (Bevilacqua, 1993).

**b. Cambios en la concentración efectiva:** La agrupación de los receptores en la membrana, sin que existan cambios en la afinidad de estos, podría ser responsable del aumento de la adhesión. No existen evidencias de agrupación de receptores por señales "inside out", pero la microagregación no puede excluirse como mecanismo. En líneas T y B, por ejemplo, ICAM-1 se concentra en los procesos celulares donde las células se adhieren al sustrato (Hogg, 1993).

**c. Cambios en la afinidad:** Existe información que los cambios conformacionales en las integrinas serían responsables del aumento de la afinidad por sus ligandos (Hynes, 1992; Hogg, 1993; Pardi y col., 1992). La afinidad de LFA-1 puede aumentar hasta 200 veces luego de activación de la molécula (Springer, 1994). Múltiples estados conformacionales de  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Freelinger y col., 1991) y de VLA-4 (Masumoto & Hemler, 1993) determinarían la especificidad por diferentes ligandos. En el caso de VLA-4 los cationes divalentes inducirían estos cambios conformacionales (Masumoto & Hemler, 1993).

#### **Activadores de las integrinas:**

**a. Receptores antigénicos y otras moléculas adhesivas:** Señales gatilladas a través del complejo TCR/CD3 (Hahn y col., 1993; Julius y col., 1993; O'Rourke & Mescher, 1993) o a través de Ig (Cushley & Harnett, 1993) son iniciadas por tirosinas quinasas de la familia c-src y llevan a la activación de la ruta de los fosfoinosítidos, con activación de la proteína quinasa C y aumento de calcio intracelular. Las señales gatilladas a través del complejo TCR/CD3 activa a CD2 provocando la unión a sus ligandos, lo que a su vez gatilla señales coestimuladoras con el TCR y de activación a otras moléculas como LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6 y  $\alpha_v\beta_3$  siguiendo una cascada de señalizaciones que colaboran con las señales del TCR y transmiten señales

únicas e importantes en la función y diferenciación linfocitaria. En las interacciones entre las células T y B, la molécula LFA-1 contribuye a la activación de la célula T a través de múltiples formas: aumentando la eficacia del reconocimiento antigénico, a través de señales en las células T que aumentan la activación, y a través de señales en las células B que aumentan la presentación antigénica (Moy & Brian, 1992).

**b. Receptores de quimioattractantes:** Los quimioattractantes son los mejores candidatos para activación de las integrinas en la interacción de los leucocitos con la vasculatura (Springer, 1994). Por su unión a receptores específicos no sólo dirigen la migración sino que activan a las integrinas. Todos los efectos de los quimioattractantes son mediados a través de proteína G sensible a la toxina Pertussis. La presencia de sitios de unión a heparina en las quimoquinas, permitiría su retención en la matriz extracelular y en la superficie celular.

**c. Lípidos:** Algunos lípidos presentes en plaquetas activadas y que aumentan en neutrófilos activados (integrin modulating factor: IMF-1) son capaces de activar la interacción GPIIbIIIa/FG y Mac-1 respectivamente (Hynes, 1992).

**d. Ligando:** Péptidos RGD son capaces de inducir nuevos epitopos (ligand-induced binding sites or "LIBS") en la integrina GPIIbIIIa, los que se encuentran sólo cuando la integrina está activa, y de inducir la unión de la integrina a fibrinógeno inmovilizado (Freelinger y col., 1991).

**e. Factores tipo-celular específicos:** Diferentes tipos de líneas celulares que expresan niveles similares de la integrina VLA-4 muestran diferentes rangos de actividades de VLA-4; desde células inactivas para la unión (U937), a células más activas para la adhesión a VCAM-1 que a CS-1 (RAMOS), y a células activas en la unión a ambos ligandos. Lo anterior sugiere la presencia de factores celulares específicos (Masumoto & Hemler, 1993).

**f. Anticuerpos monoclonales:** La activación de moléculas como LFA-1 (Hogg, 1992) y VLA-4 (Masumoto & Hemler, 1993) puede ser imitada desde fuera de la célula por fragmentos Fab de anticuerpos monoclonales arguyendo que la activación de estos receptores puede ocurrir por cambios conformacionales. En apoyo a que las conformaciones activas del receptor pueden ser varias, se ha reportado la existencia de tres anticuerpos

activadores de LFA-1 que reconocen epitopos separados en la región extracelular de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ .

**g. Otras moléculas:** El éster de forbol PMA, conocido activador de PKC a concentraciones de 10-100 nM luego de tratamientos cortos (10-15 min.), activan a las integrinas de la subfamilia  $\beta_1$  (Chan y col., 1992; Male y col., 1994) y  $\beta_2$  (Male y col., 1994; Tamatani y col., 1991), sin producir cambios en el nivel de expresión, los que sí se pueden lograr por tratamiento más prolongado. Mitógenos como ConA y enterotoxina B son capaces de mediar la activación y aumento en la expresión luego de tratamientos por 24-48 horas (Ferguson & Kupper, 1993; Male y col., 1992).

### 1.1.7. Transducción de señales por las integrinas

Es claro que las integrinas son moléculas transductoras de señales intracelulares (Guan y col., 1992; Hynes, 1992; Kornberg & Juliano, 1992). Se sostiene que las integrinas son verdaderos receptores, dado que pueden alterar el patrón de fosforilación en tirosina de proteínas de 120-130 kD a un máximo luego de 5-10 min. de agruparlas con segundo anticuerpo. Una de las proteínas que aumentan su fosforilación en tirosina es la tirosina quinasa de los contactos focales (FAK), gatillando así una cascada de fosforilaciones (Zachary & Rozengurt, 1992). El mismo nivel de fosforilación de FAK ocurre por agregación artificial de los receptores de adhesión o por el ligando fibronectina, sugiriendo que la agrupación del receptor inducida por ligando puede gatillar una segunda señal de activación ("outside in"). Las tirosinas quinasas c-src están unidas a la membrana por anclaje lipídico permitiendo que estén bien posicionadas para interactuar con moléculas de dominios citoplasmáticos cortos, tales como: Ig, CD4, CD8 y TCR. La agrupación de los receptores parece ser importante en la activación de estas quinasas (Julius y col., 1993; O'Rourke & Mescher, 1993). Recientemente se encontró que la adhesión de fibroblastos a fibronectina promueve la asociación *in vivo* de FAK con c-src y con la proteína adaptadora GRB2. Lo anterior podría promover cambios en la expresión génica a través de la ruta de transducción de RAS/MAPK (Schlaepfer y col., 1994).

## 1.2. SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Los miembros de esta familia comprenden moléculas de adhesión célula-célula y moléculas especializadas en el reconocimiento antigénico como son el TCR, Ig, CD4, CD8 y las moléculas MHC.

### Las moléculas LFA

Existen tres moléculas LFA, dos de las cuales, CD2 y LFA-3, son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (SFIg) y LFA-1, miembro de las integrinas  $\beta_2$ . Estas moléculas median interacciones antígeno independientes, que conllevan a la generación de señales de transducción únicas y que amplifican las señales intracelulares mediadas por receptores antigénicos (Hynes, 1992).

**LFA-2 (CD2):** La molécula CD2, que está presente en líneas linfoides y linfocitos T, media la adhesión homotípica de células T, y su ligando es LFA-3 (Sánchez-Madrid, 1982).

**LFA-3:** Presente en linfocitos T y B (Sánchez-Madrid, 1982) y en células dendríticas (Prickett y col., 1992). Posee dos tipos de anclaje a la membrana; una forma típica con una estructura transmembrana hidrofóbica y una forma menos común de anclaje a la membrana por fosfatidilinositol.

### Las moléculas ICAM

Las tres moléculas del grupo de las ICAM se especializan en diferentes aspectos de las interacciones dependientes de LFA-1 ( un ligando común de la subfamilia  $\beta_2$  de las integrinas ).

**ICAM-1:** Esta molécula es el principal ligando para LFA-1 y también sirve de ligando para Mac-1, CD43 (sialoglicoproteína), rinovirus y Plasmodium falciparum (estado eritrocito infectado). ICAM-1 posee 5 dominios semejantes a Ig y usa los primeros tres para unir a sus ligandos. LFA-1 une al dominio 1, en cambio Mac-1 (CR3) une al dominio 3 (Diamond y col., 1991). La molécula ICAM-1 es expresada basalmente sobre el endotelio y células epiteliales,

donde su expresión es dramáticamente aumentada por citoquinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Bevilacqua, 1993).

**ICAM-2:** la molécula ICAM-2 se expresa constitutivamente sobre el endotelio y puede ser esencial para la recirculación normal. Posee dos dominios semejantes a Ig (Springer, 1992).

**ICAM-3:** Esta molécula se expresa en los leucocitos y se encuentra ausente del endotelio. Sobre linfocitos en reposo, neutrófilos o monocitos se encuentra en niveles mucho más altos que ICAM-1 o ICAM-2. Desde un punto de vista funcional es el principal responsable en mediar la adhesión de linfocitos T en reposo a LFA-1 purificada, sugiriendo que tiene un rol en iniciar las respuestas inmunes (De Fougères & Springer, 1992). Se ha sugerido que ICAM-3 tendría un rol inductor en la interacción de LFA-1 con ICAM-1 (Campanero y col., 1993).

**VCAM-1:** Se ha mostrado que por procesamiento diferencial del ARNm se producen dos formas de VCAM-1 (humano) una que posee 7 dominios semejantes a Ig y otra de 6 dominios. El dominio 4, que sufre procesamiento alternativo, otorga un segundo sitio de unión en la molécula de 7 dominios, además del dominio 1 presente en ambas formas (Vonderheide & Springer, 1992). En murino también se han descrito dos formas, una de tres dominios (anclada por fosfolípido) y otra de 7 dominios (Springer, 1994). VCAM-1 se expresa sobre el endotelio estimulado y es importante en dirigir la trans migración de linfocitos, eosinófilos y monocitos en inflamación. Esta molécula también se expresa en células estromales de médula ósea, donde media las etapas iniciales de la linfopoiesis (Miyake y col., 1991), y en las células dendríticas foliculares (Koopman y col., 1994) siendo crítica su participación en la maduración de las células inmunes.

**MadCAM-1:** Es una molécula con tres dominios semejantes a Ig más una región semejante a mucina. La molécula está presente en HEV de tejidos linfoides asociados a mucosa y vénulas en la lámina propia. Une al receptor de "homing"  $\alpha_4\beta_7$  (Springer, 1994).

### 1.3. LAS SELECTINAS

Estructuralmente contienen en su extremo amino terminal, una secuencia de aproximadamente 120 aminoácidos, homóloga a un dominio de lectina dependiente de calcio, fundamental en la adhesión. La estructura de la molécula continúa con una secuencia similar a la presente en el factor de crecimiento epidermal (EGF) de función desconocida. Más hacia el carboxilo terminal presentan 2 a 7 secuencias de 62 aminoácidos de largo ricas en cisteínas, repetidas en tandem y homólogas a proteínas que unen componentes del complemento. Las selectinas median la adherencia inicial de los leucocitos al endotelio (Bevilacqua, 1993; Springer, 1990; Springer, 1994).

**Selectina-L (MEL-14 o gp90MEL):** Esta molécula se expresa en todos los leucocitos circulantes, con la excepción de un subtipo de linfocitos de memoria. En los linfocitos activados se presenta un rápido incremento de la afinidad de la selectina-L por su ligando (Springer, 1994). La selectina-L reconoce dos mucinas presentes en las HEV de nódulos linfáticos periféricos: Glycam-1 la que se secreta y CD34 que está en la superficie celular. En las células endoteliales que no son columnares reconoce otros ligandos no bien caracterizados del tipo de carbohidratos y también puede unir a la selectina-E (Springer, 1994).

**Selectina-E (ELAM-1):** Esta molécula se induce en el endotelio por citoquinas como IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y por el mitógeno LPS, lo que requiere de la síntesis *de novo* de la proteína (Bevilacqua, 1993). La selectina-E reconoce al antígeno CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen) presente en una subpoblación de linfocitos de memoria de la piel.

### 1.4. MOLECULAS DE ADHESION NO CLASIFICADAS

**VAP-1 :** La molécula VAP-1 (90 kD) se ha encontrado de forma abundante en HEV de órganos linfoides periféricos (amígdalas, nódulos linfoides) y también, aunque considerablemente menos, en los tejidos linfoides asociados a mucosa

(placas de Peyer y lámina propia del intestino) Esta molécula está ausente en fibroblastos, leucocitos, células epiteliales, endotelio de capilares y de vasos grandes. Su expresión aumentada en tejidos inflamados sugiere, además de un rol en recirculación normal, su participación en la regulación de la entrada de los leucocitos a los sitios de inflamación (Salmi y col., 1993). El ligando de esta molécula es desconocido.

**LVAP-2:** Es una molécula de 70 kD presente en una subpoblación de vénulas en los tejidos linfoides (amígdalas y NLP) y no linfoides (sinovio, cerebro, y piel). En vénulas de amígdala se incluyen unas pocas HEV. En células endoteliales de cordón umbilical en cultivo se expresa constitutivamente y media la adhesión de linfocitos. También se ha detectado en linfocitos B y T CD8<sup>+</sup>. Capilares y arterias son negativos para la expresión de esta molécula. El ligando de LVAP-2 es desconocido (Airas y col., 1993).

**CD44 (Pgp1, HERMES y ECMRIII):** La molécula CD44 es un proteoglicán integral de membrana polimórfico de 80 a 90 kD, que se encuentra presente en células T, células B, macrófagos, FDC, células epiteliales, fibroblastos, eritrocitos y células neurales. Participa como receptor de "homing" a las placas de Peyer y NLP, en la adhesión de células pre B a células estromales de médula ósea jugando un rol en hematopoiesis (Miyake y col., 1990). Los ligandos reconocidos por esta molécula son elementos de la matriz extracelular, tales como, el ácido hialurónico (Aruffo y col., 1990; Miyake y col., 1990), la fibronectina y el colágeno tipo VI. Varias evidencias sugieren que CD44 media la activación de las integrinas gracias a su capacidad para unir a miembros de la familia de las quimioquinas (Tanaka y col., 1993 a y b). También se ha sugerido un rol en metástasis y en la activación linfocitaria (Arch y col., 1992).

## **2. MOLECULAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR**

### **2.1. FIBRONECTINA**

La fibronectina es una proteína multifuncional que juega un rol central en la adhesión celular (Ruoslahti, 1988). Se la puede encontrar de forma

soluble en el plasma, líquido cefalorraquídeo y sinovial y en su forma insoluble o fibrilar en las matrices extracelulares. La fibronectina plasmática proviene de la síntesis en hepatocitos y la de la matriz extracelular (fibronectina celular) de células en diversos tejidos.

### **2.1.1. Estructura**

En distintas especies la secuencia primaria, deducida a partir de ADNc (humano) o de proteína (bovino, rata y pollo) tiene un alto grado de homología. La fibronectina está compuesta de dos cadenas A y B, que se asocian a través de dos puentes disulfuro formando un dímero de 550 kD. Cada polipéptido está compuesto de repeticiones de tres tipos: I, II y III.

### **2.1.2. Sitios de unión**

La proteólisis controlada de fibronectina ha permitido asignar sitios de unión a otras moléculas de la MEC y de la superficie celular. Los sitios de unión incluyen (desde el amino al carboxilo terminal): fibrina y heparina (sitio I), estafilococo, colágenos (gelatina), ADN, célula, heparina (sitio II) y fibrina (sitio II).

**Unión a células:** Fibronectina tiene una jerarquía de a lo menos cinco sitios distintos que pueden mostrar función de adhesión independiente, pero es probable que funcionen cooperativamente, éstos son: dominio de unión a célula con dos sitios sinérgicos independientes (unión a VLA-5), dos dominios de unión a heparina requerida para la elaboración de contactos focales y organización de haces de microfilamentos por algunas células, y el segmento CS-1 aditivo al sitio de unión a célula y no sinérgico (Guan y col., 1990; Obara y col., 1988).

*Tripéptido RGD:* Fragmentos y péptidos que contienen la secuencia RGD adheridos en una superficie, promueven el "attachment", pero en solución lo inhiben. Sustituciones conservativas de la secuencia RGD eliminan la actividad de estos péptidos. En la décima repetición tipo III se encuentra la secuencia RGD (Main y col., 1992).

Regiones de fibronectina distintas a RGD son necesarias para el "spreading" de fibroblastos y actúan en sinergismo con RGD mediante un mecanismo de "sitios independientes". La supresión de un sitio no afecta la

conformación o actividad del otro, pudiendo complementarse estos sitios en *trans* (Obara y col., 1988). No está claro si estos sitios son adicionales o estabilizan la conformación de RGD.

*Segmento CS-1:* El segundo dominio de unión celular se identifica en la repetición tipo III variable (CS-1), que puede estar ausente y donde la talla puede variar en razón del procesamiento alternativo del mensajero. La secuencia LDV (leu-asp-val) en el segmento CS-1 es la secuencia mínima reconocida por la integrina VLA-4.

## **2.2. LAMININA**

La laminina es el constituyente universal de las láminas basales. Se sintetiza principalmente en las células endoteliales y epiteliales. Es una glicoproteína de gran tamaño (900 kD) formada por tres cadenas (A, B1, y B2) que interactúan entre sí por puentes disulfuro formando una estructura cruciforme, con tres brazos cortos y un brazo largo (Timpl & Dziadek, 1986). La laminina presenta dominios de unión para colágeno IV, heparina e integrinas (Tabla I).

## **2.3. COLAGENOS**

Los colágenos son las proteínas más abundantes de la MEC. Cada molécula de colágeno está formada por tres cadenas polipeptídicas que forman una triple hélice. Se distinguen 13 tipos de colágenos (Sandberg y col., 1989). El colágeno tipo IV es secretado exclusivamente por las células endoteliales y epiteliales (Timpl & Dziadek, 1986). Los fibroblastos sintetizan principalmente colágenos I, III y VI.

# **3. ORGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS**

## **3.1. Aspectos generales**

En los mamíferos, la diferenciación de las células del sistema hematopoiético ocurre fundamentalmente en los órganos linfoides. Especialmente para el caso de los linfocitos B y T, puesto que estas células

deben pasar de la circulación a los órganos linfáticos secundarios (OLS), un intercambio de células debe ocurrir entre dos compartimientos (sangre/límfico-microambiente linfóide). La pared de los vasos sanguíneos, que constituye una barrera al intercambio entre estos compartimientos está formada en los órganos linfoides, a excepción del bazo, por las llamadas células endoteliales columnares (HEV). El microambiente de los OLS presenta una organización compleja y compartimentalizada y está constituido fundamentalmente por las células estromales y por las proteínas de la matriz extracelular (MEC) que estas células secretan. La permanencia de los linfocitos en el estroma de los OLS dependerá de las interacciones que ocurran entre éstos y las células del estroma a través de los receptores de adhesión y las proteínas de la MEC. Existe abundante información respecto de los receptores y ligandos que intervienen en el fenómeno de "homing" y transvasación. Sin embargo, ésta es mucho más escasa en lo que respecta de los receptores que regularían la interacción entre los linfocitos y el microambiente de los respectivos OLS.

La diferenciación final de los linfocitos B y T ocurre fundamentalmente en los órganos linfoides secundarios. Mediante la utilización de cultivos de largo término de estromas de médula ósea y de órgano de timo se ha logrado adelantar enormemente en el conocimiento de las etapas de diferenciación de los linfocitos B y T a partir de sus precursores tempranos (Long, 1992). Sin embargo, existen grandes vacíos en nuestro conocimiento de las etapas finales de la diferenciación en los OLS.

### **3.2. Anatomía de los órganos linfoides secundarios**

Los tejidos linfoides secundarios se pueden clasificar en tres tipos : el bazo, los nódulos linfáticos, y el tejido linfóide asociado a mucosas como son las placas de Peyer y las amígdalas. Las principales diferencias entre estos órganos radica principalmente en el mecanismo por el cual son expuestos al antígeno. En los tejidos linfoides asociados a mucosa el influjo antigénico ocurre a través del epitelio a diferencia de los nódulos linfáticos que ocurre a través de la linfa aferente. El bazo, en cambio, capta antígenos sanguíneos (Paul, 1993; Van Ewick, 1977). Los linfocitos B predominan en las placas de Peyer, las amígdalas y el bazo, y los linfocitos T en los nódulos linfáticos que

drenan la piel (Stevens y col., 1982). También las células T de ayuda y citotóxicas se distribuyen preferentemente en distintos órganos (Kraal y col., 1983). Elementos únicos, presentes en cada órgano linfoide secundario, determinarán por tanto la ruta de recirculación de los distintos tipos y subtipos de linfocitos. En cuanto a la microarquitectura de los OLS (Krstic, 1991), ésta sigue un esquema que permite una segregación de las células B y T cuando están en su estado virgen, pero que luego de su encuentro con el antígeno permite el contacto en zonas bien determinadas del OLS (Rouse y col., 1984).

**3.2.1. Bazo:** El bazo está formado por un componente no linfoide, la pulpa roja, que funciona como un filtro general que remueve eritrocitos dañados y antígenos sanguíneos. El flujo sanguíneo que percola a través de la pulpa roja llega a la pulpa blanca donde los linfocitos se organizan alrededor de las arteriolas centrales en las mangas linfoides periarteriolas, PALS, ricas en células T (Van Ewick, 1977; Veerman & Van Ewick, 1975). Por otro lado, los folículos linfoides ricos en células B, se ubican a intervalos a lo largo de los PALS, en los centros germinales (CG), y contienen linfocitos B en alto grado de proliferación. La entrada de los linfocitos a la pulpa blanca del bazo se cree que ocurre en la zona marginal, teniendo ésta una función análoga a las HEV presentes en los otros OLS.

**3.2.2. Amígdalas palatinas:** Las amígdalas palatinas son uno de los OLS linfoepiteliales, que se ubican en la porción superior de la faringe (Krstic, 1991). Las amígdalas poseen invaginaciones epiteliales llamadas criptas que rodean a los folículos linfoides (primarios y secundarios), inmersos en regiones ricas en linfocitos T. Células dendríticas, linfocitos y macrófagos pueden penetrar en forma libre o en grupos entre las células epiteliales. En el tejido subepitelial se encuentran células reticulares, capilares y vénulas postcapilares (HEV).

### 3.3. Células estromales

Las regiones ricas en linfocitos T, los folículos linfoides primarios y los secundarios (con centros germinales) contienen diferentes células accesorias que se cree participan y posiblemente dirigen los eventos de

diferenciación celular en cada sitio. En las zonas T, dentro de una fina malla de células reticulares, se encuentran las llamadas células dendríticas interdigitantes (IDC) que expresan fuertemente los antígenos de MHC clase II, el marcador CD40, CD11c, LFA-3, CD44 e ICAM-1 (Prickett y col., 1992; Sheeren y col., 1991). Las IDC, eficientes presentadoras de antígeno, tendrían su origen en precursores mieloides en la médula ósea, y se diferenciarían a IDC por efecto de GM-CSF más TNF- $\alpha$  (Gieseler y col., 1991; Peters y col., 1991). Los folículos linfoides (zonas B) por otra parte, contienen dentro de la malla formada por las células reticulares, las células dendríticas foliculares (FDC) que unen complejos inmunes con gran afinidad (eicosomas) y los retienen por largos períodos de tiempo, actuando por lo tanto como efectivas células presentadoras de antígeno (Szakal y col., 1988). Se ha encontrado que las FDC muestran heterogeneidad fenotípica (Yoshida y col., 1991 y 1993) y se postula que derivarían de las células reticulares que conforman la malla. Las FDC expresan las moléculas CD40, ICAM-1, VCAM-1, integrinas VLA3-6, receptores de complemento y de Fc (Koopman y col., 1991; Shriever y col., 1989; Yoshida y col., 1993). La asociación de linfocitos B con las FDC en los centros germinales permitiría la selección fenotípica de las regiones variables de las Ig y la selección a células de memoria o efectoras. Existe evidencia de que la adhesión de las células B via LFA-1/ICAM-1 y via VLA-4/VCAM-1 contribuye al proceso de selección (Koopman y col., 1994). Dentro de los CG también encontramos macrófagos de cuerpos oscuros (llenos de desechos celulares), otro tipo de célula presentadora de antígeno. Cabe recalcar que estos elementos celulares (IDC, FDC, macrófagos) se encuentran dentro de una malla formada por las células reticulares, células cuya función en el proceso de diferenciación linfocitaria se desconoce. Se ha descrito heterogeneidad fenotípica de las células reticulares en distintas zonas del bazo e interacciones entre estas células y linfocitos *in situ*. (McNagny y col., 1991; Yoshida y col., 1991). En resumen, en las zonas T encontramos células reticulares e IDC mientras que en las zonas B encontramos células reticulares, FDC y macrófagos fundamentalmente.

## 4. RECIRCULACION DE LOS LINFOCITOS

### 4.1. Aspectos generales

Las propiedades circulatorias y migratorias de las células inmunes han evolucionado para permitir la eficiente protección de los tejidos a la invasión por agentes infecciosos y la rápida acumulación de estas células en los sitios de injuria e infección. Los linfocitos adquieren una predilección para recircular a través de cierto microambiente según sea el lugar en que ellos encontraron por primera vez el antígeno (Mackay y col., 1992). A diferencia de los linfocitos los granulocitos y monocitos no recirculan. A nivel molecular las señales de tráfico para la recirculación de linfocitos y localización de neutrófilos y monocitos son muy similares. Al menos tres pasos con múltiples elecciones moleculares en cada paso, dan una gran diversidad de señales. Respuestas selectivas de diferentes clases de leucocitos a agentes inflamatorios y patrones diferenciales de recirculación de subtipos de linfocitos, se puede explicar por la receptividad de cada tipo celular a distintas combinaciones de señales moleculares.

En búsqueda de antígenos extraños, los linfocitos siguen circuitos a través de los tejidos linfoides y no linfoides. Los órganos linfoides secundarios que drenan la piel, los músculos y el intestino difieren en el tipo de antígenos a los cuales los linfocitos son expuestos. Los linfocitos de animales adultos, pero no de recién nacidos, muestran una preferencia dos veces mayor por el tipo de órgano del cual vienen (piel, músculo) reapareciendo en la linfa eferente que drena este tejido; sugiriendo que el antígeno, en un microambiente linfoide particular, puede inducir la expresión de receptores de superficie que permiten la recirculación preferencial al órgano. De lo anterior existe evidencia para linfocitos recirculantes a través de pulmón, piel e intestino. Los linfocitos vírgenes y de memoria prefieren diferentes rutas de recirculación (Paul, 1993; Springer, 1994; Shimizu y col., 1992). Linfocitos vírgenes luego de encuentro con el antígeno son expandidos clonalmente y convertidos en linfocitos de memoria. Linfocitos de la linfa aferente que emigran a través del "endotelio plano" en la piel son todos del tipo memoria, pero los de la linfa eferente, derivados principalmente del tráfico a través de las HEV, son

preferencialmente vírgenes. Lo anterior es verdad al menos para los tejidos periféricos.

#### **4.2. Tráfico a través de HEV**

Las HEV presentes en todos los órganos linfoides secundarios, menos el bazo, median la recirculación normal de los linfocitos desde la sangre al órgano. La emigración al bazo, por contraste, involucra a células no definidas presentes en la zona marginal (Weston y col., 1992) y los mecanismos moleculares aún no son caracterizados. El fenotipo HEV es regulado durante el desarrollo, puesto que ligandos para selectina-L están ausentes en el nacimiento y se encuentran al nivel adulto. La privación de linfa aferente provoca una pérdida de HEV y de recirculación, que es restaurada por antígeno introducido al nódulo. La intensa estimulación antigénica también puede inducir HEV en tejidos no linfoides (Springer, 1994).

#### **4.3. Recirculación de linfocitos vírgenes**

**4.3.1. Nódulos linfáticos periféricos (NLP):** En HEV de NLP los ligandos de selectina-L son expresados en mayor cantidad, comparado a cualquier otro sitio en el cuerpo, y así pueden ayudar en la recirculación de la subpoblación de linfocitos selectina-L<sup>+</sup>. La molécula LFA-1 está implicada en la adhesión a HEV y en el "homing" *in vivo*. Sin embargo, en el ensayo de Stamper & Woodruff (adhesión a cortes congelados) los neutrófilos y monocitos (Selectina-L<sup>+</sup>, LFA-1<sup>+</sup>) pueden unir a HEV, pero éstos no recirculan normalmente. Por lo tanto, deben existir señales particulares a los linfocitos vírgenes. Receptores acoplados a proteína G son requeridos para la activación de LFA-1, dado que, los linfocitos pretratados con la toxina Pertussis no recirculan por los NLP. El quimioattractante liberado por HEV y su receptor esperan su identificación.

**4.3.2. Placas de Peyer:** Consistente con un nivel más bajo de ligando de selectina-L en HEV de placas de Peyer, comparado a NLP, dos integrinas participan en el "homing" a las placas de Peyer: LFA-1 y  $\alpha_4/\beta_7$ , las que contribuyen en el "homing" al tejido linfoide asociado a mucosa. La molécula  $\alpha_4/\beta_7$  une a la molécula MAdCAM-1.

A diferencia de los NLP las placas de Peyer pueden ser visualizadas con microscopía intravital, donde se ha observado que los linfocitos primero realizan el "rolling" a lo largo de HEV, por unos pocos segundos, luego se detienen y emigran (Springer, 1994). El tratamiento con toxina Pertussis inhibe la migración pero no el "rolling". Permanece por definir el posible quimioattractante causante de la activación de  $\alpha_4\beta_7$ , LFA-1 o ambos.

#### 4.4. Recirculación de linfocitos de memoria

**4.4.1. Piel:** Sólo los linfocitos encontrados en la piel expresan el antígeno CLA (Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen), que puede unir a selectina-E. Se ha sugerido que la interacción selectina-E/CLA puede contribuir al "homing" de linfocitos T de memoria a la piel.

**4.4.2. Intestino:** los linfocitos de memoria en el intestino tienen un fenotipo de superficie distinto a los de la piel. Una subpoblación distinta de linfocitos de memoria se localiza intraepitelialmente y expresan  $\alpha_{e(TEL)}/\beta_7$ . Su localización se inhibe por anticuerpos dirigidos a  $\alpha_{(TEL)}$ , sugiriendo su rol como receptor de "homing".

#### 4.5. Alteración del tráfico linfocitario en inflamación

El fenotipo de las células de memoria, que se acumulan en los tejidos inflamados, es bastante similar al de los linfocitos de memoria recirculantes en condiciones basales, sugiriendo que los mismos mecanismos que median el tráfico basal puede ser inducido en inflamación. La inflamación también afecta el tráfico a través de HEV. Antígeno inyectado al tejido que drena al nódulo linfoide regional, aumenta enormemente el tráfico de linfocitos vírgenes a través de HEV, y los linfocitos de memoria ahora parecen entrar directamente al nódulo; asociado con la inducción de VCAM-1 sobre endotelio no HEV dentro del nódulo.

Existe mucho por conocer acerca de las señales requeridas para la migración y localización de los linfocitos dentro de compartimentos anatómicos específicos. Dado que el tratamiento de los linfocitos con toxina Pertussis inhibe la migración en respuesta a antígeno, se sugiere la participación de quimioattractantes (Springer, 1994). La proteína MIP-1 $\beta$  aumenta dos veces la unión de la subpoblación de células T CD8<sup>+</sup> virgen a

VCAM-1 (Tanaka y col., 1993 b). Quimioquinas de la subfamilia cys-cys (RANTES, MIP1- $\beta$ , MCP-1) tienden a actuar sobre linfocitos y son un excelente candidato para dar la señal de activación de las integrinas y permitir así la migración de linfocitos *in vivo*.

# PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

2

## 1. Problema Propuesto

En el sistema inmune la transición entre los estados adherentes y no adherentes de los linfocitos B y T es fundamental para la protección inmune y el desarrollo de una respuesta inmune adecuada. Los receptores de adhesión están implicados en las distintas etapas de la activación de los linfocitos, en las funciones efectoras de los linfocitos citotóxicos y en la entrada de las células del sistema inmune a los sitios de inflamación. Sin embargo, muy poco se conoce acerca de las interacciones moleculares que regulan la entrada, distribución y permanencia de los linfocitos en los órganos linfoides secundarios. Las interacciones de los linfocitos con los elementos del estroma de los OLS (células y MEC) permitiría la proliferación clonal y la diferenciación a células efectoras capaces de migrar fuera del órgano linfoide y desarrollar una respuesta inmune.

## 2. Objetivo General

El objetivo general de nuestro proyecto es analizar los mecanismos de adhesión implicados en las interacciones de las células B y T con células estromales presentes en los órganos linfoides secundarios, así como también, establecer la relación entre los estados de diferenciación de los linfocitos y su capacidad adherente.

## 3. Hipótesis de trabajo

La hipótesis central del presente trabajo es que en cultivos de estromas completos de OLS es posible detectar células con capacidad de adherir linfocitos, y que estas interacciones adhesivas dependerán del tipo de linfocito, de su estado de diferenciación y del tipo de célula estromal.

#### **4. Objetivos Específicos:**

1.- Establecer sistemas de cultivo de células estromales obtenidas de OLS de fácil obtención como son: el bazo de ratón y las amígdalas humanas.

2.- Identificar los tipos de células estromales presentes en los cultivos. Esto se hará con anticuerpos monoclonales dirigidos a moléculas marcadoras y a receptores de adhesión.

3.- Estudiar la adhesión de linfocitos T y B de ratón y de líneas linfoides humanas a células estromales en cultivo.

4.- Establecer la participación de receptores de adhesión en la adhesión de células linfoides a células de estroma. Esto se hará utilizando anticuerpos monoclonales capaces de inhibir las interacciones celulares.

5.- Evaluar cambios en la capacidad adherente de los linfocitos luego de tratamiento de los linfocitos con activadores policlonales.

# MATERIALES Y METODOS

## 1. REACTIVOS

### 1.1 Medios, sueros fetales y antibióticos

Los siguientes materiales fueron obtenidos de las compañías que se indican a continuación: Sueros fetales de bovino (FCS) analizados para la presencia de micoplasmas y virus (Sigma, Gibco y Cultilab). Los medios de cultivo DMEM, RPMI-1640 y F-12 fueron adquiridos en Gibco. Los medios para cultivo celular fueron suplementados con antibióticos de Sigma: penicilina (100 U.I) y estreptomycinina (100 µg/ml).

### 1.2. Enzimas

Las siguientes enzimas se adquirieron de las compañías que se indican: colagenasa/disypasa (Boehringer # 269 638), tripsina (Sigma), colagenasa A (Boehringer # 103.578) y DNasa tipo I (Sigma).

### 1.3. Mitógenos y PMA

El mitógeno concanavalina A y el éster de forbol PMA fueron comprados en Sigma. El mitógeno LPS de Salmonella typhosa se obtuvo en Difco.

### 1.4. Moléculas radiomarcadas

Timidina tritiada ( $^3\text{[H]}\text{-TdR}$ ) fue comprada en Amersham y el cromato de sodio- $^{51}\text{[Cr]}$  fue comprado a la Comisión Chilena de Energía Nuclear.

### 1.6. Generales

Los siguientes reactivos fueron adquiridos en Sigma: Ficoll-paque d=1.083, fibronectina plasmática de bovino, albúmina plasmática de bovino (BSA), yoduro de propidio. Las perlas magnéticas (Dynabeads M-450) fueron de Biosys.

## 2. CELULAS ESTROMALES

### 2.1. Cultivos de células estromales murinas

Para la preparación de cultivos primarios de bazo se utilizaron ratones Balb/c machos de 4-6 semanas alimentados *ad libitum*. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, empapados en alcohol 70% e inmediatamente disectados dentro de la campana de flujo laminar con material quirúrgico esterilizado. Luego de la obtención del bazo éste se limpió de todo resto de tejido extra, se lavó en RPMI y se trasladó a una placa para cultivo de 100 mm en aproximadamente 10 ml de RPMI. El bazo se cortó transversalmente en dos y las células se liberaron con la ayuda de perfusión y presión utilizando una jeringa (aguja 23 G1) y una pinza de punta plana. La operación anterior se realizó hasta liberar el máximo número de células (cápsula translúcida) con el cuidado de no romper la cápsula. Las células se sedimentaron a 250 x g, se resuspendieron en 5 ml de medio hipotónico especial para lisar los glóbulos rojos (Gieseler y col, 1991) y se incubó por 6 min. a temperatura ambiente. Enseguida se lavó tres veces con 10 ml de RPMI por sedimentación a 250 x g. Las células resuspendidas en 25 ml de RPMI/10% FCS (R-10) fueron sembradas a 2 ml/pozo en placa de 24 pozos. Al cabo de 6 días se resuspendieron las células no adherentes por suaves movimientos en círculos y se cambió la mitad del medio. Cultivos confluentes se obtuvieron al cabo de 7-10 días de cultivo. Para mantener cultivos por más de 10 días a éstos se les cambió el medio cada 4 días aproximadamente (1 ml por pozo). Los sueros fetales de bovinos que se utilizaron en el cultivo de estromas se seleccionaron según su capacidad para permitir el adecuado crecimiento de los estromas.

A partir de dos cultivos independientes de estromas de 15 días fue posible obtener dos tipos de subcultivos: uno con un tipo celular (B-1) y otro con dos tipos celulares (B-2). B-1 fue obtenido luego de tratamiento del estroma por 5 min con Colagenasa/Dispasa (0,5 mg/ml) seguido de 5 min. de tratamiento con tripsina /EDTA. B-2 fue obtenido luego de tratamiento del estroma por 5 min. con Tripsina/EDTA. Para subcultivar B-1 y B-2 se utilizaron las mismas enzimas.

## **2.2. Cultivo de células estromales de amígdala humana**

Las amígdalas fueron obtenidas de dos pacientes que sufrían de amigdalitis recurrentes del Hospital J.J. Aguirre de la Universidad de Chile con la colaboración de la Dra. Eva Pruzo. Durante este trabajo se obtuvo el cultivo de células adherentes. Las células adherentes las denominamos AMG1 (paciente 1, niña de 7 años de edad) y AMG2 (paciente 2: niño de 7 años de edad). Después de realizada la amigdalectomía las amígdalas intactas se lavaron por inmersión sucesiva en 50 ml de PBS estéril (2 veces), etanol 70% por 20 segundos (1 vez) y PBS estéril (3 veces). Luego de retirar el epitelio se cortaron trozos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> que se incubaron con 30 ml de una mezcla que contenía Colagenasa A 400 µg/ml y DNasa tipo I 100 µg/ml en R-10, con agitación suave a temperatura ambiente durante 60 min. Los trozos de tejido no digerido se dejaron sedimentar por 2 min. a 1 x g, se tomó el sobrenadante y se lavó 2 veces en 30 ml de R-10 por centrifugación a 250 x g por 10 min. Se recuperaron aproximadamente 8x10<sup>8</sup> células por par de amígdalas y se sembraron alrededor de 5x10<sup>6</sup> de células/cm<sup>2</sup> en 25 ml de RPMI/20% FCS (R-20). Se cambió la mitad del medio cada 7 días y al cabo de 20 días aproximadamente se obtuvo un cultivo confluyente. Al llegar a confluencia se eliminaron las células no adherentes tipo linfocitos presentes en el cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en R-10 por sucesivos pasajes y se subcultivaron luego de tratamiento con Tripsina/EDTA por 5 min.

## **3. OTRAS CELULAS**

La línea celular murina L(tk-) (deficiente en timidina quinasa) fue cultivada en DMEM suplementado de 10% de FCS. Las líneas celulares B linfoblastoides humanas (RAMOS y DAUDI) y la línea celular T leucémica humana (MOLT-4) fueron cultivadas en RPMI 1640 suplementado igualmente con 10% de suero fetal de bovino (R-10). Las líneas linfocitos fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC). Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC), obtenidas en el laboratorio (Roseblatt y col., 1991) fueron cultivadas en DMEM

suplementado con 20% FCS, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de suplemento para el crecimiento de células endoteliales (Sigma) y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de heparina (Sigma).

## **4. ANTICUERPOS**

### **4.1 Anticuerpos Monoclonales**

Los hibridomas 3C10, 543, MY904, THB-5 y F4/80 fueron obtenidos de la ATCC y cultivados según las especificaciones. Los hibridomas 14.8, KM201, MK-2.6 y PS/2.3 fueron donados por el Doctor Paul Kinkade. Una descripción más detallada de los anticuerpos monoclonales utilizados en este trabajo se encuentra en las Tablas II y III. En algunos casos se utilizaron los anticuerpos purificados, en líquido ascítico o en sobrenadante de cultivo.

#### **4.1.1. Anticuerpos de ratón dirigidos a moléculas humanas**

Algunos anticuerpos reconocen moléculas que pertenecen a diferentes grupos o linajes celulares: mieloide (CR1, CD14), linfoide (T: CD3, CD4, CD8 y B: CD20, CD21), superfamilia de las inmunoglobulinas (ICAM-1, VCAM-1, MHC I y MHC II), familia de las integrinas ( $\beta_1$ : CD49a,b,d,e y  $\beta_2$ : CD11a,b,c), endotelio (VAP-1 y Factor de von Willebrand), marcadores de células tipo dendríticas (FDC: KI-M4, R4/23 e IDC: X-12). Otros anticuerpos no están restringidos a grupos o linajes (LVAP-2, Vimentina, CD40, BB1 y CD45).

#### **4.1.2. Anticuerpos de rata dirigidos a moléculas de ratón**

Algunos anticuerpos reconocen moléculas que pertenecen a diferentes grupos o linajes celulares: linfoide (T y B: Receptor de "homing" a nódulos linfáticos periféricos; T: Thy-1, CD4, CD8, CD3 y B: B220), mieloide (F4/80), superfamilia de las inmunoglobulinas (ICAM-1, VCAM-1, MHC I y MHC II), familia de las integrinas ( $\beta_1$ : LPAM-1 y  $\beta_2$ : CD11b), marcadores de células tipo dendríticas (IDC: NLDC-145, 33D1 y FDC: 4C11). También se usó un anti-CD44 no restringido a grupo celular o linaje. Para controles de isotipos de anticuerpos desarrollados en ratón (20.8.4 y MKD6) se utilizó el anticuerpo MY904, que no reconoce a moléculas murinas (IgG2ak de ratón). Como control para anticuerpos desarrollados en rata se utilizó Ig obtenida de suero normal de rata por precipitación con sulfato de amonio.

**TABLA II**  
**ANTICUERPOS MONOCLONALES DIRIGIDOS A MOLECULAS**  
**HUMANAS**

ACPO	ESPECIFICIDAD	ISOTIPO	ADQUISICION	REFERENCIA
W6/32	HLA ABC	IgG2a ratón	Dra. Rosa Bono	Barnstable y col., 1978
LKT111	MHCII	IgM ratón	Dra. Rosa Bono	Bono y col., 1979
Mab.543	CR1	IgG1k ratón	A.T.C.C.	Schriever y col., 1989
3C10	CD14	IgG1 ratón	A.T.C.C.	VanVoorhis y col., 1983
OKT3	CD3	IgG2a ratón	Dra. Rosa Bono	Hoffman y col., 1980
OKT4	CD4	IgG2b ratón	Dra. Rosa Bono	Hoffman y col., 1980
OKT8	CD8	IgG2 ratón	Dra. Rosa Bono	Hoffman y col., 1980
IF-5	CD20	desconocido	Dr. Edward Clark	Clark y col., 1992
THB-5	CR2,CD21,	IgG2ak ratón	A.T.C.C.	Weiss y col., 1984
84.H10	ICAM-1	IgG1 ratón	Immunotech	Malegapuru y col., 1988
4B9	VCAM-1	IgG1 ratón	Dr. Harlan	Vonderheide y col., 1992
LIA1/2	BETA1, CD29	desconocido	Dr. Sánchez-Madrid	Arrollo y col., 1992
TS2/7	ALFA 1, CD49a	IgG1 ratón	Dr. Sánchez-Madrid	Hemler y col., 1984
TEA1/41	ALFA 2, CD49b	desconocido	Dr. Sánchez-Madrid	Sánchez-Madrid y col., 1986
HP2/1	ALFA 4, CD49d	IgG1 ratón	Dr. Sánchez-Madrid	Vonderheide y col., 1992
B1E5	ALFA 5, CD49e	IgG1 ratón	Dr. Damsky	Schriever y col., 1989
LIA 3/2	BETA2, CD18	desconocido	Dr. Sánchez-Madrid	Campanero y col., 1993
TS1/11	CD11a	desconocido	Dr. Sánchez-Madrid	Campanero y col., 1993
MY904	CD11b, CR3	IgG2ak ratón	A.T.C.C.	Dana et al., 1986
HC1/1	CD11c	desconocido	Dr. Sánchez-Madrid	Cabañas y col., 1993
1B2	VAP-1	IgG1 ratón	Dr. Marko Salmi	Salmi y col., 1993
202D3	von Willbrandt	IgG1 ratón	Dra. Rosa Bono	Avner y col., 1984
4G4	LVAP2	IgG1 ratón	Dr. Marko Salmi	Salmi et al., 1993
V-6630	Vimentina	IgG2aK ratón	Dr. Ricardo Maccioni	Capote, 1994
G28-5	CD40	IgG1 ratón	Dr. Edward Clark	Clark y col., 1992
BB1/B7	BB1/B7	IgG1 ratón	Dr. Edward Clark	Clark y col., 1992
PD7/26	CD45RB	IgG1 ratón	DAKOPATTS	Streuli y col., 1988
K1-M4	N.I.	IgG3 ratón	Dr. Parwadesh	Parwadesh y col., 1983
R4/23	N.I.	IgM ratón	Dr. Mason	Naiem y col., 1983
X-12	N.I.	IgG1 ratón	Immunotech	Immunotech

N.I.: no identificado

**TABLA III**  
**ANTICUERPOS MONOCLONALES DIRIGIDOS A MOLECULAS DE RATON**

ACPO	ESPECIFICIDAD	ISOTIPO	ADQUISICION	REFERENCIA
20.8.4	MHC I K <sup>b</sup> ,d,r,s	IgG2ak ratón	A.T.C.C.	Ozato & Sachs, 1981
MK-D6	MHC II, H-2 <sup>d</sup> I-A	IgG2ak ratón	A.T.C.C.	Kappler y col., 1981
MEL-14	Selectina-L	IgG2a rata	A.T.C.C.	Gallatin y col., 1983
J1J	Thy-1	IgM rata	Dr. Coutigho	Bruce y col., 1981
GK1.5	CD4	IgG2b rata	Dra. Rosa Bono	Dialynas y col., 1983
53.6.72	CD8	IgG2a rata	Dra. Rosa Bono	Ledbetter y col., 1979
2C11	CD3	IgG hamster	Dra. Rosa Bono	Leo y col., 1987
14.8	B220	IgG2b rata	Dr. Paul Kinkade	Kinkade y col., 1981
KM201	CD44, pgp	IgG1 rata	Dr. Paul Kinkade	Miyake y col., 1990
Yn-1/1.7.4	ICAM-1	IgG2b rata	Dra. Rosa Bono	Takei, 1985
M/K-2.6	VCAM-1	IgG1 rata	Dr. Paul Kinkade	Miyake y col., 1991
PS/2.3	ALFA 4	IgG2b rata	Dr. Paul Kinkade	Miyake y col., 1991
M1/70	CD11b	IgG2b rata	Dra. Rosa Bono	Springer, 1981
4C11	N.I.	IgG2b rata	Dra. M. Kosko	Kosko y col., 1992
NLDC-145	N.I.	IgG2a rata	Dr. M. Breeel	Kraal y col., 1986
33D1	N.I.	IgG2b rata	A.T.C.C.	Nussenzweig y col., 1982
F4/80	N.I.	IgG2b rata	A.T.C.C.	Austyn y col., 1981

N.I.: no identificado.

#### 4.2. Anticuerpos policlonales

Se utilizaron anticuerpos policlonales (TELIOS) producidos en conejo dirigidos a: colágenos I, III y IV humanos (donados por la Dra. Mireya Fernández), fibronectina (de rata y humanos) y laminina de rata (donados por el Dr. Enrique Brandan). Todos los anticuerpos se usaron a las concentraciones recomendadas.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos conjugados con FITC: Anti-Ig de ratón desarrollado en cabra F(ab')<sub>2</sub> (Immunotech), anti-Ig de conejo desarrollado en cabra F(ab')<sub>2</sub> (Cappel) y anti-Ig de ratón desarrollado en oveja (Biosys).

## 5. INMUNOFLUORESCENCIA

### 5.1 Citometría de flujo. Antígenos intracelulares y de superficie.

Líneas linfoides, MNC, AMG, HUVEC, B-1, B-2 y L(tk-)

*Antígenos de superficie:* En el caso de células adherentes, éstas se despegaron de la placa de cultivo por los métodos enzimáticos acostumbrados y se dejaron a temperatura ambiente por 1-6 horas en medio de cultivo con 10% FCS para recuperar la posible pérdida de las moléculas de superficie. Al utilizar verseno (PBS/EDTA 0,5 mM) como control para despegar las células AMG, no se encontró ninguna diferencia en la reacción de los anticuerpos (descritos en la Tabla II) dirigidos a MHC I, MHC II,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , CD11b,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ , VCAM-1, ICAM-1 y FDC. Además, al realizar el mismo tratamiento en la línea adherente murina híbrida F1-24 con el anticuerpo anti-ICAM-1 murino (Yn-1/1.7.4) se pudo observar la presencia de la molécula por citometría de flujo, indicando que la tripsina no interfiere con la reacción del anticuerpo (no mostrado). También, ha sido reportado que la expresión de las moléculas VLA, ICAM-1, HLA y LFA-3 no es alterada luego de tratamiento con tripsina (Dustin & Springer, 1988; Hemler y col., 1987 a y b).

Una muestra de  $0.4-1 \times 10^6$  células fueron lavadas por resuspensión en 1 ml de F-12/2% FCS (F-2) y centrifugación por 5 min. a 500 x g, fue incubada con 100  $\mu$ l del anticuerpo primario por 30 min. a 4°C. Los anticuerpos primarios presentes en líquido ascítico y los anticuerpos purificados se utilizaron luego de diluir a la concentración óptima en F-2 (titulación en el FACScan). Sobrenadantes de hibridomas se utilizaron sin diluir. Después de lavar una vez, las células fueron incubadas con 100  $\mu$ l del anticuerpo secundario (diluido en F-2) por 30 min. a 4°C. Luego de dos lavados con 1 ml de PBS/2% FCS (PBS-2), las células fueron resuspendidas a  $1 \times 10^6$ /ml en PBS-2 más yoduro de propidio ( $1 \mu$ g/ $1 \times 10^6$  células) y analizadas en un FACScan (Becton Dickinson, UK) usando el programa computacional Lysys II. Las células muertas fueron rechazadas mediante una puerta para FSC/FL3 y los desechos, plaquetas y/o glóbulos rojos con una puerta para FSC/SSC. En el FACScan la luz del láser que incide sobre cada célula y difractada entre  $<1$  y  $10^\circ$  (FSC) otorga una medida relativa del tamaño de cada una de las células, en cambio, la luz que es reflejada o refractada en ángulo recto otorga una medida de la granulosidad de cada una de las células (SSC). Los parámetros

FL1-H y FL3-H representan la intensidad relativa de la fluorescencia emitida en cada célula por el FITC y el yoduro de propidio respectivamente.

*Antígenos intracelulares:* En el caso de los antígenos intracelulares la inmunofluorescencia se realizó igual que para los antígenos de superficie, sólo que previamente las células se permeabilizaron de la siguiente forma: al sedimento celular, previamente lavado en medio F-12, se le agregó etanol 70% a 4°C (gota a gota en vortex), se dejó a 4°C por 30 min. y se lavó en medio F-12.

## **5.2. Inmunofluorescencia en células adheridas a cubreobjetos.**

### **Antígenos intracelulares y de superficie**

Las células adherentes cultivadas en cubreobjetos (12 mm de diámetro, previamente lavados con etanol 95% y flameados) se fijan de la siguiente manera: los cubreobjetos se transfieren a una cápsula limpia y se lavan con medio de cultivo sin suero, se aspira el medio y las células se fijan con metanol 100% a -20°C durante 20 minutos. Luego de fijar se aspira el metanol y se lava con medio sin suero. Para bloquear la posible unión inespecífica de los anticuerpos se incuba toda la noche en PBS con 1% de BSA.

La inmunofluorescencia se realizó sobre gotas de 100 µl en parafilm fijo al mesón. Con ayuda de una pinza fina se depositó cada cubreobjeto, con células adheridas, sobre la gota con el primer anticuerpo por 30 min. a temperatura ambiente. Luego de incubar 30 min. se tomó cada cubreobjeto con la pinza, se secó por el borde con toalla de papel, se lavó introduciendo cada cubreobjeto en un vaso con PBS/2% FCS, se secó nuevamente e incubó con el segundo anticuerpo conjugado con FITC por 30 min. Luego se secó y se lavó. La dilución de los anticuerpos se realizó en PBS con 2% FCS. Una vez realizada la inmunofluorescencia los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio disuelto en PBS a 125 ng/ml durante 2-4 minutos, se lavó en PBS y se montó sobre portaobjeto con una mezcla de glicerol 90% / 10% DABCO (pH 7,2). Los resultados fueron observados en un microscopio confocal Carl Zeiss. Todas las imágenes mostradas corresponden a la suma de la fluorescencia emitida por una serie de planos ópticos. Las imágenes procesadas de fluorescencia roja emitida por el yoduro de propidio y verde emitida por FITC se muestran superpuestas.

## 6. PURIFICACION DE LINFOCITOS

**6.1. Purificación de linfocitos T:** Las células mononucleares se obtuvieron de bazo de ratones Balb/c macho de 8-12 semanas de edad. Luego de liberar las células del bazo por perfusión con 10 ml de PBS, las células mononucleares (MNC) se separaron en un gradiente discontinuo (10 ml PBS /4 ml de Ficoll  $d=1.083$ ) por centrifugación a  $450 \times g$ , durante 20 min. a  $20^{\circ}\text{C}$ . Las MNC se recuperaron de la interface PBS/Ficoll y se lavaron tres veces con 10 ml de RPMI. Uno a treinticinco millones de células se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de RPMI/2% FCS (R-2). Los linfocitos B se eliminaron utilizando perlas magnéticas cubiertas con un anticuerpo dirigido a Ig de ratón desarrollado en oveja (SAM). Se utilizó la relación de 1 perla magnética por célula mononuclear. Primero las perlas se lavaron 2 veces por resuspensión en 1 ml de medio sin suero durante 2 min. Para sedimentar las perlas se usó un imán durante 2 min. Las células MNC resuspendidas en 100  $\mu\text{l}$  de R-2 se agregaron al tubo que contenía las perlas lavadas y sedimentadas y se incubó a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 min. con suave agitación. Luego se recuperaron las células que no unieron perlas por tres lavados consecutivos que se realizaron de la siguiente forma: se agregó 3 ml de R-2, se mezcló por inversión, se sedimentó en imán por 2 min. y se recuperó el sobrenadante. El análisis demostró una población de linfocitos T con un 85% de pureza (ver resultados).

**6.2. Purificación de linfocitos B:** Luego de obtener células mononucleares (ver 6.1.) se eliminaron los linfocitos T mediante lisis por complemento de células Thy-1<sup>+</sup> (reconocidas por el anticuerpo anti-Thy-1, J1J). Para la preparación del complemento se obtuvo sangre de conejo del Instituto de Salud Pública de la que se separó el suero a  $4^{\circ}\text{C}$ . El suero se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  en pequeñas alícuotas (antes de usar se tituló a la dilución óptima mínima, aproximadamente 1/20-1/40).

Se utilizó el sobrenadante del hibridoma J1J en una relación de  $100\mu\text{l}/4 \times 10^6$  células mononucleares y se incubó con agitación suave por 30 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ , luego se lavó con 10 ml de medio R-2 y se incubó en R-10 con suero de conejo durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Las células se lavaron tres veces con

10 ml de medio R-10. El análisis demostró una población de linfocitos B con un 85% de pureza (ver resultados).

## 7. MARCAJE RADIOACTIVO DE CELULAS

Uno a veinte millones de MNC, linfocitos y líneas linfoides (crecidas a una densidad de  $0,8-1,4 \times 10^6$ /ml) fueron marcadas con 150-350  $\mu$ Ci/ml de cromato de sodio- $^{51}\text{Cr}$  diluído en RPMI / 2% FCS / Hepes 10 mM en un volumen final de 100  $\mu$ l durante 1 hora a 37°C. Enseguida se realizaron tres lavados a temperatura ambiente con 12 ml de R-2, mediante centrifugación a 250 x g por 5 min. Para marcación con timidina tritiada ( $^3\text{H}$ -TdR) se incubó 1-2 mCi /  $0,4 \times 10^6$  de células / ml durante toda la noche en el incubador con 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C.

El número de c.p.m.totales para MNC, linfocitos y RAMOS marcadas con  $^{51}\text{Cr}$  fue de 10.000-40.000, y para DAUDI y MOLT-4 de 50.000-250.000. Las líneas RAMOS y DAUDI se marcaron con  $^3\text{H}$ -TdR a un nivel de 100.000-250.000 c.p.m.

## 8. PROTOCOLO DE ADHESION

Los ensayos de adhesión se realizaron en placas de cultivo de 24 pozos conteniendo el sustrato apropiado (estromas completos, células estromales purificadas, la línea celular L(tk<sup>-</sup>) o fibronectina). Para eliminar el suero de cultivo y bloquear la posible unión inespecífica de los anticuerpos, antes de cada ensayo de adhesión, el sustrato fue lavado e incubado por 1 hora a 37°C en RPMI con 1% de BSA. Cuando el sustrato fue fibronectina plasmática humana o de bovino, ésta se aplicó a la placa a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  disuelta en PBS. Los pozos con fibronectina fueron incubados durante 3 horas a 37°C, luego de lo cual se lavaron e incubaron toda la noche en PBS/1% BSA.

Las células linfoides radiomarcadas se agregaron a una concentración de  $2-3 \times 10^5$  células / pozo en 0,5 ml de medio de adhesión (RPMI-1% de BSA

tamponado con 10 mM Hepes) y fueron incubadas durante 30 min. a 37°C sobre cada sustrato. Las células linfoides no adherentes fueron retiradas previa agitación suave y circular por 5 veces con una pipeta de 5 ml y los pozos fueron lavados de la misma forma 2 veces más. Los pozos que contenían las células adherentes se secaron a temperatura ambiente y las células se lisaron con 500 µl de una mezcla de 0,1% SDS / 0,1 M NaOH. Luego se contó la radioactividad del lisado. Todos los experimentos de adhesión se realizaron en triplicado.

Con el fin de desprejar de las mediciones de radioactividad la liberación espontánea de  $^{51}\text{Cr}$ . Una alícuota de las células marcadas se incubó en un tubo en las mismas condiciones del ensayo de adhesión. Luego de sedimentar en una centrífuga Eppendorf a 600 x g por 5 min., se aspiró el sobrenadante y las células se lisaron con 0,5 ml de la solución de lisis. Esta medida también se realizó en triplicado.

La emisión de radioactividad de los lisados se contó en un contador de centelleo líquido. Como líquido de centelleo se utilizó Arcotol (9 partes de "scintillation" : 3 partes de "Arcopal"). "Scintillation" se preparó con 50 mg POPOP / 4 g PPO / lt tolueno y se agitó toda la noche antes de mezclar con "Arcopal".

El porcentaje de adhesión se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de adhesión} = \frac{\text{c.p.m. promedio/pozo} \times 100}{\text{c.p.m. promedio/total}}$$

**c.p.m. promedio/pozo:** promedio de triplicado de cuentas radioactivas que quedan al final del ensayo menos la liberación espontánea.

**c.p.m. promedio/total:** promedio de triplicado de cuentas radioactivas totales que quedan al final del ensayo menos la liberación espontánea.

Para calcular las c.p.m. promedio se aceptó valores con una desviación estándar no mayor al 20% del valor promedio. En general, esta variación fluctuó alrededor de un 10%.

## **9. EFECTO DE ANTICUERPOS EN LA ADHESION**

Para investigar la contribución de diferentes moléculas a la adhesión se utilizó una batería de anticuerpos monoclonales dirigidos a distintos receptores de adhesión. Todos los anticuerpos fueron seleccionados en base a su capacidad bloqueadora de la adhesión en otros sistemas (referencias en tablas II y III).

### **9.1 Efecto en células linfoides**

Para estudiar la contribución de moléculas presentes en las células linfoides, las células marcadas se preincubaron con distintos anticuerpos a 4°C durante 30 min. y se lavaron 1 vez por centrifugación con 5 ml de medio de adhesión. Líquido ascítico, sobrenadante de hibridomas y anticuerpos purificados se usaron a la concentración óptima determinada por citometría de flujo.

### **9.2 Efecto en células estromales**

Para estudiar el rol de contrareceptores de adhesión presentes en los estromas se agregaron los anticuerpos correspondientes directamente sobre los estromas antes de agregar las células linfoides, se incubó durante una hora a 37°C y se lavó una vez con 500 µl de medio de adhesión. Cada pozo se preincubó con un volumen de 300 µl del anticuerpo a la concentración óptima determinada por citometría de flujo.

## **10. EFECTO DE ACTIVADORES POLICLONALES EN LA ADHESION**

### **10.1 Concanavalina A (Con A) y Lipopolisacárido (LPS)**

La concentración óptima de mitógenos se determinó por titulación en un ensayo de incorporación de  $^3\text{[H]}$  TdR durante las últimas 12 horas de tratamiento por 72 horas. Las concentraciones de ConA óptimas fueron de 2,5-5 µg/ml y de LPS de 20 µg/ml. Para los ensayos de adhesión la activación se realizó en placas de cultivo de 100 mm de diámetro con  $2 \times 10^6$  MNC/ml de

R-10. Poblaciones purificadas de linfocitos T o B se prepararon luego del tratamiento con estos mitógenos.

### **10.2. Ester de forbol, PMA**

Con el fin de detectar cambios adhesivos de los linfocitos T y B como resultado de su activación, se incubaron poblaciones purificadas de linfocitos T o B con el éster de forbol PMA. La concentración mínima óptima de 100 nM de PMA se determinó luego de incubar MNC 14 horas con distintas concentraciones de PMA en R-10. Se seleccionó la concentración según la inducción en los linfocitos B de la expresión de MHC II (no mostrado).

# RESULTADOS

## 1. CARACTERIZACION DE CELULAS DE BAZO

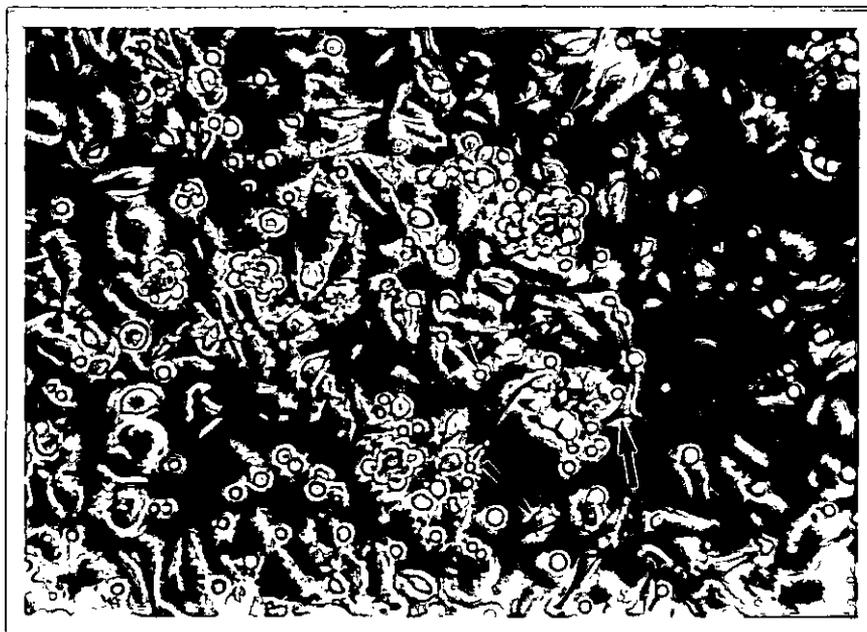
### 1.1. Células estromales de bazo de ratón

En los cultivos primarios confluentes de bazo de ratón se encontraron algunos de los siguientes tipos de células estromales: mediante tinción esterasa no específica se ha determinado la presencia de células circulares tipo monocito/macrófagos, por presentar una fuerte tinción y otras células de variada morfología con una tinción débil o negativa. En la figura 1 se muestran al menos tres tipos morfológicamente diferentes de células estromales (circulares, estrelladas y fusiformes) y agregados celulares tipo linfóide. Por inmunofluorescencia directa se ha determinado la presencia de células Ig<sup>+</sup> adheridas al estroma (no mostrado). Se logró separar algunos de los tipos celulares de los cultivos primarios mediante tratamiento enzimático, estas células se cultivaron y se analizaron por citometría de flujo utilizando una batería de anticuerpos monoclonales dirigidos a moléculas de adhesión y marcadores de diferentes tipos celulares. A partir de dos cultivos primarios independientes hemos obtenido dos poblaciones celulares: B-1 y B-2. Las figuras 1-3 muestran microfotografías ópticas de los distintos estromas en cultivo.

**B-1** es una población celular morfológicamente homogénea de células grandes con núcleo oval y tinción esterasa no específica negativa. Estas células tienen un tiempo de duplicación de 24 horas aproximadamente y se han podido mantener en cultivo hasta 18 pasajes (resultados no mostrados). En la figura 2 se observa una fotografía tomada en el microscopio óptico.

**B-2:** En este subcultivo se observan dos tipos celulares; células extendidas con núcleo oval, con tinción esterasa no específica negativa y células más esféricas con tinción positiva débil (resultado no mostrado). Como se muestra en la figura 3 existe una asociación entre estas células. Las células esféricas

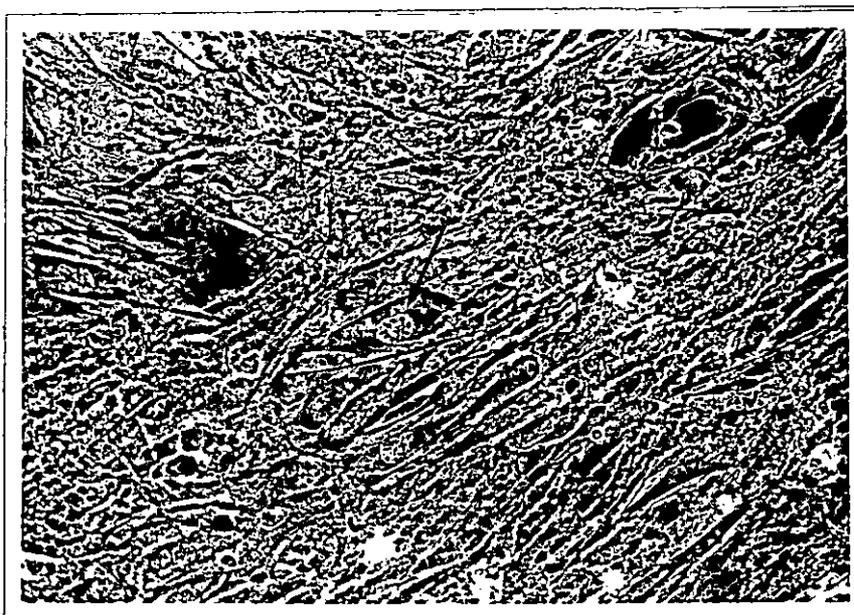
se encuentran en general sobre las otras. Durante el cultivo se observó que algunas de las células esféricas se asocian a la placa de cultivo de tal forma que, no es posible sacarlas de la placa de cultivo con tripsina, y solamente crecen y se subcultivan las células que se encuentran asociadas a las células extendidas. Estas células tienen un tiempo de duplicación de 36 horas aproximadamente y se han podido mantener en cultivo hasta 23 pasajes. Diferencias de tamaño de los dos tipos celulares determinadas por dispersión de la luz en el citómetro de flujo no son obvias (no mostrado).



**Figura 1. Fotomicrografía óptica de estroma primario de bazo.**

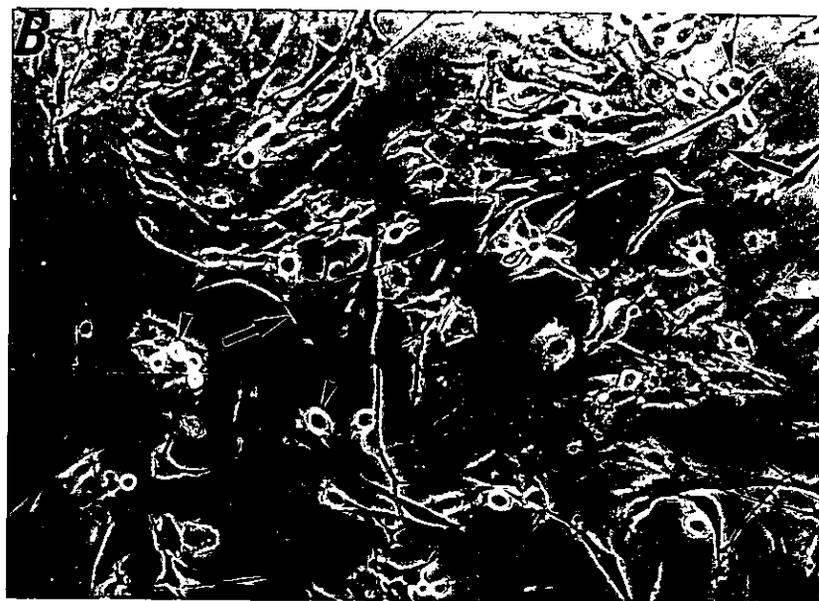
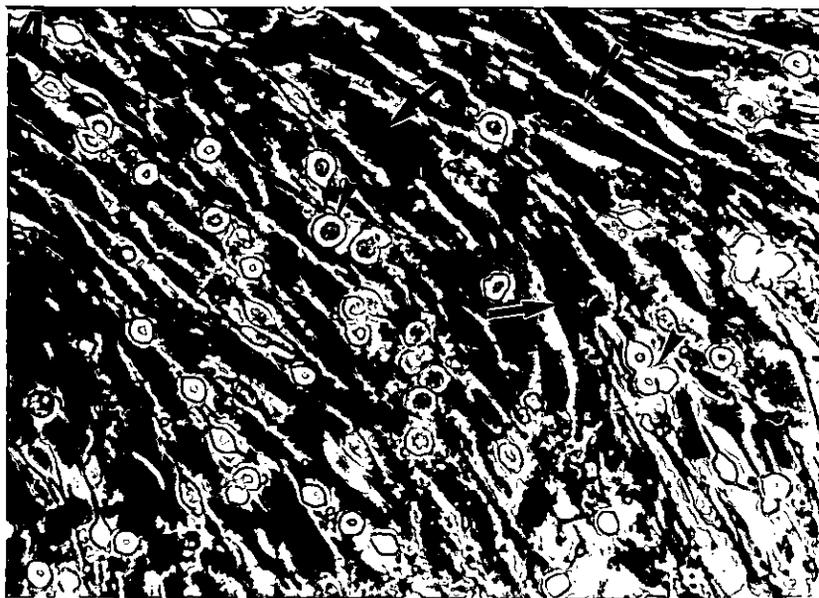
Estroma primario de bazo cultivado durante 10 días. Para tomar la fotografía se lavó con el objeto de eliminar las células no adherentes. Se puede observar al menos tres tipos morfológicamente distintos de células estromales y otras células adherentes:

\*: circulares, que son tinción esterasa no específica fuertemente positiva (no mostrado); flechas: células estrelladas (esterasa no específica débil o negativa, no mostrado) y +: células fusiformes (esterasa no específica negativa, no mostrado). Células esféricas presentes en racimos (a) debilmente adheridas podrían corresponder a linfocitos. Otras células esféricas más pequeñas pueden corresponder a glóbulos rojos o linfocitos (puntas de flechas). 1 cm = 67  $\mu$ m.



**FIGURA 2. Fotomicrografía óptica de células de B-1**

Fotomicrografía tomada en el microscopio óptico invertido, de un cultivo del estroma B-1 en pasaje 7. Se observa un cultivo homogéneo y confluyente de células con núcleo oval y nucléolos (flecha). Estas células tienen tinción de esterasa no específica negativa (no mostrado). 1 cm = 67  $\mu$ m.



### FIGURA 3. Fotomicrografías ópticas de células de B-2

A: Fotomicrografía tomada en el microscopio óptico invertido de un cultivo confluyente de B-2 en pasaje 10. Se observa la presencia de dos tipos celulares. 1 cm = 33  $\mu$ m.

B: Fotomicrografía tomada en el microscopio óptico invertido de un cultivo subconfluyente de B-2 en pasaje 20. Se observa, como en A, la presencia de dos tipos celulares. 1 cm = 67  $\mu$ m.

**flechas:** células extendidas presentan un núcleo oval con nucléolos (tinción de esterasa no específica negativa).

**puntas de flechas:** sobre las células extendidas se observan células más esféricas con prolongaciones finas (tinción esterasa no específica positiva débil).

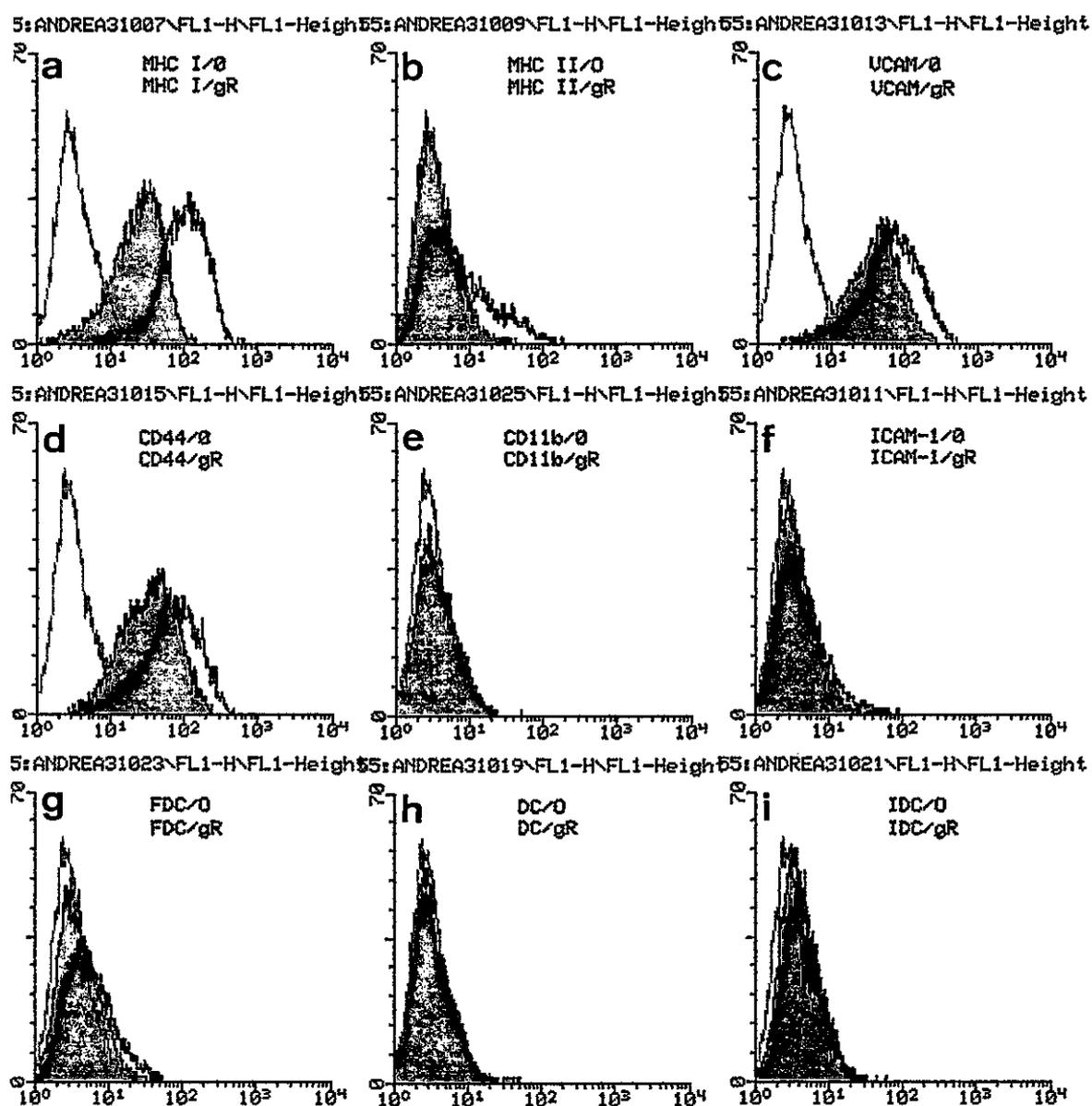
## **1.2. Análisis de antígenos de superficie de células de bazo por citometría de flujo**

**B-1** En la figura 4 se muestra un resumen del análisis de las moléculas de superficie realizado por citometría de flujo en las células de B-1. Estas células expresan de forma constitutiva las moléculas de adhesión VCAM-1 y CD44 (en c y d). Luego de tratar las células con IFN- $\gamma$  se indujo la expresión de antígenos de clase II (MHC II) y se obtuvo un aumento en la expresión de VCAM-1 y CD44. Los histogramas e-i de la figura 6 muestran la ausencia de otros marcadores o moléculas presentes tanto en células dendríticas foliculares (4C11, CD11b), macrófagos (CD11b, y F4/80 mostrado en Tabla II) como en células dendríticas interdigitantes (33D1 y NLDC-145). La molécula de adhesión ICAM-1 descrita en células endoteliales y en células presentadoras de antígenos, como son las células dendríticas del tipo folicular o interdigitante y los macrófagos, no fue detectada.

**B-2** En la figura 5 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de citometría de flujo realizado en las células de B-2. En los histogramas c y d se muestra la presencia de las moléculas VCAM-1 y CD44 en un 100 % de las células. En los histogramas de la figura 6a y e se observa la presencia de células positivas y negativas para unir Ig normal de rata y para la expresión de la molécula CD11b respectivamente. La reacción con Ig normal de rata indicaría que una parte de las células presenta receptores para la porción Fc de inmunoglobulina. Es de notar que la intensidad de fluorescencia para las células CD11b<sup>+</sup> es significativamente superior a la de las células reactivas con Ig normal de rata (abcisa en los histogramas) y con otros anticuerpos del mismo isotipo (Yn-1/1.7.4, F4/80, 4C11 y 33D1), como se muestra en la figura 6. En dos experimentos (no se muestran) fue posible detectar células reactivas con Ig normal de rata en un porcentaje superior a las células CD11b<sup>+</sup> (41% vs 27 % y 65% vs 41%) sugiriendo la existencia de células CD11b<sup>-</sup> con capacidad de unir Ig normal de rata. En la figura 6b se observa la inducción de MHC II, por IFN- $\gamma$ , en parte de las células. Lo anterior se verificó utilizando como control de isotipo el anticuerpo MY904 (ver Tabla III). La intensidad de fluorescencia presente en células reactivas con los

anticuerpos dirigidos a marcadores de células dendríticas (33D1 y NLDC-145), a la molécula ICAM-1 (Yn-1/1.7.4) y a la cadena  $\alpha_4$  (PS/2.3), fue inferior o del mismo orden de la reacción con Ig normal de rata, por lo que la unión de estos anticuerpos podría ser inespecífica y mediada por su región Fc. Cuando se realizó la inmunofluorescencia directamente con un anticuerpo secundario completo (SAM/FITC) se detectó un aumento en la intensidad de fluorescencia en las células tratadas con IFN- $\gamma$  respecto de las no tratadas, reflejando la inducción de receptores Fc (Tabla IV).

En la figura 6 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de citometría de flujo realizado en las células L(tk<sup>-</sup>) utilizadas como control en los ensayos de adhesión. Se observa que estas células no expresan ninguna de las moléculas detectadas en las células B-1 y B-2. De acuerdo a lo conocido, las células L (tk<sup>-</sup>) aparecen negativas en la inducción por IFN- $\gamma$  de antígenos de clase II y tampoco fueron inducidas a expresar ICAM-1 y VCAM-1.



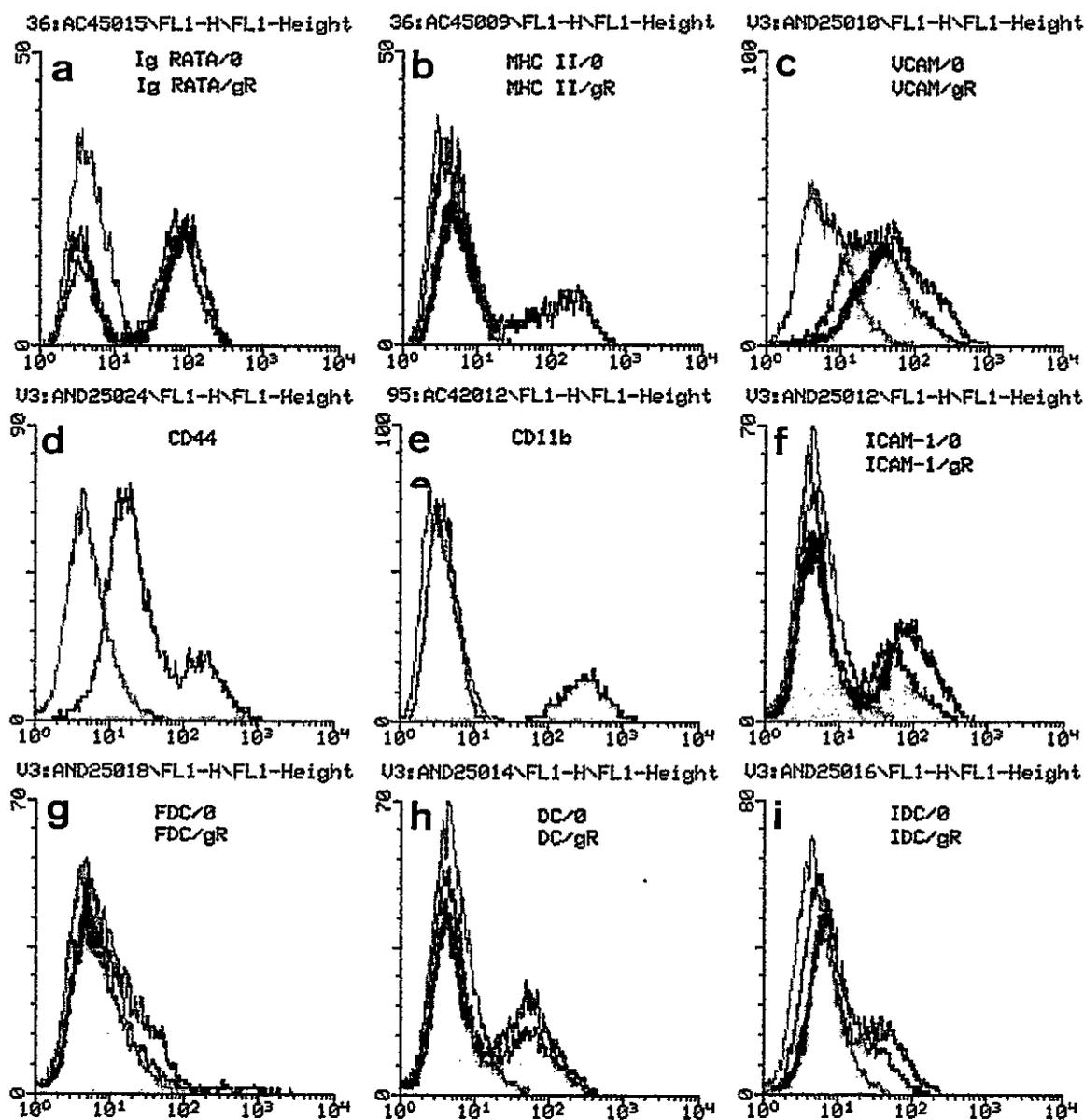
### FIGURA 4. Análisis de inmunofluorescencia por citometría de flujo de B-1

Histogramas obtenidos por citometría de flujo. Se grafica intensidad de fluorescencia versus número de células. Los anticuerpos primarios fueron: Ig normal de rata (a), MK-D6 (b), M/K-2.6 (c), KM201 (d), M1/70 (e), Yn-1/1.7.4 (f), 4 C11 (g), 33D1 (h) y NLDC-145 (i).

**Gráfica gris:** Las células control tratadas sólo con el reactivo secundario: el anticuerpo MARK-1 desarrollado en ratón, anti-Ig de rata conjugado con FITC (a, c, d, e, f, g, h, i) o con el fragmento de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> desarrollado en cabra, anti-Ig de ratón conjugado con FITC (b).

**Gráfica roja:** Las células fueron incubadas con un primer anticuerpo seguido por el segundo anticuerpo MARK-1/FITC (a, c, d, e, f, g, h, i) o con el fragmento de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> desarrollado en cabra, anti-Ig de ratón conjugado con FITC (b).

**Gráfica verde:** Las células fueron tratadas con interferón gamma de rata (100 U/ml) por 72 horas, e incubadas con un primer anticuerpo seguido por el segundo anticuerpo MARK-1/FITC (a, c, d, e, f, g, h, i) o con el fragmento de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> desarrollado en cabra anti-Ig de ratón conjugado con FITC (b).



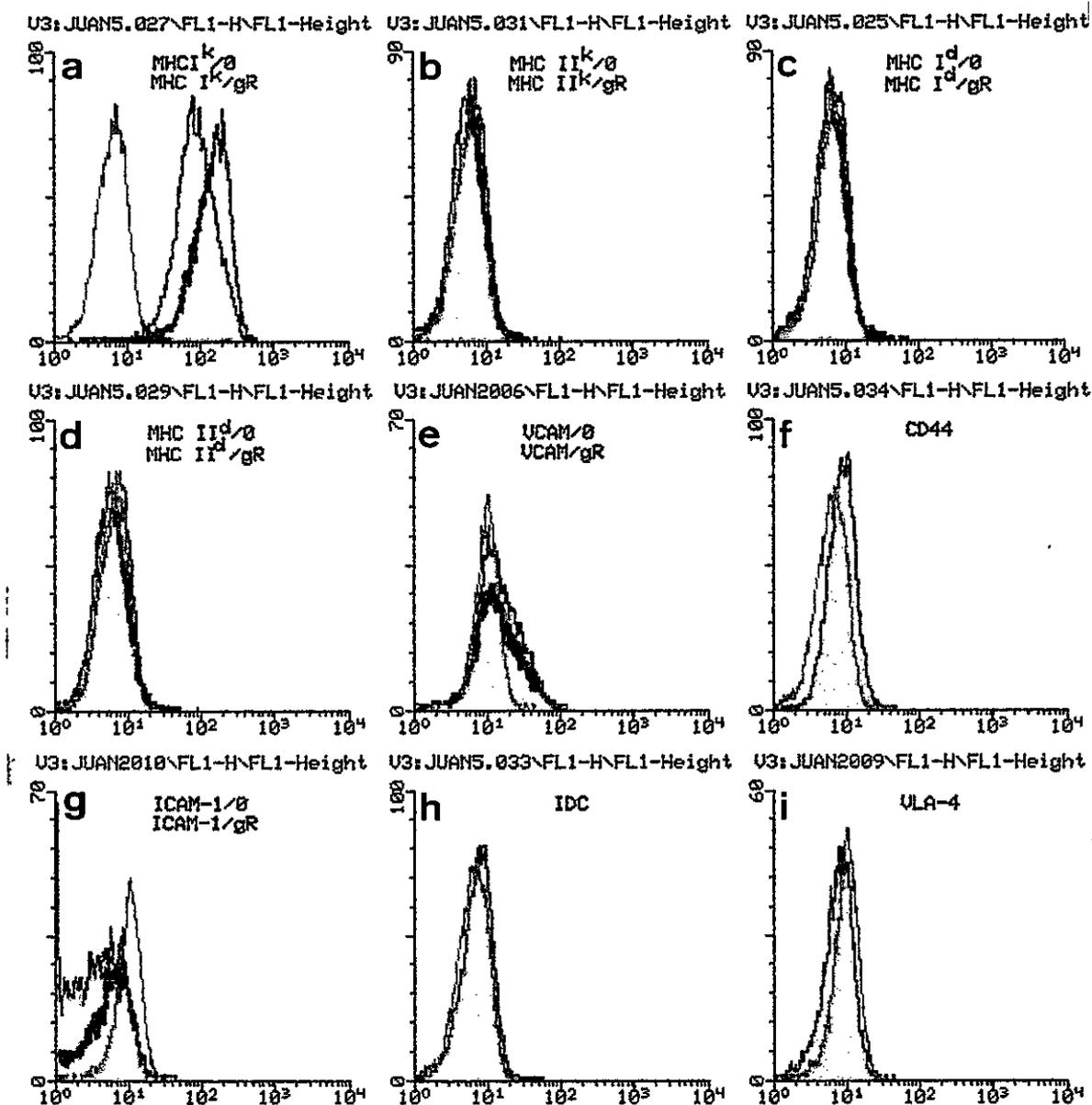
### FIGURA 5. Análisis de inmunofluorescencia por citometría de flujo de B-2

Histogramas obtenidos por citometría de flujo. Se grafica intensidad de fluorescencia versus número de células. Los anticuerpos primarios fueron: 20.8.4 (a), MK-D6 (b), M/K-2.6 (c), KM201 (d), M1/70 (e), Yn-1/1.7.4 (f), 4 C11 (g), 33D1 (h) y NLDC-145 (i).

**Gráfica gris:** Las células control tratadas sólo con el reactivo secundario: el anticuerpo MARK-1 desarrollado en ratón, anti-Ig de rata conjugado con FITC (c, d, e, f, g, h, e i) o con el fragmento de anticuerpo  $F(ab')_2$  desarrollado en cabra, anti-Ig de ratón conjugado con FITC (a y b).

**Gráfica roja:** Las células fueron incubadas con un primer anticuerpo seguido por el segundo anticuerpo MARK-1/FITC (c, d, e, f, g, h, e i) o con el fragmento de anticuerpo  $F(ab')_2$  desarrollado en cabra, anti-Ig de ratón conjugado con FITC (a y b).

**Gráfica verde:** Las células fueron tratadas con interferon gamma de rata (100 U/ml) por 72 horas e incubadas con un primer anticuerpo seguido por el segundo anticuerpo MARK-1/FITC (c, d, e, f, g, h, e i) o con el fragmento de anticuerpo  $F(ab')_2$  desarrollado en cabra anti-Ig de ratón conjugado con FITC (a y b).



**FIGURA 6. Análisis de inmunofluorescencia por citometría de flujo de la línea celular L(tk<sup>-</sup>)**

Histogramas obtenidos por citometría de flujo. Se grafica intensidad de fluorescencia versus número de células. Los anticuerpos primarios fueron: 11.4.4 (a), H39.64.5 (b), 20.8.4 (c), MK-D6 (d), M/K-2.6 (e), KM201 (f), M1/70 (g), Yn-1/1.7.4 (h) y NLDC-145 (i).

**Gráfica gris:** Las células control tratadas sólo con el reactivo secundario: el anticuerpo MARK-1 desarrollado en ratón, anti-Ig de rata conjugado con FITC (e, f, g, h, e i) o con el fragmento de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> desarrollado en cabra, anti-Ig de ratón conjugado con FITC (a, b, c y d).

**Gráfica roja:** Las células sin tratar con interferón gamma de rata (100 U/ml) por 72 horas, fueron incubadas con un primer anticuerpo seguido por el segundo anticuerpo MARK-1/FITC (e, f, g, h, e i) o con el fragmento de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> desarrollado en cabra, anti-Ig de ratón conjugado con FITC (a, b, c y d).

**Gráfica verde:** Las células fueron tratadas con interferón gamma de rata (100 U/ml) por 72 horas e incubadas con un primer anticuerpo seguido por el segundo anticuerpo MARK-1/FITC (e y g) o con el fragmento de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> desarrollado en cabra anti-Ig de ratón conjugado con FITC (a, b, c y d).

En la Tabla IV se muestran los porcentajes de células positivas detectados en células de bazo. Se observa que los resultados con células mononucleares concuerdan con lo establecido en la literatura, excepto que el porcentaje de linfocitos B (Ig<sup>+</sup>) nunca superó el 50% probablemente debido a que existen isotipos distintos a IgM e IgG no reconocidos por los dos anticuerpos secundarios utilizados.

**TABLA IV**  
**MOLECULAS DETECTADAS EN CELULAS DE BAZO DE RATON**

ANTICUERPO	ESPECIFICIDAD	ISOTIPO	MNC DE BAZO	B-1 P:10-16	B-2 P:3-22
MARK-1/FITC	Ig rata	IgG1 ratón	-	-	-
SAM/FITC	IgG, IgM ratón	/	++ 30-45%	-	-(si 18%)
GAM/FITC F(ab') <sub>2</sub>	Ig G ( H+L ) ratón	/	++ 35-50%	-	-
20.8.4	MHC I K <sup>b,d,r,s</sup>	IgG2ak ratón	++	+(si)	+(si)
MK-D6	MHC II, H-2 <sup>dI-A</sup>	IgG2ak ratón	+ 31-%	-(si 22%)	-(si 39-71%)
MEL- 14	anti-Selectina-L	IgG2a rata	+	-	N.D.
J1J	Thy-1	IgM rata	+ 21- 40%	N.D.	N.D.
GK1.5	CD4	IgG2b rata	+ 17- 24%	-(no)	+19-46%
53.6.72	CD8	IgG2a rata	+ 10-20%	N.D.	-(no)
2C11	CD3	IgG hamster	+ 32	N.D.	N.D.
14.8	B220	IgG2b rata	+40%;++33%	N.D.	+ 20-38%
KM201	CD44,pgp	IgG1 rata	+	+(si)	+
Yn-1/1.7.4	ICAM-1	IgG2b rata	+	-(no)	+10-43%
M/K-2.6	VCAM-1	IgG1 rata	+ 2-10%	+(si)	+(si)
PS/2.3	LPAM-1, ALFA 4	IgG2b rata	+	-(no)	+ 14-31%
M1/70	CD11b	IgG2b rata	++ 8%	N.D.	++ 27-45%
FDC-M1 o 4C11	N.I.	IgG2b rata	+1-3%	-(no)	+ 0-23%(no)
NLDC-145	N.I.	IgG2a rata	-	-(no)	+ 0-23%(no)
33D1	N.I.	IgG2b rata	+ N.D.-3%	-(no)	+ 21-24%(no)
F4/80	N.I.	IgG2b rata	+ 5-10%	-(no)	+ 23%(no)
Ig rata normal	Ig	/	+ 15%	-(no)	+ 30-65%(no)
MY904	CR3humano	IgG2aK ratón	N.D.	N.D.	-(no)

N.I.: no identificado

N.D.: no determinado

( ) : resultado luego del tratamiento con 200 U/ml de IFN- $\gamma$  por 72 horas

+,si: positivo , en caso de no ser en un 100%de las células se especifica el porcentaje

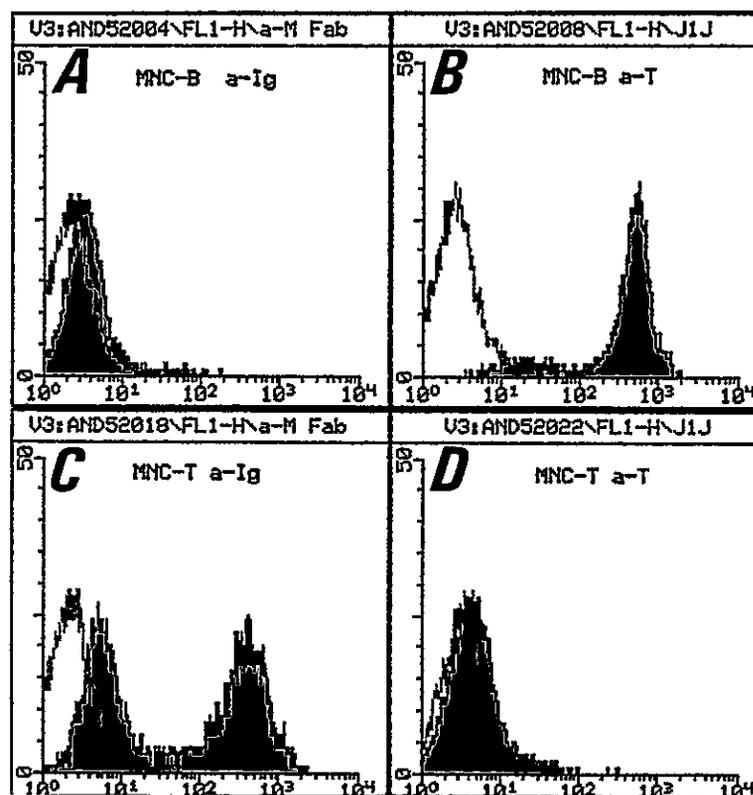
++, : fuertemente positivo , en caso de no ser en un 100%de las células se especifica el porcentaje

-,no: negativo

### 1.3. Purificación de linfocitos a partir de células mononucleadas de bazo de ratón

Para obtener poblaciones purificadas ya sea de linfocitos B o T y poder estudiar así su adhesión a las células estromales de bazo (estromas primarios, B-1 y B-2), se desarrolló un protocolo de purificación a partir de células

mononucleares (MNC). Para purificar las células B se eliminaron los linfocitos T mediante lisis por complemento luego de incubar a las MNC con el anticuerpo pan-T J1J. La purificación de los linfocitos T se realizó por eliminación de los linfocitos B utilizando perlas magnéticas acopladas a un anti-Ig de ratón (ver Materiales y Métodos). Para evaluar la efectividad de los métodos de purificación de ambos tipos de linfocitos, en la figura 7 se muestra los resultados del siguiente experimento: a partir de células mononucleares obtenidas de un bazo se trató parte de las células para eliminar a los linfocitos T y otra parte para eliminar a los B. Luego de la purificación, se realizó una inmunofluorescencia utilizando como anticuerpos primarios un anticuerpo anti-Ig de ratón o el anticuerpo pan-T J1J. En la figura 7, se muestran los histogramas obtenidos en el FACScan y se observa que, luego de realizar el protocolo de eliminación de los linfocitos B se logró eliminar casi totalmente a las células Ig<sup>+</sup> (Figura 7A). En la figura 7B se observa el histograma de las mismas células luego de inmunofluorescencia con el anticuerpo primario J1J, y se observa el grado de purificación de los linfocitos T obtenido. El tratamiento para la eliminación de los linfocitos T también fue efectivo puesto que luego de la inmunofluorescencia con el anticuerpo J1J (figura 7D) no se observa prácticamente reacción positiva. El análisis de las células con el software Lysys II demostró que con el método para eliminar a los linfocitos B o T se obtiene un 80-85% de linfocitos T o B respectivamente. El 15 % aproximado de células restante corresponde a monocitos (reconocidos con el anticuerpo M1/70). Se determinó que un 52% de células B es reconocido con el anticuerpo anti-Ig de ratón utilizado (figura 8C y no mostrado). Al usar otro anticuerpo, anti-Ig de ratón hecho en oveja, el porcentaje de células positivas obtenido no cambió (no mostrado). Sin embargo, el 85% aproximado de las células fueron reconocidas por el anticuerpo pan-B (14.8) y pudieron ser eliminadas con las perlas magnéticas acopladas a un anti-Ig de ratón (no mostrado y figura 8B) reflejando que los anticuerpos anti-Ig de ratón utilizados para la inmunofluorescencia no reconocen todos los isotipos de Ig. El suero de conejo se usó a la dilución óptima no tóxica para las células. Podemos concluir que, con los protocolos de eliminación es posible obtener poblaciones ricas en aproximadamente un 85 % de linfocitos B o T. La viabilidad varió entre un 88 y un 95%.



**FIGURA 7 ANALISIS POR CITOMETRIA DE FLUJO LUEGO DE PURIFICACION DE LINFOCITOS T O B**

Células mononucleares obtenidas de bazo de ratón fueron sometidas a los protocolos de purificación de linfocitos T o B (Materiales y Métodos)

**A y B:** Células mononucleares tratadas para eliminación de linfocitos B (MNC-B) seguido de inmunofluorescencia directa con un anticuerpo anti-Ig de ratón ( $\alpha$ -Ig) en A o inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo J1J ( $\alpha$ -T) en B. Brevemente:  $10 \times 10^6$  de células mononucleares fueron preincubadas con  $10 \times 10^6$  de perlas magnéticas acopladas a un anti-Ig de ratón durante 30 min. a  $4^\circ\text{C}$ . Las células  $\text{Ig}^+$  que unieron a las perlas se eliminaron con un imán, recuperándose  $4 \times 10^6$  células aproximadamente con las que se realizó la inmunofluorescencia para evaluación de pureza.

**C y D:** Células mononucleares tratadas para eliminación de linfocitos T (MNC-T) seguido de inmunofluorescencia directa con un anticuerpo anti-Ig de ratón ( $\alpha$ -Ig) en C, o indirecta con el anticuerpo J1J ( $\alpha$ -T) en D. Brevemente  $10 \times 10^6$  de células mononucleares fueron preincubadas con 250 ml de sobrenadante de cultivo del hibridoma J1J durante 30 min. a  $4^\circ\text{C}$ , luego de lo cual se trató durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ , con 250 ml de una dilución 1/40 de suero de conejo. Luego de tres lavados se recuperaron aproximadamente  $6 \times 10^6$  de células.

En las figuras 7A y 7C se muestran dos histogramas superpuestos; histogramas delineados en gris equivalen a células no tratadas con anticuerpo (autofluorescencia). Histogramas en rojo son células tratadas con GAM/FITC F(ab')<sub>2</sub>.

En las figuras 7B y 7D los histogramas delineados en gris equivalen a células control tratadas sólo con el segundo anticuerpo anti-Ig de rata conjugado con FITC (MARK-1/FITC), y en rojo se superpone el histograma de células tratadas con el anticuerpo J1J seguido del anticuerpo MARK-1/FITC.

## **2. ADHESION CELULAR EN BAZO**

Se realizaron ensayos de adhesión con linfocitos de ratón (sistema homólogo) y con líneas linfoides humanas (sistema heterólogo). Para estos ensayos se utilizaron estromas de bazo confluentes; los estromas primarios o completos (B-C) y los subcultivos de éstos (B-1 y B-2). Estromas B-C de 7-11 días en cultivo fueron utilizados en los ensayos de adhesión. Un mayor tiempo en cultivo no se utilizó puesto que la variabilidad entre los estromas en cada pozo de la placa aumentó.

### **2.1. Sistema homólogo**

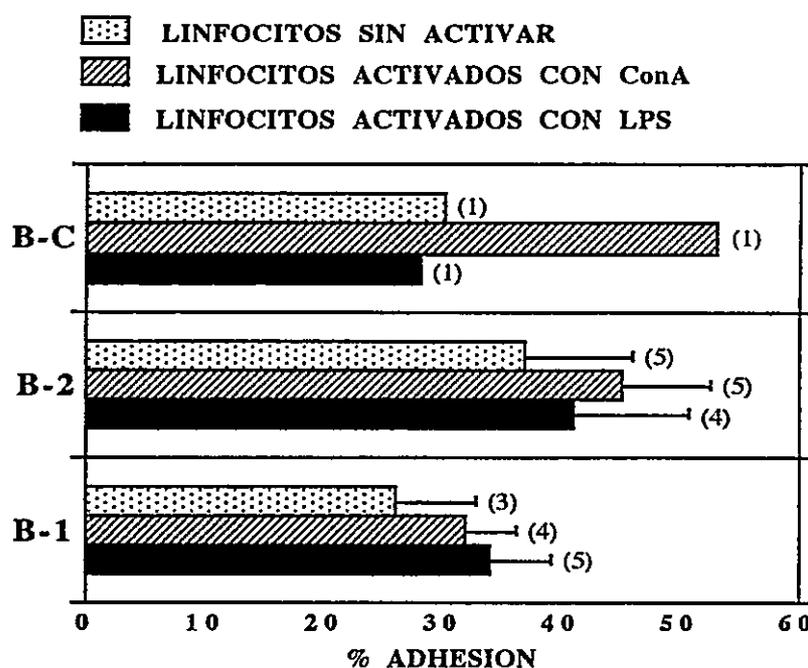
#### **2.1.1. Resultados de adhesión de células mononucleares**

En una primera etapa se realizaron ensayos de adhesión de linfocitos totales (presentes en MNC) obtenidos de bazo de ratón. En la figura 8 se observa que los linfocitos adhieren a los estromas completos de bazo (B-C), así como a los subcultivos B-1 y B-2. Para estudiar cambios en las propiedades adhesivas como resultado de la activación, se utilizó activadores policlonales de linfocitos T (ConA) y B (LPS). En el caso de estromas completos se observó un aumento de la adhesión al activar con ConA por 24 horas, pero en el caso de los subcultivos B-1 y B-2 no se detectaron diferencias significativas. Se deduce que deben existir otra(s) célula(s) presentes en los estromas completos que no son subcultivadas en B-1 o B-2 y que contribuyen a la adhesión de los linfocitos T activados. En un experimento, el tratamiento por 48 horas con ConA (o LPS) no mostró aumento de la adhesión a los estromas completos (no mostrado). El hecho que ConA no fue capaz de inducir un aumento en la adhesión luego de tratamiento por 48 horas refleja que el efecto de ConA es temporal, dependiente de activación de las células T y no mediado por simple entrecruzamiento de moléculas entre las células linfoides y el estroma.

#### **2.1.2. Resultados de adhesión de poblaciones enriquecidas en linfocitos B o T**

Para establecer diferencias en cuanto a la adhesión entre los linfocitos B y T se realizaron experimentos con poblaciones de MNC enriquecidas en uno u otro tipo de linfocito. El efecto de activadores policlonales (ConA y LPS) se

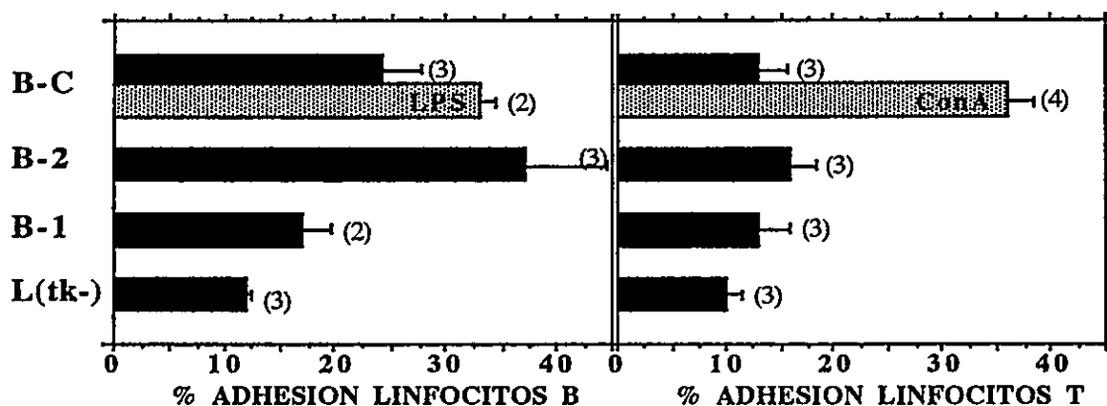
determinó luego de activación por 24 horas. Los resultados de adhesión de los linfocitos B y T a estromas completos (B-C), B-1 o B-2 se grafican en la figura 9. Se puede observar que la adhesión de los linfocitos B es aproximadamente el doble que la de T, tanto en los estromas completos como en el subcultivo B-2, y que la adhesión de los linfocitos T a los estromas completos es significativamente aumentada luego de activación (12 a 35%) probablemente reflejando cambios en las propiedades adhesivas de los linfocitos T. Luego del pretratamiento de los linfocitos T con Con A por 4 horas (1 experimento) también se obtuvo un aumento de la adhesión (12 a 24%) a los estromas completos de bazo (no mostrado).



### Figura 8. ADHESION DE MNC A ESTROMAS DE BAZO

Células mononucleares (MNC) fueron obtenidas de bazo de ratones Balb/c, luego de separación de los granulocitos y glóbulos rojos mediante gradiente discontinuo RPMI/Ficoll  $d=1.083$ . Las MNC fueron lavadas e incubadas por 24 horas en medio solo (linfocitos sin activar) o en medio conteniendo los mitógenos ConA o LPS. Las MNC se lavaron, se marcaron con  $^{51}\text{Cr}$  y se realizaron ensayos de adhesión sobre estromas primarios de bazo (Bazo-completo = B-C), o sobre los subcultivos de éstos (B-1 y B-2). Se utilizaron entre  $0.2$  y  $0.3 \times 10^6$  MNC por pozo ( $1,13 \text{ cm}^2$ ). Luego de realizada la adhesión las MNC no adherentes fueron retiradas de los pozos por aspiración y dos lavados.

BARRAS: resultados promedios de los porcentajes de adhesión obtenidos en experimentos realizados en triplicado. El número de experimentos independientes realizados para cada condición se muestra entre paréntesis. En el caso de dos o más experimentos se muestra la desviación estándar.



**Figura 9. ADHESION DE MNC ENRIQUECIDAS EN LINFOCITOS B O T**

Las células mononucleares (MNC) fueron obtenidas de bazo de ratones Balb/c, luego de separación de los granulocitos y glóbulos rojos mediante gradiente discontinuo RPMI/Ficoll  $d=1.083$ . Las MNC fueron lavadas e incubadas por 24 horas en medio solo (linfocitos sin activar) o en medio conteniendo los mitógenos ConA o LPS. Las MNC se lavaron y se sometieron a los protocolos de purificación de linfocitos B o T (Materiales y Métodos) y se marcaron con  $^{51}\text{Cr}$  antes de realizar el ensayo de adhesión sobre los estromas primarios de bazo (Bazo-completo = B-C), o sobre los subcultivos de éstos (B-1 y B-2). Se utilizaron entre  $0.2$  y  $0.3 \times 10^6$  células por pozo ( $1,13 \text{ cm}^2$ ). Luego de realizada la adhesión las células no adherentes fueron retiradas de los pozos por aspiración y dos lavados.

BARRAS: resultados promedios de los porcentajes de adhesión obtenidos en experimentos realizados en triplicado. El número de experimentos independientes realizados para cada condición se muestra entre paréntesis. Para cada condición se muestra la desviación estándar de los experimentos.

El pretratamiento de los linfocitos B con LPS por 4 horas no fue capaz de inducir un aumento en la adhesión a B-C, a B-1 y a B-2 (resultados no mostrados). El pretratamiento de los linfocitos B con LPS por 24 horas fue capaz de inducir un leve aumento en la adhesión de los linfocitos B a los estromas completos (figura 9).

Para estudiar el efecto de PMA sobre la adhesión de los linfocitos T o B se utilizó la concentración óptima mínima (ver Materiales y Métodos) capaz de inducir a las 14 horas un aumento en la expresión de MHC II en los linfocitos B (la evaluación por citometría de flujo no se muestra). Pretratamientos por 10 min o 4 horas con PMA no afectan cuantitativamente la adhesión a las células B-1 o B-2 (resultados no mostrados). El pretratamiento con PMA por 14 horas tampoco afectó la adhesión de los linfocitos B a los estromas completos de Bazo (resultados no mostrados).

## 2.2. Sistema heterólogo

Para conocer probables interacciones entre moléculas de adhesión se utilizaron líneas linfoides humanas en ensayos de adhesión con los estromas de bazo murino. En la Tabla V se muestran las moléculas de adhesión detectadas en las líneas linfoides humanas y la reactividad de los anticuerpos dirigidos a CR1, CR2, CR3 (CD11b) y CD14 con células de sangre periférica humana.

**TABLA V**  
**MOLECULAS DETECTADAS EN CELULAS LINFOIDES HUMANAS**

ANTICUERPO	ESPECIFICIDAD	ISOTIPO	DAUDI	RAMOS	MOLT-4	MNC s.p.
W6/32	MHCI,HLA ABC	IgG2a ratón	-	+	+	N.D.
LKT111	MHCII	IgM ratón	++	N.D.	N.D.	N.D.
Mab.543	CR1	IgG1k ratón	-	N.D.	N.D.	+6%
3C10	CD14	IgG1 ratón	N.D.	N.D.	N.D.	+6%
THB-5	CR2,CD21,EBVR	IgG2ak ratón	+	N.D.	N.D.	+6%
84.H10	ICAM-1	IgG1 ratón	++	+	+	N.D.
LIA1/2	BETA1, CD29	desconocido	+	+	+	N.D.
HP2/1	ALFA 4, CD49d	IgG1 ratón	+	+	+	N.D.
B1E5	ALFA 5, CD49e	IgG1 ratón	-	-	N.D.	N.D.
LIA 3/2	BETA2, CD18	desconocido	+	-	+	N.D.
TS1/11	CD11a	desconocido	+	N.D.	N.D.	N.D.
MY904	CD11b,CR3	IgG2aK ratón	+ débil	N.D.	N.D.	+6%
4G4	LVAP2	IgG1 ratón	+débil	-	-	N.D.
1B2	VAP-1	IgG1 ratón	-	-	-	N.D.
MK-D6	MHC II ratón*	IgG2aK ratón	-	N.D.	N.D.	N.D.

++: fuertemente positivo, en caso de no ser en un 100% de las células se especifica el porcentaje

+: positivo, en caso de no ser un 100% se especifica el porcentaje

-: negativo

N.D.: no determinado

MNC s.p.: mononucleares de sangre periférica humana obtenida por separación en gradiente discontinuo de PBS/Ficoll d=1.077.

\*: control de isotipo.

En la Tabla VI se muestran los porcentajes de adhesión de las líneas linfoides B (Daudi y Ramos) y T (Molt-4) a las células estromales de bazo de ratón. Estos resultados confirman la interacción heteróloga entre células humanas y estromas murinos.

**TABLA VI**  
**ADHESION DE LINEAS LINFOIDES HUMANAS A CELULAS**  
**ESTROMALES DE BAZO DE RATON**

	RAMOS	DAUDI	MOLT-4
<b>B-C</b>	N.D.	22±1 (2)	N.D.
<b>B-2</b>	65±4 (2)	60±2 (2)	85
<b>B-1</b>	51	31	N.D.

Se muestran los porcentajes de adhesión de las líneas linfoides humanas (RAMOS DAUDI Y MOLT-4) a los estromas de bazo (B-C, B-2 Y B-1)

N.D.: no determinado

(n): número de experimentos

### 2.3. Efecto de anticuerpos bloqueadores de la adhesión

Para conocer cuales son las moléculas de adhesión involucradas en la adhesión de linfocitos y líneas linfoides a los estromas de bazo, se estudió el efecto de anticuerpos monoclonales en la adhesión.

**2.3.1. Participación de moléculas de adhesión expresadas en los estromas:** La participación de moléculas de adhesión presentes en los estromas de bazo se estudió preincubando los estromas con anticuerpos monoclonales dirigidos a moléculas de adhesión murinas.

**Sistema homólogo:** Cuando se estudió el efecto de los anticuerpos monoclonales anti-CD44 (KM201) y anti-VCAM-1 (M/K-2.6) en la adhesión de células mononucleares obtenidas de bazo de ratón a células estromales de bazo no hubo efecto o bien se encontró un aumento en la adhesión (resultados no mostrados).

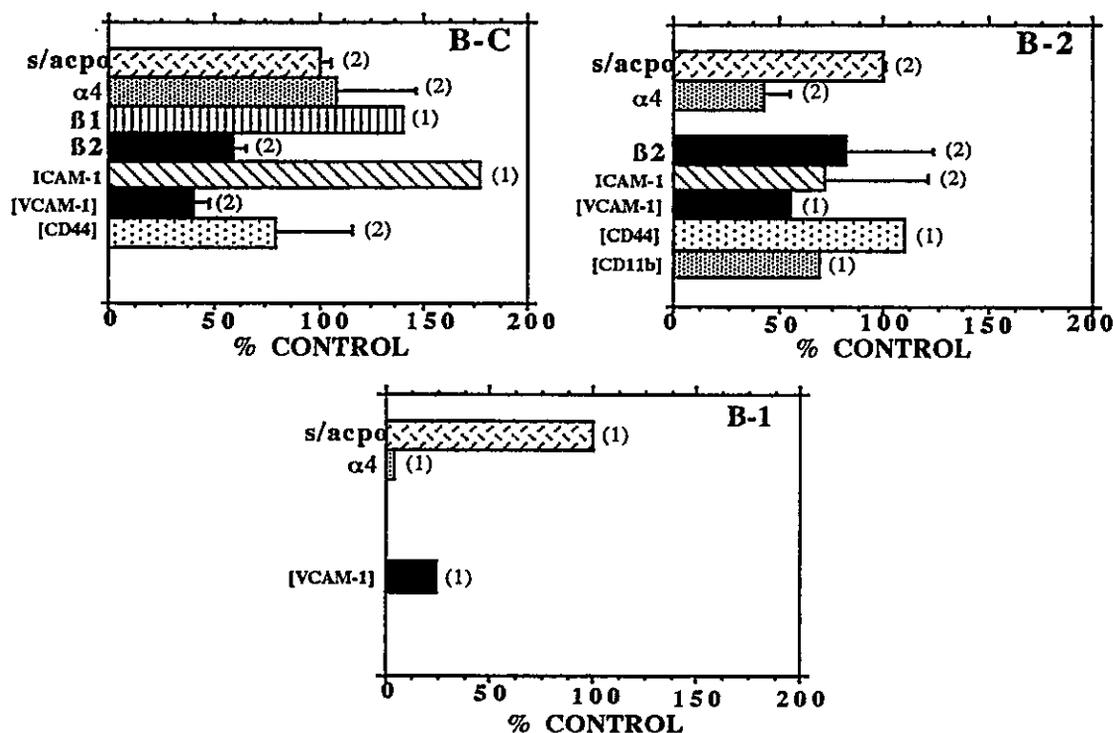
**Sistema heterólogo:** En el sistema heterólogo (Figuras 10 y 11) se detectó una significativa inhibición con el anticuerpo dirigido a VCAM-1 murino (M/K-2.6). En la Figura 10 se muestra el efecto inhibitorio del anticuerpo M1/70 sugiriendo la participación de CD11b en la adhesión de Daudi a B-2. Al investigar la participación de la molécula CD44 expresada en el subcultivo B-2, se detectó sólo en el caso de RAMOS una inhibición (figura 11).

**2.3.2. Participación de moléculas de adhesión expresadas en las células linfoides:** Para estudiar la participación de moléculas de adhesión presentes en las células linfoides, éstas se preincubaron con anticuerpos monoclonales dirigidos a moléculas murinas (en el sistema homólogo) o a moléculas humanas (en el sistema heterólogo).

**Sistema homólogo:** Cuando se estudió el efecto de los anticuerpos anti-ICAM-1 (YN-1.7.4), anti- $\alpha_4$  (PS/2.3) y anti-selectina-L (Mel-14) en la adhesión de MNC a los estromas B-1 y B-2 no hubo efecto o bien se encontró un aumento en la adhesión (resultados no mostrados). El pretratamiento de las MNC con el anticuerpo anti-ICAM-1 produjo un aumento casi al doble de la adhesión a B-2, sugiriendo un efecto mediado por receptores Fc. Sin embargo, el pretratamiento del estroma con Ig de rata obtenida de suero normal (con el fin de bloquear los receptores Fc) no impidió este aumento.

**Sistema heterólogo:** En el sistema heterólogo (figuras 10 y 11) en la adhesión de DAUDI, RAMOS y MOLT-4 a B-2 se logró bloquear la adhesión con el anticuerpo anti- $\alpha_4$  (HP2/1). El anticuerpo anti- $\alpha_4$  también bloqueó la adhesión de DAUDI a B-1 pero no bloqueó la adhesión a B-C, probablemente debido a la participación de moléculas de adhesión o receptores Fc presentes en B-C y ausentes de los subcultivos B-1 y B-2 (figura 10). El anticuerpo anti- $\beta_2$  fue capaz de bloquear la adhesión de DAUDI a B-C sugiriendo la participación de estas integrinas.

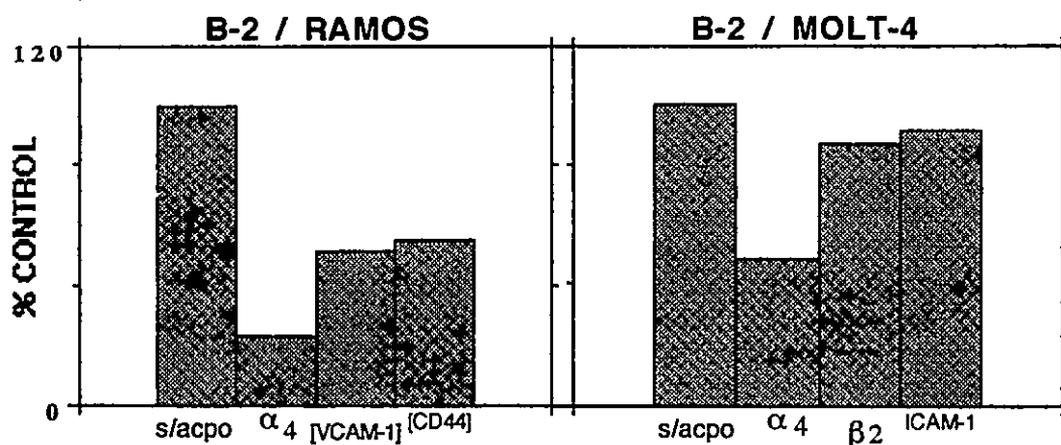
Las diferencias encontradas en el sistema homólogo versus el sistema heterólogo reflejan probablemente diferencias en cuanto al estado de activación de las moléculas de adhesión, la contribución de otros receptores de adhesión y la afinidad diferencial de la porción Fc de los anticuerpos por receptores Fc presentes en las células linfoides.



**Figura 10. Efecto de anticuerpos monoclonales en la adhesión de la línea linfóide DAUDI a estromas de bazo**

La línea B linfoblástica humana DAUDI, marcada radioactivamente durante 1 hora a 37°C con  $^{51}\text{Cr}$  o durante toda la noche con TdR  $^3\text{H}$ , fue utilizada para ensayos de adhesión sobre estromas primarios de bazo (B-C), o sobre los subcultivos de éstos (B-1 y B-2). Se utilizaron entre 0.2 y  $0.3 \times 10^6$  células DAUDI por pozo ( $1,13 \text{ cm}^2$ ). Antes del ensayo de adhesión las células DAUDI fueron preincubadas durante 30 min. a 4°C en medio solo o en medio conteniendo los siguientes anticuerpos monoclonales dirigidos a moléculas humanas: anti- $\alpha_4$  (HP2/1), anti- $\beta_1$  (LIA1/2), anti- $\beta_2$  (LIA3/2) o anti-ICAM-1 (84H.10). Por otro lado los estromas fueron preincubados durante 1 hora a 37°C en medio solo o en medio conteniendo anticuerpos dirigidos a las siguientes moléculas de ratón: anti-VCAM-1 (MK/2.6), anti-CD44 (KM201) o anti-CD11b (M1/70). Luego de realizada la adhesión las células linfoides no adherentes fueron retiradas de los pozos por aspiración y dos lavados.

BARRAS: resultados promedios de los porcentajes de adhesión (obtenidos en experimentos realizados en triplicado) se muestran como porcentajes del control (sin anticuerpo). El número de experimentos independientes realizados para cada condición se muestra entre paréntesis. En el caso de dos o más experimentos por condición se muestra el porcentaje de desviación estándar.



**Figura 11. Efecto de anticuerpos monoclonales en la adhesión de las líneas linfoides RAMOS Y MOLT-4 a células de B-2**

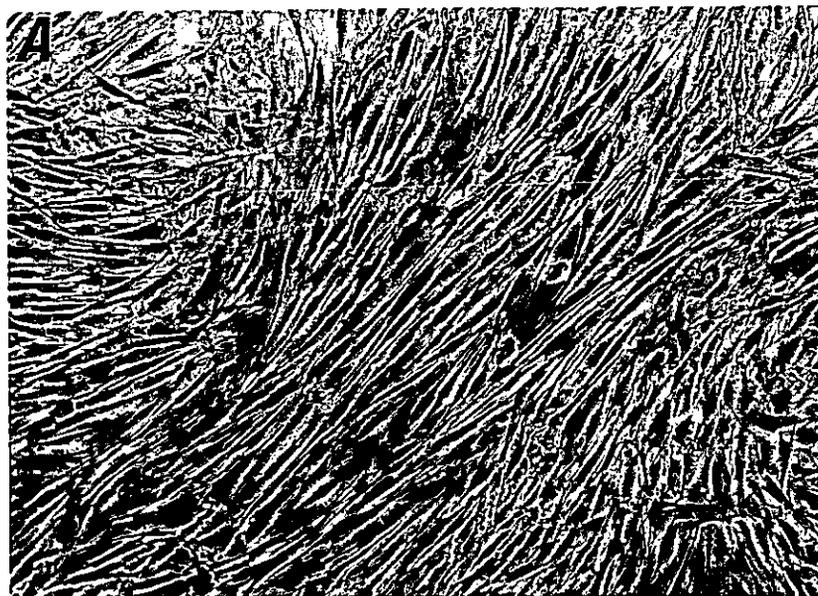
Células de la línea linfoblástica humana B (RAMOS) o T (MOLT-4), marcadas radioactivamente durante 1 hora a 37°C con  $^{51}\text{Cr}$ , fueron utilizadas en ensayos de adhesión sobre el estroma B-2. Se utilizaron entre  $0.2$  y  $0.3 \times 10^6$  células linfoides por pozo ( $1,13 \text{ cm}^2$ ). Antes del ensayo de adhesión las células linfoides fueron preincubadas durante 30 min. a 4°C en medio solo o en medio conteniendo los siguientes anticuerpos monoclonales dirigidos a moléculas humanas: anti- $\alpha_4$  (HP2/1), anti- $\beta_2$  (LIA3/2) o anti-ICAM-1 (84H.10). Por otro lado el estroma fue preincubado durante 1 hora a 37°C en medio solo o en medio conteniendo los siguientes anticuerpos dirigidos a las siguientes moléculas de ratón: anti-VCAM-1 (M/K-2.6) o anti-CD44<sup>2</sup> (KM201). Luego de realizada la adhesión las células linfoides no adherentes fueron retiradas de los pozos por aspiración y dos lavados.

BARRAS: resultados promedios de los porcentajes de adhesión (obtenido en un experimento realizado en triplicado) se muestran como porcentajes del control (sin anticuerpo).

### 3. CARACTERIZACION DE CELULAS DE AMIGDALA HUMANA

**3.1. Células estromales de amígdala humana:** Los estromas preparados a partir de amígdala humana presentan una población celular morfológicamente homogénea de células grandes adherentes, con núcleo oval y con tinción esterasa no específica negativa (no mostrado). Al inicio los cultivos tienen algunas de las células similares a linfocitos adheridas a las células grandes y que se despegan luego de varios días de cultivo. En las fotomicrografías ópticas de la figura 12 se observan las células adherentes de amígdala (AMG).

**3.2. Citometría de flujo:** El análisis por citometría de flujo de las células AMG (figura 13) nos indica la presencia en la superficie celular de las siguientes moléculas: antígenos de histocompatibilidad de clase II (luego de tratamiento con IFN- $\gamma$  humano), ICAM-1 y VCAM-1 de forma constitutiva e inducible (por tratamiento con IFN- $\gamma$  humano) y la molécula CD40 descrita en FDC (ausente en macrófagos y fibroblastos). También presentan las integrinas de la subfamilia  $\beta_1$  (VLA-2, VLA-4 y VLA-5), la molécula LVAP-2 (presente en linfocitos y células endoteliales de vénula) y no presentan las integrinas de la subfamilia  $\beta_2$ . Los antígenos intracelulares detectados fueron: vimentina y el factor de von Willebrand. La expresión de ICAM-1, VCAM-1, LVAP2 y Willebrand nos permitió identificar a estas células como células endoteliales de vénula. Concordante con lo anterior, no poseen las moléculas de adhesión o marcadores presentes en FDC (R4/23, KI-M4 y CD11b), IDC (CD11c y X-12) o macrófagos (CD11b, Receptores de complemento y CD14). La expresión constitutiva o inducible (con IFN- $\gamma$ ) de VCAM-1 se pierde luego de varios pasajes a diferencia de la molécula ICAM-1 que mostró ser estable durante repetidos subcultivos. En la Tabla VII se muestra la caracterización completa de las células AMG así como también el análisis de las células iniciales en el cultivo (AMG<sub>t</sub>). Se observa que prácticamente el 100% de las células en el cultivo inicial correspondían a linfocitos B (clase II<sup>+</sup>, BB1<sup>+</sup> y CD40<sup>+</sup>) y T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>). Con el anticuerpo anti- $\alpha_1$  se detectó un 1% de reacción positiva indicando que un porcentaje no superior a éste correspondería a las células AMG.

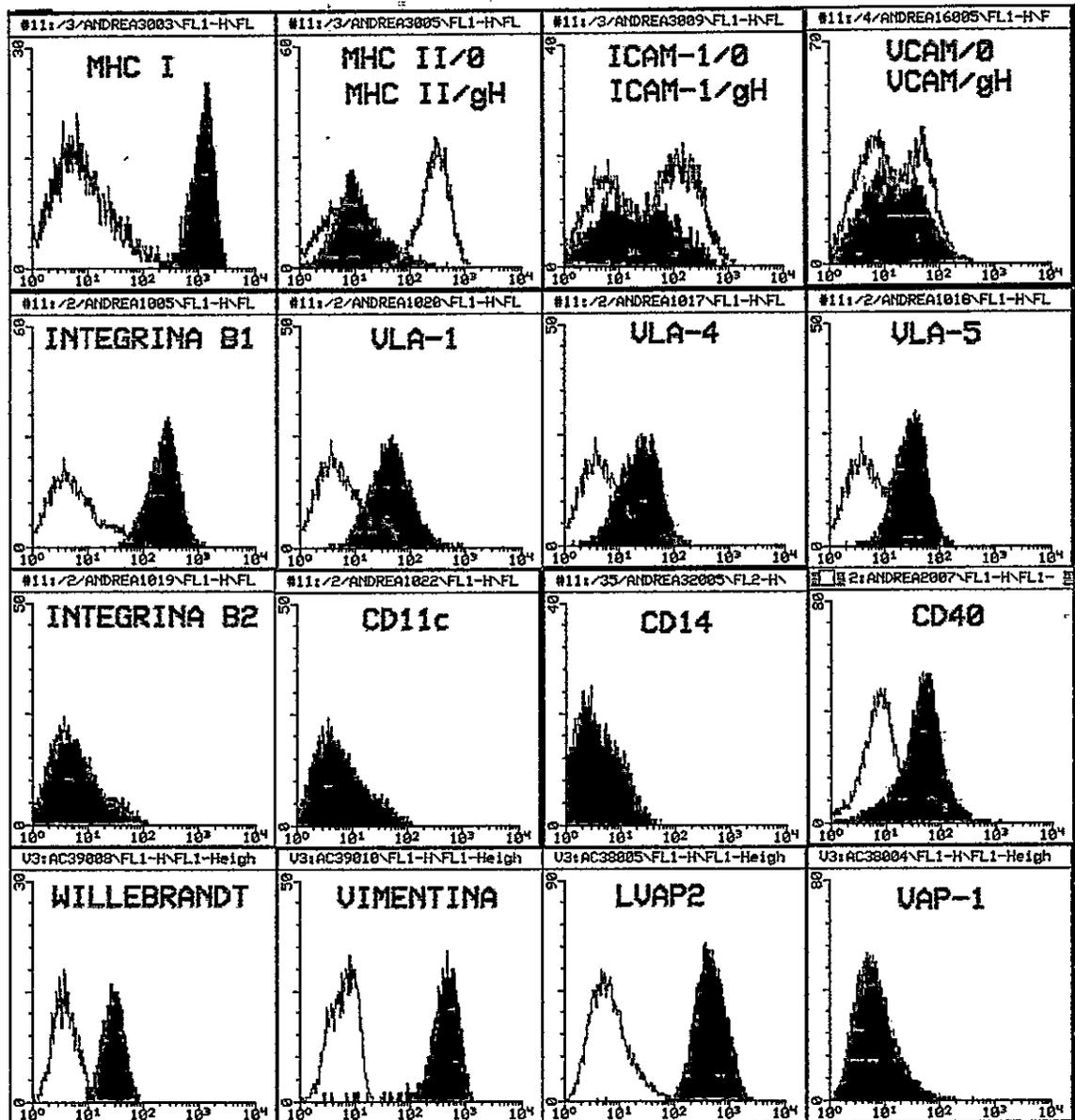


**Figura 12 Fotomicrografías ópticas de células estromales de amígdala humana**

A: Fotomicrografía tomada en el microscopio óptico invertido de un cultivo confluyente de células AMG1.  
1 cm= 133  $\mu$ m.

B: Fotomicrografía tomada en el microscopio óptico invertido de un cultivo subconfluyente de células AMG1. se puede notar un núcleo oval con nucléolos (flecha) y prolongaciones finas (puntas de flecha).  
1 cm= 33  $\mu$ m.

La expresión de ICAM-1, VCAM-1, LVAP2 y Willebrand permite identificar a estas células como células endoteliales de vénula (ver figura 13).



**FIGURA 13. Análisis de inmunofluorescencia por citometría de flujo de células estromales de amígdala humana ( AMG ).**

Se grafica intensidad de fluorescencia versus número de células. Los anticuerpos primarios fueron: anti-MHC I (W6/32), anti MHC II (LKT111), anti-ICAM-1 (84H.10), anti-VCAM-1 (4B9), anti- $\beta_1$ , (LIA3/1), anti- $\alpha_1$  (TS2/7), anti- $\alpha_4$  (HP2/1), anti- $\alpha_5$  (B1E5), anti- $\beta_2$  (LIA3/2), anti-CD11c (HC1/1), anti-CD14 (3C10), anti-CD40 (G28-5), anti-von Willebrand (202D3), anti-vimentina (V-6630), anti-LVAP2 (4G4) y anti-VAP-1(1B2)

**Gráfica gris:** células control tratadas sólo con el segundo anticuerpo conjugado con FITC anti-Ig de ratón desarrollado en oveja.

**Gráfica roja:** células fueron incubadas con un primer anticuerpo de ratón seguido por el segundo anticuerpo conjugado.

**Gráfica verde:** células pretratadas con 500 U/ml de IFN- $\gamma$  humano durante 72 horas fueron incubadas con un primer anticuerpo de ratón seguido por el segundo anticuerpo conjugado.

**TABLA VII**  
**MOLECULAS DETECTADAS EN CELULAS**  
**DE AMIGDALA HUMANA Y HUVEC**

ANTICUERPO	ESPECIFICIDAD	ISOTIPO	AMG <sub>t</sub>	AMG1 P: 3 - 13	AMG2 P: 1 - 4	HUVEC
W6/32	MHCI,HLA ABC	IgG2a ratón	++	++	+	+
LKT111	MHCII	IgM ratón	+ 57%	- (si)	- (si)	- (si)
Mab.543	CR1	IgG1k ratón	N.D.	-	-	-
3C10	CD14	IgG1 ratón	-	-	-	N.D.
OKT3	CD3	IgG2a ratón	+ 26%	N.D.	N.D.	N.D.
OKT4	CD4	IgG2b ratón	+ 22%	N.D.	N.D.	N.D.
OKT8	CD8	IgG2 ratón	+ 5%	N.D.	N.D.	N.D.
IF-5	CD20	desconocido	N.D.	-	N.D.	N.D.
THB-5	CR2,CD21,EBVR	IgG2ak ratón	N.D.	-	-	N.D.
84.H10	ICAM-1	IgG1 ratón	+ 73%	- /+ (si)	- /+ (si)	- (si)
4B9	VCAM-1	IgG1 ratón	-	- /+(no/si)	- /+(no/si)	- [no/si]
LIA1/2	BETA 1, CD29	desconocido	+débil	++	++	N.D.
TS2/7	ALFA 1,CD49a	IgG1 ratón	+ 1%	+	+	N.D.
TEA1/41	ALFA 2, CD49b	desconocido	+ débil	-	-	N.D.
HP2/1	ALFA 4, CD49d	IgG1 ratón	+ débil	+	+	N.D.
B1E5	ALFA 5, CD49e	IgG1 ratón	N.D.	+	N.D.	N.D.
LIA 3/2	BETA2, CD18	desconocido	+	-	-	N.D.
TS1/11	CD11a	desconocido	+	-	-	N.D.
MY904	CD11b,CR3	IgG2ak ratón	+ 76 %	-	-	N.D.
HC1/1	CD11c	desconocido	N.D.	-	N.D.	N.D.
4G4	LVAP2	IgG1 ratón	N.D.	++	++	+
1B2	VAP-1	IgG1 ratón	N.D.	-	-	N.D.
202D3	WILLEBRANDT	IgG1 ratón	N.D.	+	N.D.	N.D.
V-6630	VIMENTINA	IgG2akratón	N.D.	++	++	+
G28-5	CD40	IgG1 ratón	+ 61 %	+	+	N.D.
BB1/B7	BB1	IgG1 ratón	+ 75 %	-	N.D.	N.D.
PD7/26	CD45RB	IgG1 ratón	N.D.	-	N.D.	N.D.
KI-M4	N.I.(FDC)	IgG3 ratón	-	-	N.D.	N.D.
R4/23	N.I.(FDC)	IgM ratón	-	-	N.D.	N.D.
X-12	N.I.(IDC)	IgG1 ratón	-	N.D.	N.D.	N.D.

AMG<sub>t</sub>: células totales obtenidas de amígdalas del paciente 1 sembradas al inicio del cultivo

AMG1: células adherentes de amígdala del paciente 1

AMG2: células adherentes de amígdala del paciente 2

P: pasaje

( ): expresión luego de la inducción por 72 horas con 500U/ml de IFN- $\gamma$

+/-: dos subpoblaciones, una + y otra -

no/si: dos subpoblaciones, una - y otra +

[ ]: inducción por 12 horas con 10ng/ml de TNF- $\alpha$

+,si: presencia en 100% de las células

-,no: ausencia en 100% de las células

N.D.: no determinado.

N.I.: no identificado

## 4. ADHESION CELULAR EN AMIGDALA

### 4.1. Adhesión de células linfoides humanas a células AMG

Los linfocitos obtenidos de amígdala, las líneas linfoblásticas B RAMOS y DAUDI y la línea linfoide T MOLT-4 son capaces de adherir a las células AMG en porcentajes significativos (Tabla VIII). Puesto que las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) es el modelo común empleado para estudiar la adhesión de células linfoides al endotelio, realizamos algunos estudios comparativos con las células AMG. En la tabla VIII se muestra que la adhesión de RAMOS a las células AMG fue significativamente mayor que a HUVEC no estimuladas.

En la Tabla V se muestra la expresión de algunas moléculas de adhesión presentes en las líneas linfoides.

**TABLA VIII**  
**ADHESION DE CELULAS LINFOIDES A LAS CELULAS**  
**ENDOTELIALES AMG Y HUVEC**

	RAMOS	DAUDI	MOLT-4	LINF.AMG
AMG*	22±3 (7) <sup>a</sup>	39±8 (3)	59±9 (3)	25
HUVEC*	5,5±3,5 (2)	N.D.	N.D.	N.D.
HUVEC+ N.D.	83±16 (2)	N.D.		N.D.

Se muestra el porcentaje de adhesión con su desviación estándar

a: en paréntels se indica el número de experimentos

\*: células no estimuladas

+: células estimuladas toda la noche con 10ngr/ml de TNF- $\alpha$

N.D.: no determinado.

(n): número de experimentos

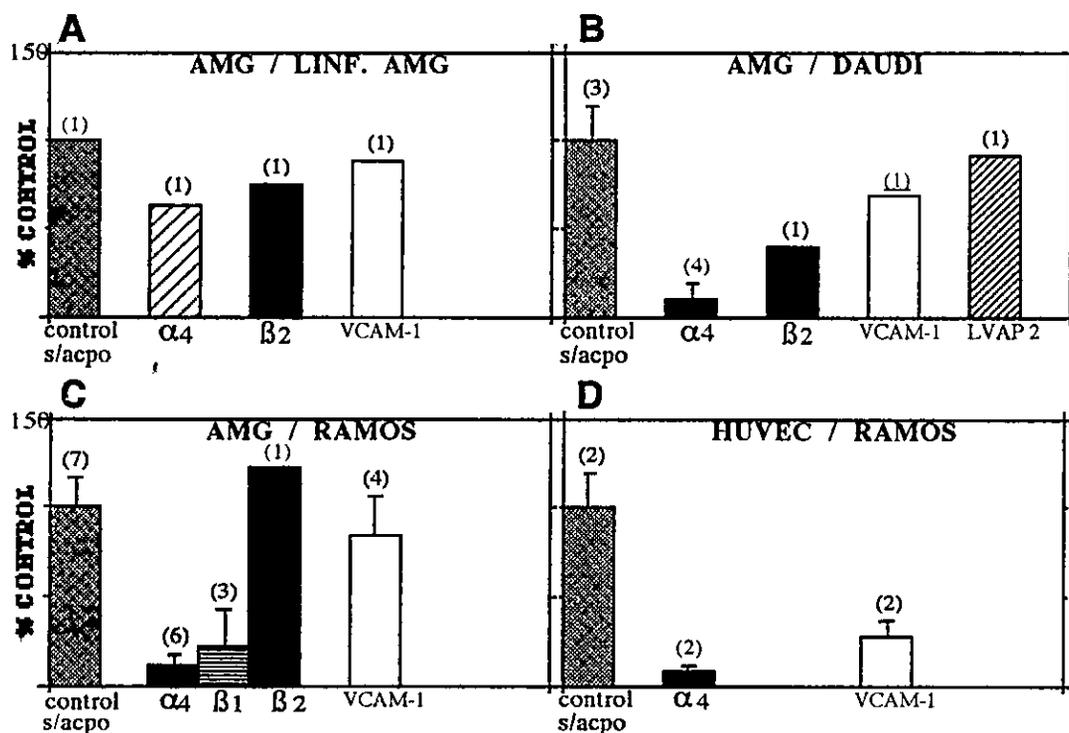
### 4.2. Efecto de anticuerpos monoclonales en la adhesión

Las células HUVEC estimuladas con TNF- $\alpha$  se utilizaron como control para evaluar el efecto de los anticuerpos anti- $\alpha_4$  y anti-VCAM-1 en la adhesión de la línea RAMOS (Elices y col., 1990). A diferencia de lo descrito para HUVEC (Elices y col., 1990), las células endoteliales de amígdala humana (AMG) no requieren de previa estimulación con citoquinas como

TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  para mediar adhesión dependiente de VLA-4 (figura 14 y Tabla VIII). El anticuerpo dirigido a la cadena  $\alpha_4$  de las integrinas (HP2/1) fue capaz de bloquear casi en un 100% la adhesión de las líneas RAMOS y DAUDI tanto a estromas de amígdala humana como a células HUVEC pretratadas con TNF- $\alpha$  (figura 14). También bloquea la adhesión de la línea MOLT-4 (75%) a las células AMG no estimuladas (no mostrado). Sin embargo, no bloquea de forma tan efectiva la adhesión de linfocitos de amígdala (AMG<sub>t</sub>), lo que sugiere la participación de otra(s) molécula(s) de adhesión o probablemente refleja la débil expresión o el estado no activado de VLA-4 en parte de los linfocitos de amígdala. Aunque las células AMG poseen la molécula VCAM-1 en su superficie a un nivel bajo, y ya que VCAM-1 es ligando de VLA-4 se investigó la participación de VCAM-1 en la adhesión de las células linfoides. En la figura 14 se observa que el anticuerpo dirigido a VCAM-1 (4B9) capaz de bloquear la adhesión de RAMOS a HUVEC no bloqueó la adhesión a AMG. Esto nos hizo suponer que fibronectina o otro ligando de VLA-4 distinto de VCAM-1 podría estar participando. La adhesión de linfocitos de amígdala y DAUDI a AMG tampoco fue bloqueada por el anticuerpo dirigido a VCAM-1 (4B9). A diferencia de DAUDI la línea RAMOS no expresa las integrinas  $\beta_2$  y de las integrinas  $\beta_1$  sólo expresa a la molécula VLA-4, por lo cual los anticuerpos dirigidos a VLA-5 (no mostrado) y  $\beta_2$  no tuvieron efecto. Puesto que las células AMG se encuentran asociadas a una matriz extracelular de fibronectina (figura 20) se determinó si fibronectina es el ligando reconocido por VLA-4 en AMG. Se realizaron experimentos de bloqueo con un anticuerpo policlonal dirigido a fibronectina humana (figura 15). El anticuerpo fue capaz de bloquear significativamente la adhesión de RAMOS a fibronectina purificada de plasma humano y de bovino pero no a AMG, sugiriendo que fibronectina no es el ligando reconocido por VLA-4 en estas células. Esto sugiere que, VLA-4 reconocería un ligando distinto de VCAM-1 y de fibronectina presente en AMG.

Moléculas de adhesión como LFA-1 y Mac-1 probablemente están involucradas en la adhesión de DAUDI dado que anticuerpos dirigidos a  $\beta_2$  fueron capaces de inhibir la adhesión en más de un 50% (Figura 14). La adhesión de MOLT-4 no fue bloqueada con el anticuerpo anti- $\beta_2$ , reflejando el estado inactivo de la(s) molécula(s) de la subfamilia  $\beta_2$  en la superficie de esta

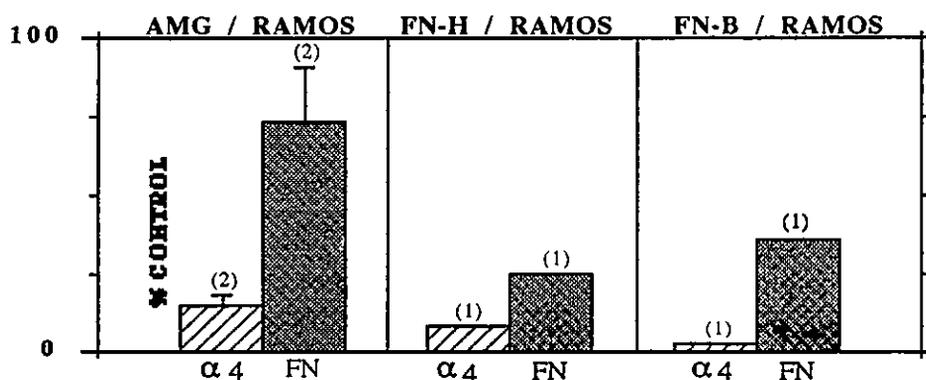
línea celular (resultado no mostrado). La molécula VLA-5 presente en MOLT-4 podría participar en la adhesión de esta línea celular a AMG. En la Tabla VIII se muestran los porcentajes reales de adhesión.



#### FIGURA 14. EFECTO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EN LA ADHESIÓN DE LINFOCITOS Y LINEAS LINFÓIDES A CELULAS ENDOTELIALES (AMG Y HUVEC)

Linfocitos obtenidos de amígdala del paciente 1 (A) o las líneas linfoblásticas humanas B DAUDI (B) o RAMOS (C, D), marcadas radioactivamente se utilizaron en ensayos de adhesión sobre las células AMG (paciente 1, y 2) o sobre las HUVEC (estimuladas toda la noche con 10ng/ml de TNF- $\alpha$ ). Se utilizaron entre 0.2 y 0.3x10<sup>6</sup> células linfoides por pozo (1,13 cm<sup>2</sup>). Antes del ensayo de adhesión las células linfoides fueron preincubadas durante 30 min. a 4°C en medio solo o en medio conteniendo los siguientes anticuerpos monoclonales dirigidos a moléculas humanas: anti- $\alpha 4$  (HP2/1), anti- $\beta 1$  (LIA 1/2), anti- $\beta 2$  (LIA3/2). Por otro lado los estromas fueron preincubados durante 1 hora a 37°C en medio solo o en medio conteniendo los siguientes anticuerpos dirigidos a moléculas humanas: anti-VCAM-1 (4B9) o anti-LVAP2 (4G4). Luego de realizada la adhesión las células linfoides no adherentes fueron retiradas de los pozos por aspiración y dos lavados.

BARRAS: resultados promedios de los porcentajes de adhesión (obtenidos en experimentos realizados en triplicado) se muestran como porcentajes del control (sin anticuerpo). El número de experimentos independientes realizados para cada condición se muestra entre paréntesis. En el caso de dos o más experimentos se muestra el porcentaje de desviación estándar.



**FIGURA 15. EFECTO DEL ANTICUERPO POLICLONAL ANTI-FIBRONECTINA SOBRE LA ADHESION DE LA LINEA LINFOIDE RAMOS A CELULAS ENDOTELIALES ( AMG )**

La línea B linfoblástica humana RAMOS marcada radioactivamente durante 1 hora a 37°C con  $^{51}\text{Cr}$  o durante toda la noche con TdR  $^3\text{H}$  se utilizó en ensayos de adhesión sobre las células AMG1, o sobre fibronectina purificada de plasma humano (FN-H) o bovino (FN-B). Se utilizaron entre  $0.2$  y  $0.3 \times 10^6$  células linfoides por pozo ( $1,13\text{cm}^2$ ). El anticuerpo monoclonal anti- $\alpha_4$  (HP2/1) se agregó durante el ensayo a pozos conteniendo células AMG o fibronectina. El anticuerpo policlonal anti fibronectina-humana (anti-FN) se preincubó 1 hora a 37° C con las células AMG, con FN-H o con FN-B. Luego de realizada la adhesión las células linfoides no adherentes fueron retiradas de los pozos por aspiración y dos lavados.

BARRAS: resultados promedios de los porcentajes de adhesión (obtenidos en experimentos realizados en triplicado) se muestran como porcentajes del control (sin anticuerpo). El número de experimentos independientes realizados para cada condición se muestra entre paréntesis. En el caso de dos o más experimentos por condición se muestra el porcentaje de desviación estándar.

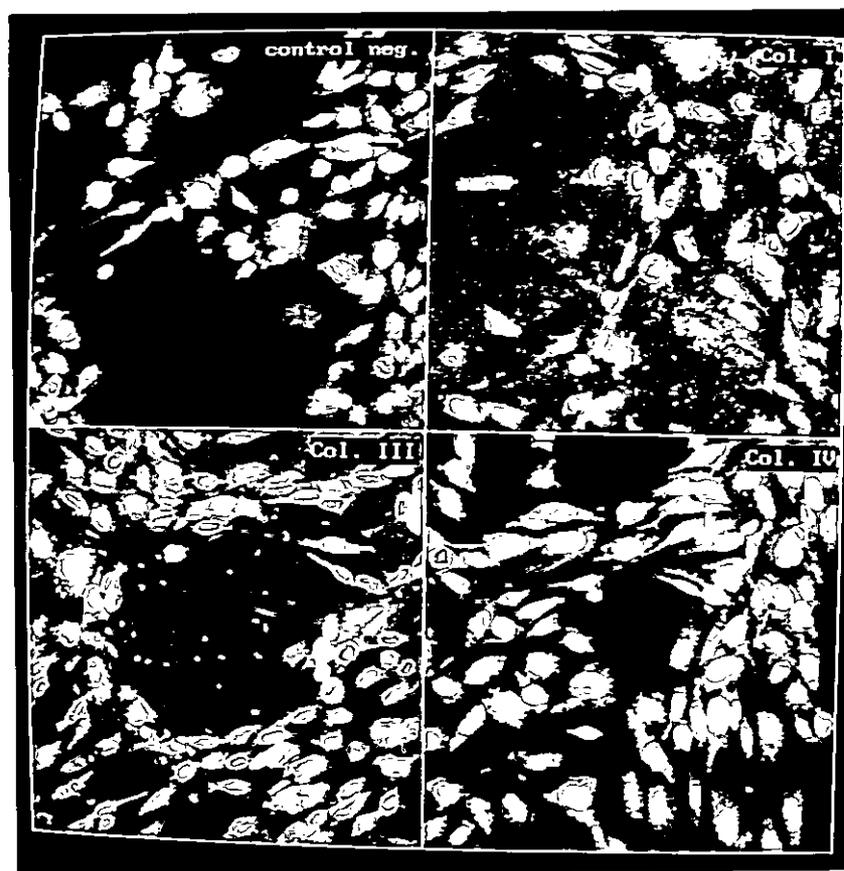
## 5. DETERMINACION DE MOLECULAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR. POR INMUNOFLUORESCENCIA (MICROSCOPIA CONFOCAL).

Para caracterizar más los modelos celulares de estroma utilizados evaluamos la presencia de algunos elementos de la matriz extracelular que podrían contribuir a la adhesión de células linfoides a los estromas.

**5.1. Colágenos:** En las figuras 16 a 18 se muestran los resultados de determinación de colágenos tipo I, III y IV mediante inmunofluorescencia indirecta. Tanto en los cultivos de las células AMG, de B-1 y de B-2 se detectó la presencia de colágenos de los tipos I y III. El anticuerpo anti-colágeno tipo

IV (presente en láminas basales) dió una reacción débil o negativa. Cuando se realizaron los ensayos de adhesión de células linfoides a los estromas no se observó adhesión a sitios en la placa sin células estromales, sugiriendo que el colágeno *per se* no fue capaz de mediar adhesión. Es conocido que las integrinas presentes en células linfoides que unen a colágeno (VLA-1 y VLA-2) se expresan sólo después de varias semanas de estimulación con mitógenos (Hemler y col., 1987; Springer, 1990). Además las líneas celulares linfoides como Ramos, Molt-4 y muchas otras no expresan estas integrinas (Hemler y col., 1987 a y b).

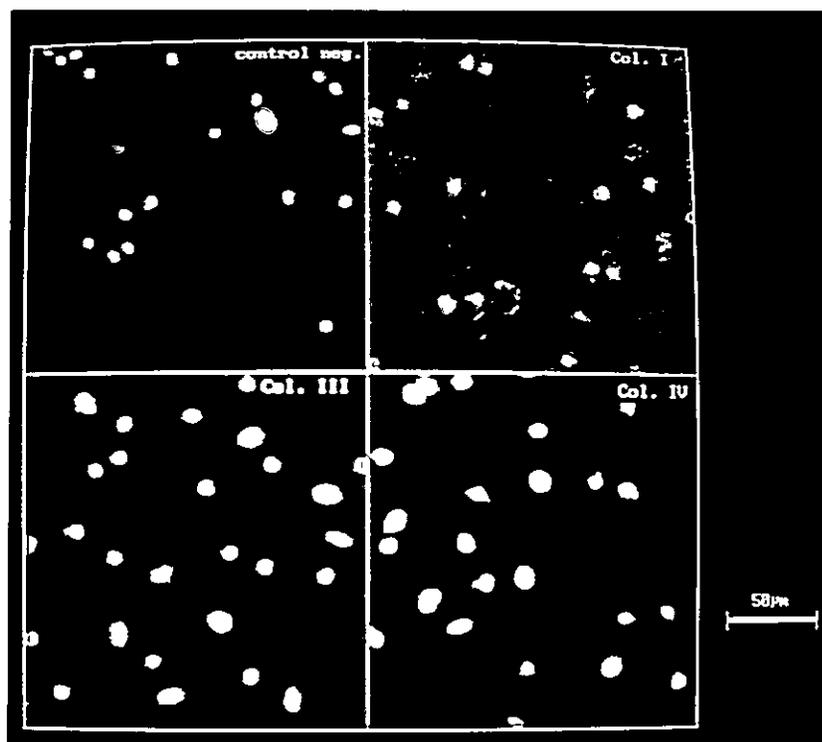
**5.2. Fibronectina:** En células de B-1 (figura 19) se detectó la presencia abundante de fibronectina. En células de B-2 (figura 19) la fibronectina se observa asociada a las células más extendidas de tipo fibroblástico (núcleos mayores) indicando que probablemente estas células son capaces de sintetizar depositar y unir fibronectina. En las células AMG (figura 20) se detectó abundante fibronectina no siempre coincidente con los núcleos de las células RAMOS adheridas a AMG indicando que un ligando de VLA-4 distinto de fibronectina podría mediar la adhesión. Se puede encontrar fibronectina en la superficie apical de las células y por lo tanto es probable que pueda mediar la adhesión. La presencia de fibronectina en la superficie de las células se demostró al realizar cortes ópticos en el microscopio confocal (no mostrado).



**Figura 16. DETECCIÓN DE COLAGENOS EN CELULAS DE B-1**

Células de B-1 cultivadas sobre cubreobjetos fueron fijadas en metanol 100% a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 20 min., lavadas e incubadas por 30 min. en medio solo (control negativo) o en medio conteniendo los anticuerpos policlonales dirigidos a colágeno I, III o IV; seguido de 30 min. de incubación con el fragmento  $\text{F(ab')}_2$  del anticuerpo secundario conjugado con FITC, anti-Ig de conejo desarrollado en cabra. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (ver Materiales y Métodos).

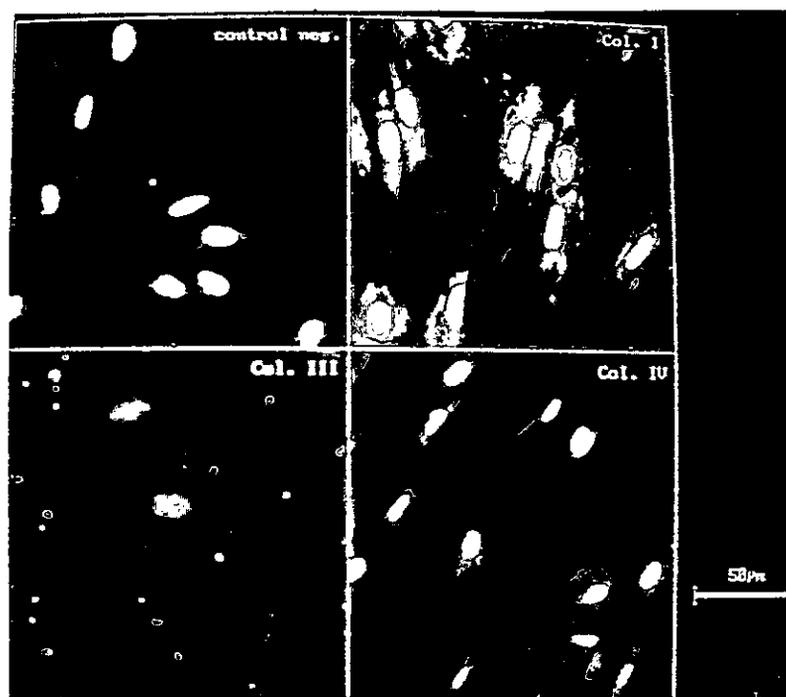
En la figura se muestra la superposición de imágenes de cortes ópticos. Las imágenes emitidas por el yoduro de propidio (rojo) y las emitidas por el FITC (verde) fueron procesadas independientemente y luego superpuestas.  $1\text{cm} = 33\mu\text{m}$ .



**Figura 17. DETECCIÓN DE COLAGENOS EN CELULAS DE B-2**

Células de B-2 cultivadas sobre cubreobjetos fueron fijadas en metanol 100% a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 20 min., lavadas e incubadas por 30 min. en medio solo (control negativo) o en medio conteniendo los anticuerpos policlonales dirigidos a colágeno I, III o IV; seguido de 30 min. de incubación con el fragmento  $\text{F(ab')}_2$  del anticuerpo secundario conjugado con FITC, anti-Ig de conejo desarrollado en cabra. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (ver Materiales y Métodos).

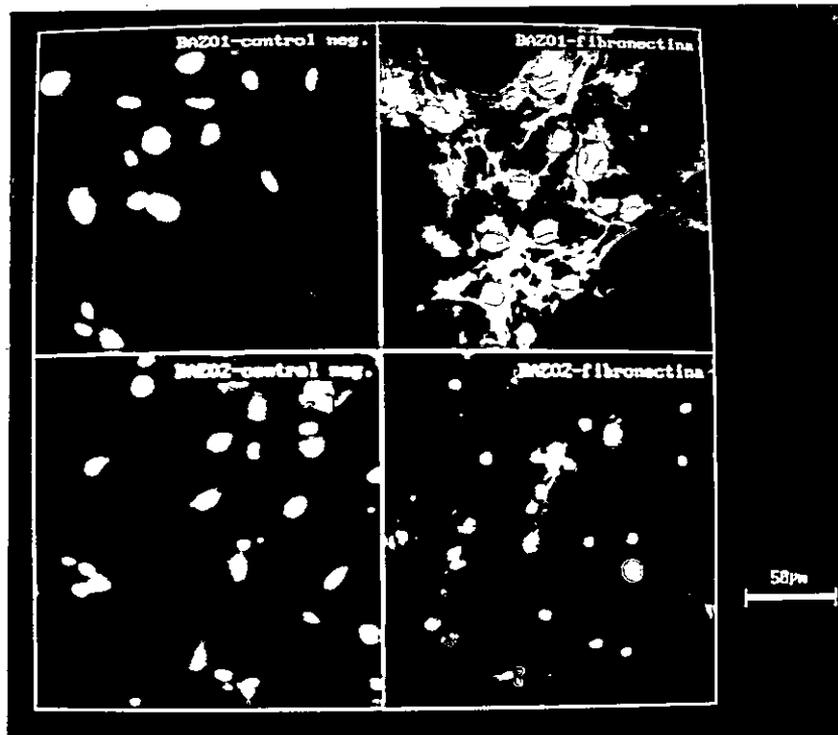
En la figura se muestra la superposición de imágenes de cortes ópticos. Las imágenes emitidas por el yoduro de propidio (rojo) y las emitidas por el FITC (verde) fueron procesadas independientemente y luego superpuestas.



**Figura 18. DETECCIÓN DE COLAGENOS EN CELULAS ENDOTELIALES DE AMIGDALA HUMANA (AMG)**

Células AMG1 cultivadas sobre cubreobjetos fueron fijadas en metanol 100% a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 20 min., lavadas e incubadas por 30 min. en medio solo (control negativo) o en medio conteniendo los anticuerpos policlonales dirigidos a colágeno I, III o IV; seguido de 30 min. de incubación con el fragmento  $\text{F(ab')}_2$  del anticuerpo secundario conjugado con FITC, anti-Ig de conejo desarrollado en cabra. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (ver materiales y métodos).

En la figura se muestra la superposición de imágenes de cortes ópticos. Las imágenes emitidas por el yoduro de propidio (rojo) y las emitidas por el FITC (verde) fueron procesadas independientemente y luego superpuestas.



**Figura 19. DETECCIÓN DE FIBRONECTINA EN CELULAS DE B-1 Y B-2**

Células de B-1 (bazo-1) o B-2 (bazo-2) cultivadas sobre cubreobjetos fueron fijadas en metanol 100% a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 20 min., lavadas e incubadas por 30 min. en medio solo (control negativo) o en medio conteniendo el anticuerpo policlonal dirigido a fibronectina de rata; seguido de 30 min. de incubación con el fragmento  $\text{F(ab')}_2$  del anticuerpo secundario conjugado con FITC, anti-Ig de conejo desarrollado en cabra. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (ver Materiales y Métodos). En la figura se muestra la superposición de imágenes de cortes ópticos. Las imágenes emitidas por el yoduro de propidio (rojo) y las emitidas por el FITC (verde) fueron procesadas independientemente y luego superpuestas.



**Figura 20. DETECCIÓN DE FIBRONECTINA EN CELULAS ENDOTELIALES DE AMIGDALA HUMANA (AMG)**

Células AMG1 cultivadas sobre cubreobjetos fueron incubadas en presencia de la línea RAMOS por 30 min. a 37°C. Las células no adherentes fueron retiradas mediante aspiración y dos lavados. Luego, las células fueron fijadas en metanol 100% a -20°C durante 20 min., lavadas e incubadas por 30 min. en medio solo (no mostrado) o en medio conteniendo el anticuerpo policlonal dirigido a fibronectina de rata; seguido de 30 min. de incubación con el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo secundario conjugado con FITC, anti-Ig de conejo desarrollado en cabra. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (ver materiales y métodos). Los núcleos más pequeños corresponden a las células RAMOS, se observa que RAMOS no colocaliza con fibronectina.

En la figura se muestra la superposición de imágenes de cortes ópticos. Las imágenes emitidas por el yoduro de propidio (rojo) y las emitidas por el FITC (verde) fueron procesadas independientemente y luego superpuestas.

1cm = 36 μm

## DISCUSION

Los órganos linfoides secundarios (OLS) son los sitios de diferenciación final de los linfocitos T y B a células efectoras capaces de desarrollar una respuesta inmune. Para que ocurra la diferenciación final de los linfocitos éstos deben migrar a los OLS y posicionarse en regiones específicas dentro de éstos. La migración de los linfocitos a los distintos OLS está determinada por el microambiente particular dentro de cada órgano (Springer 1994). Los linfocitos migran a los OLS gracias a una secuencia de interacciones moleculares, la que se ha dividido en etapas. En la primera etapa los linfocitos giran sobre el endotelio mediante la interacción de la selectina-L, presente en los linfocitos, con sus ligandos, presentes en el endotelio columnar (HEV) de nódulos linfáticos y tejido linfoide asociado a mucosa. En una segunda etapa las integrinas sufren un cambio conformacional que se traduce en un aumento de la afinidad por sus ligandos (activación) y como consecuencia (tercera etapa) los linfocitos se detienen y migran a través del endotelio (Springer y col., 1994; Shimizu y col., 1992). El modelo recién descrito se apoya en estudios de adhesión a cortes congelados, estudios de recirculación *in vivo* y de migración a sitios de inflamación. Sin embargo, el desarrollo de modelos *in vitro* con células en cultivo es escaso e incluye a HEV de nódulos linfáticos de rata (Ager, 1987; Szekanec y col., 1992; Tamatani y col., 1991) y células de cordón umbilical humano (Elices y col., 1990; Vonderheide & Springer, 1992). El bazo es el único OLS donde no existen las clásicas HEV, sin embargo, la entrada de los linfocitos al bazo puede ser bloqueada luego de inyección intravenosa con el polisacárido manan, arguyendo que la entrada a este órgano es selectiva (Weston & Parish, 1991). Este polisacárido es captado por células presentes en la zona marginal, el punto de entrada de los linfocitos, estas células no han sido caracterizadas aunque son capaces de interactuar con linfocitos *in situ* (Weston & Parish, 1992). Luego de migrar a los distintos OLS los linfocitos se posicionan en regiones particulares e interactúan con

células estromales específicas. Las moléculas de adhesión y señales involucradas en estas interacciones prácticamente son desconocidas.

En búsqueda de modelos adecuados para estudiar los mecanismos de adhesión utilizados por los linfocitos para entrar y posteriormente diferenciarse en los OLS hemos desarrollado dos sistemas de estudio *in vitro*; un sistema de cultivo de células estromales de bazo de ratón y un sistema de cultivo de células estromales de amígdala humana.

#### **A) Sistema murino**

Nuestro sistema *in vitro* de células estromales lo hemos usado para estudiar la interacción entre los linfocitos y las células estromales. Además del ensayo homólogo murino, hemos usado un ensayo de adhesión heterólogo como modelo para estudiar las moléculas de adhesión implicadas en la adhesión de linfocitos humanos a estromas de bazo. Un alto grado de conservación se ha descrito para la especificidad funcional de las interacciones moleculares mediadas por moléculas de adhesión. Por ejemplo, Szekanecz y colaboradores (1992) estudiando los receptores involucrados en la adhesión y trans migración de linfocitos a través de HEV en cultivo, mostraron que las propiedades básicas de la interacción homóloga se mantienen al utilizar linfocitos humanos. Además, la especificidad de adhesión de diferentes subtipos de linfocitos por HEV, en cortes congelados de diferentes OLS, es semejante en interacciones homólogas y heterólogas entre ratón, cobayo y humano (Wu y col., 1988). Así también, las propiedades cinéticas de recirculación y la distribución de linfocitos, radioactivamente marcados, es conservada entre especies altamente divergentes (Binns & Licence, 1990). Por lo anterior, se piensa que los cambios evolutivos entre las moléculas de adhesión de distintas especies sólo han afectado dominios proteicos no funcionalmente críticos. Por lo tanto, en circunstancias de la dificultad para obtener bazo humano, nuestro modelo heterólogo de adhesión es válido. Es posible que no todas las interacciones adhesivas sean conservadas entre murino y humano, por lo que el estudio del sistema homólogo servirá en la confirmación de los resultados.

Bajo condiciones de cultivo adecuadas las células adherentes obtenidas de bazo de ratón fueron mantenidas como cultivos primarios y usadas

directamente para medir la adhesividad de células linfoides. Sin embargo, no todos los lotes de sueros fetales probados fueron efectivos en permitir que los cultivos de bazo crecieran satisfactoriamente o llegaran a confluencia. En efecto, algunos de los sueros probados fueron rechazados (resultado no mostrado). Además, los cultivos primarios de células adherentes de bazo no pueden ser subcultivados completamente y fueron usados directamente para los ensayos de adhesión. Esto no es una limitación, puesto que una placa de 24 pozos puede ser preparada a partir de dos bazos y utilizada para ensayos de adhesión dentro de una a dos semanas. Cuando los cultivos confluentes de células estromales fueron tratados enzimáticamente para liberar las células adherentes, algunas de las células se separaron pudiendo ser mantenidas en cultivo. Tales cultivos, B-1 y B-2, han sido mantenidos por más de 20 pasajes sin notar ningún cambio fenotípico. El análisis microscópico y de citometría de flujo indicó que los estromas B-1 están compuestos de un tipo celular con un fenotipo antigénico único. Estudios de FACS de las células de B-1 demuestran que ellas son negativas para marcadores de macrófagos/monocitos, de IDC y FDC. La molécula ICAM-1, común a las células endoteliales y a células presentadoras de antígeno (Bevilacqua, 1993; Springer, 1994) no fue detectada sobre las células de B-1. Por otra parte, 100% de las células de B-1 expresan en una forma constitutiva las moléculas VCAM-1 y CD44, dos moléculas descritas en células que forman el estroma de la médula ósea y parecen tener un rol crítico en la maduración de los linfocitos B, puesto que participan en la interacción de células pre-B con células estromales de médula ósea (Miyake y col. 1991). Este fenotipo no se ajusta a ningún tipo celular descrito. Sin embargo, aunque el fenotipo de las células reticulares que forman la malla donde se alojan otras células estromales no está bien definido, nosotros proponemos que las células de B-1 descritas aquí representen algún tipo de célula reticular. Datos de la literatura indican que las células reticulares del bazo presentan heterogeneidad *in situ* (McNagny y col., 1991; Yoshida y col., 1991). Una mayor caracterización de estas células espera el desarrollo de reactivos inmunológicos para su identificación *in situ*.

Otra línea celular, B-2, aislada después de tratamiento de los estromas primarios con tripsina, contiene al menos dos tipos de células estromales diferentes; células mayoritarias adherentes y elongadas que crecen adheridas

a la placa de cultivo y un segundo tipo de células redondeadas que crecen sobre las primeras. Luego de tinción con esterasa no específica, sólo éstas últimas mostraron tinción positiva, aunque débil (no mostrado). El análisis en el FACS indicó que ambos tipos expresan las moléculas VCAM-1 y CD44 y no pueden ser distinguidas por tamaño y granulosidad (dispersión de la luz) pero, sí se pueden diferenciar por expresión de la molécula CD11b. También, una fracción de las células fue capaz de unir Ig normal de rata, indicando la presencia de receptores Fc. A pesar que es difícil distinguir poblaciones por diferencia de tamaño, las células positivas para CD11b y receptores Fc poseían un tamaño levemente inferior a las células negativas (no mostrado). Lo anterior sugiere la presencia de una población de células esterasa no específica débil, las que expresan las moléculas CD11b y receptores Fc, además de las moléculas VCAM-1 y CD44, también presentes en la otra subpoblación de células adherentes esterasa negativa. Al parecer, en estos cultivos las células elongadas que sostendrían el desarrollo en el cultivo de las células esterasa no específica positivas podrían representar células reticulares. Las células positivas para la tinción de esterasa no específica y para las moléculas VCAM-1, CD44, CD11b y receptores Fc podría representar algún tipo de macrófago. Cabe hacer notar que la presencia de VCAM-1 ha sido descrita en células endoteliales estimuladas por citoquinas (Bevilacqua, 1993), en células estromales de médula ósea (Miyake y col. 1991), en FDC (Koopman y col., 1991) y en ciertos macrófagos del bazo (citado en Paul, 1993). Se ha descrito que la población de macrófagos que presentan el marcador Ser-4 (reconoce a sialoadhesina) no presentan el marcador F4/80, no presentan MHC II, y se ubican en la zona marginal del bazo. Además en estudios de adhesión utilizando cortes congelados de bazo murino se ha demostrado que tanto los linfocitos B como los T unen a los macrófagos de la zona marginal mediante el reconocimiento de sialoadhesina (Timo y col., 1992). Será interesante determinar la presencia de sialoadhesina en las células de B-2 que son CD11b<sup>+</sup>.

i Células linfoides de ratón y humano adhieren a cultivos de estromas completos, así como también a los estromas B-1 y B-2. En el caso de ratón usamos células mononucleadas de bazo antes o después de enriquecimiento en linfocitos T o B. El porcentaje de monocitos en las células mononucleadas se

evaluó por citometría con el anticuerpo anti-CD11b o el marcador F4/80 detectándose un 8-10% de células positivas. Los protocolos para purificar linfocitos T de B, y viceversa, fueron altamente efectivos en eliminar uno u otro tipo de linfocito. Sin embargo, en estas poblaciones los monocitos corresponden a un 15% de las células (CD11b<sup>+</sup>). Las células CD11b<sup>+</sup> no fueron eliminadas por adherencia durante 1 día, pero las células que adhieren a los estromas de bazo fueron muy pequeñas para corresponder a monocitos (no mostrado). Casi el 30% de las células mononucleares y linfocitos B adhieren a los estromas, a diferencia de sólo el 15% de los linfocitos T. Por otra parte, los linfocitos B presentan una adhesión preferencial a los estromas de B-2 (35%) comparado con B-1 (17%) y con bazo completo (25%). La adhesión de los linfocitos T a los estromas completos, pero no a B-1 y B-2, aumentó por activación con ConA, mientras que la activación de las células B con LPS no cambió la proporción de células adherentes. El aumento de adhesión luego de activación de los linfocitos T con ConA a los estromas completos, pero no a B-1 y B-2, sugiere la presencia de células únicas en los estromas completos. El aumento de adhesión de las células T puede representar un mecanismo fisiológico efectivo para atrapar clones de células T específicamente activados por antígeno en la periferia o en el bazo. Dado que, el pretratamiento de los linfocitos T con ConA por 48 horas no cambió el porcentaje de adhesión a los estromas completos y que a las cuatro horas produjo un aumento al doble en la adhesión a los mismos, comparado con el aumento al triple obtenido a las 24 horas, pensamos que el aumento en la adhesión es el resultado de que ConA indujo cambios en la expresión y afinidad de receptores de adhesión y que este aumento no es debido a un efecto mediador de la unión entre moléculas presentes en el linfocito y la célula estromal. Una cinética de adhesión semejante fue reportada por Male y colaboradores (1994) quienes demostraron que ConA inducía la expresión de VLA-4 y LFA-1, las integrinas que mediaban la adhesión en ese sistema. El que los linfocitos T estimulados con ConA por 48 horas o más, no tengan una mayor adhesividad que los linfocitos no activados, tanto en el trabajo de Male y colaboradores (1994), como en el nuestro, podría reflejar disminución en la afinidad de las integrinas por sus ligandos o disminución en la expresión. ConA es capaz de inducir muchas de las señales de transducción iniciadas luego de entrecruzamiento de

x

u

p

||

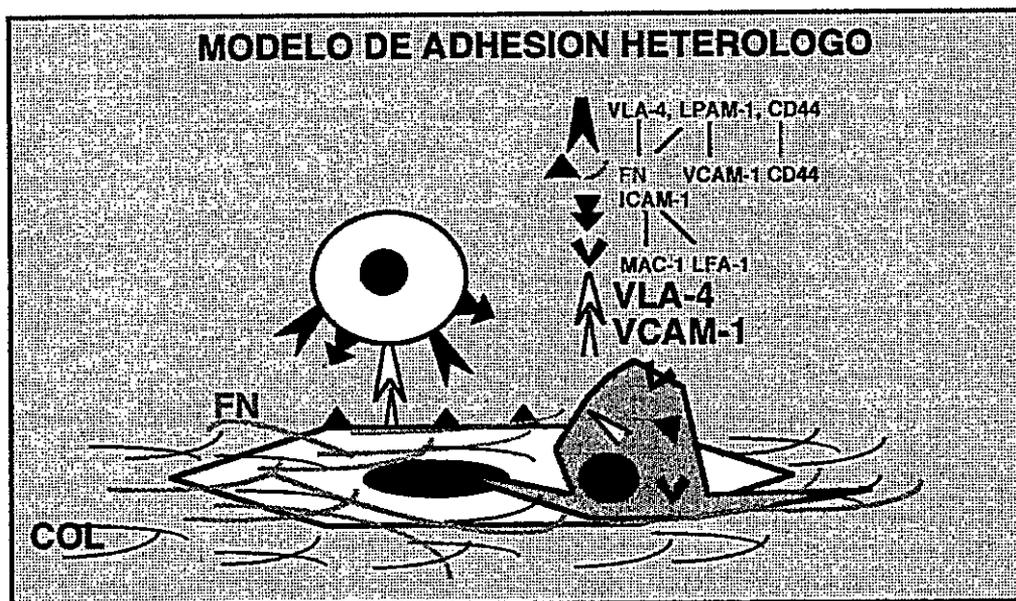
l.

receptores antigénicos por anticuerpos anti-TCR y por antígeno-MHC, por lo que los cambios adhesivos inducidos por la lectina ConA probablemente son el resultado de su unión al receptor de las células T (Paul, 1993). LPS podría inducir cambios en la afinidad y en la expresión de moléculas de adhesión mediante entrecruzamiento de los receptores antigénicos de las células B, puesto que también se han descrito cambios en las propiedades cualitativas y cuantitativas en las moléculas de adhesión luego de activación de las células B (Paul, 1993). La proteína quinasa C es activada luego de estímulo antigénico, tanto en los linfocitos T como en los B, por lo que la activación de esta proteína con el ester de forbol PMA imitaría algunas de las señales inducidas por antígeno y otros estímulos, tanto en los linfocitos como en los monocitos de la fracción mononuclear de bazo. Se ha descrito que los linfocitos humanos, obtenidos de sangre periférica pueden aumentar la afinidad de los receptores de la subfamilia  $\beta_1$  y  $\beta_2$  de las integrinas, luego de tratamiento con PMA por 10 minutos. En nuestro trabajo no se detectó cambios en el porcentaje de adhesión de los linfocitos a los estromas B-1 y B-2, luego de tratamiento por 10 minutos con PMA, probablemente reflejando la influencia de otros tipos celulares o la necesidad de activación de otras rutas de transducción. El mecanismo que permite un aumento en la afinidad de las integrinas por sus ligandos es desconocido, pero probablemente involucra cambios en el citoesqueleto y proteínas asociadas (Hynes, 1992).

Para examinar el rol de los receptores de adhesión en nuestro modelo de bazo investigamos el efecto de anticuerpos contra varios receptores de adhesión. Sólo los anticuerpos dirigidos a la cadena  $\alpha_4$  de VLA-4 y su ligando VCAM-1 consistentemente bloquearon la adhesión de las líneas humanas. Cabe mencionar que, al menos en la línea RAMOS, no se ha detectado a la integrina  $\alpha_4\beta_7$ , por lo que la inhibición con anti- $\alpha_4$  indica bloqueo de la función de VLA-4 en esta línea celular (Elices y col., 1990). La unión de DAUDI a las células de B-1 y B-2 fue bloqueada por anticuerpos a VCAM-1 y  $\alpha_4$ . Sin embargo, la adhesión de DAUDI a los estromas completos fue bloqueada sólo por el anti-VCAM-1 (murino), pero no por el anticuerpo anti- $\alpha_4$  o  $\beta_1$  (humano). Lo anterior sugiere que otras rutas de adhesión, además de VLA-4/VCAM-1, pueden estar participando. Por esta razón, una comprensión detallada de las interacciones con las células estromales de bazo, como también la

consecuencia de éstas en la diferenciación, requiere de mayor investigación. En la figura 21 se muestra un esquema de las probables interacciones involucradas en nuestro modelo heterólogo de adhesión tomando como modelo el sistema Daudi / Bazo-2. En este esquema se considerarán a las moléculas de adhesión y elementos de la matriz extracelular detectados por citometría de flujo. El encuentro de la interacción de las moléculas VLA-4 humana con VCAM-1 murina se resalta por sobre otras interacciones exclusivamente debido a la demostración de la interacción en este trabajo. La presencia de fibronectina en los cultivos de B-2 (B-1 y probablemente B-C) sugiere su participación en la adhesión de las líneas humanas. En relación al sistema homólogo fibronectina probablemente estaría involucrada en la adhesión de los linfocitos activados puesto que se ha descrito que en bazos de ratones normales el porcentaje de linfocitos que unen fibronectina es del orden del 2% (Ferguson & Kupper, 1993). Lo anterior se piensa que está relacionado principalmente a que las integrinas que reconocen fibronectina en la mayoría de los linfocitos del bazo son funcionalmente inactivas. La presencia de colágeno en estos cultivos podría permitir la interacción de las integrinas que unen colágeno en los linfocitos (VLA-1, VLA-2,  $\alpha_v\beta_3$ ). Sin embargo, no se detectó en los ensayos de adhesión unión de células a sitios de la placa donde no hay estroma y si colágeno. Además se requiere de activación de los linfocitos por 1 a varias semanas para la expresión de estos receptores (Hemler y col., 1987 a y b; Springer, 1990). La presencia de receptores para colágeno en las líneas linfoides DAUDI o RAMOS y MOLT-4 respectivamente no ha sido descrito o no se encuentran (Elices y col., 1990; Hemler y col., 1987 a y b). Interacciones que podrían colaborar en la adhesión de la línea DAUDI, MOLT-4 o de linfocitos a los estromas sería la integrina LPAM-1 ( $\alpha_4\beta_7$ ), que se ha descrito puede interactuar con VCAM-1 (Rüegg y col., 1992), una molécula presente en el estroma de B-2 (y B-1). La molécula ICAM-1 presente en los linfocitos murinos y líneas linfoides humanas probablemente participa en la interacción con las integrinas de la subfamilia  $\beta_2$ , presentes en la subpoblación esterasa no específica positiva. Si bien en la mayoría de los casos los experimentos mostraron ser reproducibles, al determinar el efecto de los anticuerpos anti- $\beta_2$ , anti-ICAM-1 y anti-CD44 (figura 10) se encontró en un experimento bloqueó pero en otro no, por lo que éstos así como otros

experimentos con un n=1 debieran ser repetidos. El proteoglicán integral de membrana CD44, podría colaborar en la adhesión de los linfocitos y líneas linfoides por reconocimiento de ácido hialurónico (Aruffo y col., 1990; Miyake y col., 1990).



**FIGURA 21. Modelo de adhesión heterólogo en cultivo.**

El esquema se basa en la interacción DAUDI / B-2. En el cultivo B-2 existen dos poblaciones de células adherentes, células extendidas probablemente del tipo reticular (VCAM-1<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>) y células redondeadas con tinción para esterasa no específica positiva, probablemente macrófagos (VCAM-1<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, MAC-1<sup>+</sup>). Las células redondeadas podrían corresponder a macrófagos de la zona marginal (ver texto). Las moléculas de la matriz extracelular presentes en el cultivo son fibronectina (FN) y colágeno tipos I y III (COL). La molécula de adhesión VLA-4 presente en la línea linfóide humana DAUDI interactuaría con la molécula VCAM-1 presente en el estroma murino. Otras moléculas, probablemente presentes en la línea linfóide, como LPAM-1 ( $\alpha_4\beta_7$ ) y CD44 podrían colaborar en la adhesión por reconocimiento de VCAM-1 y ácido hialurónico respectivamente. VLA-4 y LPAM-1 también podrían unir a FN presente en B-2. La molécula ICAM-1 presente en DAUDI podría interactuar con MAC-1 y LFA-1 (probablemente presente en células tipo macrófagos).

Considerando la posibilidad de que células de los estromas completos, de B-1 y B-2 pudieran ser importantes en la entrada de los linfocitos al bazo, sería interesante determinar si estas células estromales de bazo presentan

sialoadhesina, si unen al polisacárido manan *in vitro* y si éstos bloquean la unión de los linfocitos.

En todos los OLS los linfocitos T interactúan con IDC, mientras que las células B se distribuyen principalmente en los centros germinales en contacto con FDC, macrófagos y linfocitos T de ayuda. Todas estas células se encuentran dentro de una malla formada principalmente por células reticulares. Hay evidencia que las células reticulares pueden fagocitar material extraño y llegar a ser macrófagos libres (citado en Krstic, 1991). También se ha sugerido que las células reticulares pueden ser precursores de las FDC en el bazo (Yoshida y col., 1991) y que interactúan con linfocitos *in situ* (McNagny y col., 1991; Yoshida y col., 1991; Krstic, 1991). Sin embargo, un rol directo de las células reticulares en la diferenciación de los linfocitos no ha sido sugerido. Las células dendríticas interdigitantes y foliculares se encuentran en bajos porcentajes y para realizar estudios con ellas se requiere de su purificación. La baja sobrevivencia y su carácter no adherente en cultivo ha dificultado su estudio en el proceso de diferenciación de los linfocitos. Sin embargo, Koopman y colaboradores (1994) sugirieron que la interacción de los linfocitos B mediante el par VLA-4/VCAM-1 jugaría un importante rol en la selección de los linfocitos B impidiendo la muerte apoptótica de estas células. La interacción mediada por el par VLA-4/VCAM-1 también se ha mostrado que es importante en la diferenciación muscular (Dean y col., 1993) y en la diferenciación de células pre-B, la que ocurre en interacción con células estromales, VCAM-1<sup>+</sup>, en los cultivos de largo término de médula ósea (Miyake y col., 1991). Aquí se describe la expresión constitutiva de VCAM-1<sup>+</sup> en las células de B-1 y B-2 y que esta molécula media la interacción de las líneas linfoides humanas mediante el par VLA-4 /VCAM-1<sup>+</sup>, por lo que investigar el rol de esta interacción nos parece interesante.

### Conclusiones y perspectivas:

Las células estromales de bazo murino, presentes tanto en los cultivos primarios como en los subcultivos B-1 y B-2, son un modelo útil para investigar la interacción de linfocitos murinos y humanos.

§

¶

|||

∟

≡

⋮

La molécula VCAM-1, presente en las células estromales de bazo, participa en la interacción de las líneas linfoides humanas con los estromas de bazo. El receptor involucrado en la adhesión de RAMOS a B-2 corresponde a VLA-4.

Los resultados de citometría de flujo indican que las células de B-1, y una subpoblación de B-2, podrían corresponder a células reticulares. La subpoblación de B-2 esterasa no específica positiva podría corresponder a macrófagos de la zona marginal, los que participarían en la entrada de los linfocitos al bazo. La confirmación de este fenotipo espera el desarrollo de reactivos inmunológicos específicos.

La identificación *in situ* de los tipos celulares VCAM-1<sup>+</sup> en bazo, será de gran ayuda para establecer el fenotipo de las células de B-1 y B-2.

## **B) Sistema humano**

La población homogénea de células adherentes aislada de amígdalas humanas tiene varias propiedades de células endoteliales. A diferencia de las HUVEC, el modelo de célula endotelial comúnmente utilizado, estas células no muestran el requerimiento en su cultivo de la adición de factores adicionales al suero, como son suplementos de crecimiento y elementos de la matriz extracelular (Roseblatt y col., 1991). Estas células han sido cultivadas por largos períodos de tiempo y se han utilizado para estudiar sus propiedades adhesivas.

Aquí se describe por primera vez el cultivo de células endoteliales de vénula de amígdalas humanas. Debemos decir que las células descritas por Clark y colaboradores (1992) como FDC en cultivo tienen las mismas características que las células AMG, la presencia del factor de von Willebrand no se investigó en las células descritas por Clark, lo que habría servido para su identificación. La presencia del factor intracelular de von Willebrand es el marcador más confiable de la presencia de células endoteliales en cultivo (Hoyer y col., 1973). El análisis por citometría de flujo claramente mostró la

presencia del factor de von Willebrand en un 100% de las células y a niveles comparables a las HUVEC. LVAP2 una molécula reportada en HUVEC, en vénulas de cortes de amígdala humana y otros tejidos (Airas y col, 1993), fue detectada en un 100% de las células AMG a niveles superiores a los detectados en HUVEC, ratificando su identificación como células endoteliales de vénula. La identificación como células endoteliales es compatible con la presencia de CD40, una molécula ausente en fibroblastos y macrófagos (Clark y col., 1992), y con la ausencia de marcadores para células del tipo monocito/macrófagos, IDC y FDC.

Ha sido descrito previamente que la digestión con colagenasa de nódulos linfáticos de ratas en cultivo resulta en una población de células adherentes. Estas células fueron identificadas como células del tipo HEV mediante la incorporación *in vivo* de  $^{35}\text{SO}_4$  dentro de complejos lipo-glicoproteicos (Ager, 1987), una aproximación que no puede ser utilizada para la identificación de HEV en humanos. En humanos la presencia de la molécula VAP-1 se ha detectado en HEV *in situ*, sin embargo, su presencia no es obligada de HEV (Salmi y col., 1993). Existe evidencia que el fenotipo de HEV se desarrolla *in vivo* sólo en animales expuestos a antígeno y con linfocitos T funcionales (Abbas y col. 1994; Springer, 1994). En animales recién nacidos cuando aún no se ha desarrollado el fenotipo de HEV los linfocitos se dirigen de forma preferente a los nódulos linfáticos, sugiriendo que el endotelio de vénulas de los OLS puede poseer una adhesividad mayor que otros endotelios por los linfocitos vírgenes (Abbas y col., 1994).

Como ha sido descrito por otros (Clark y col., 1992) las células mononucleares originales aisladas desde amígdalas humanas son principalmente linfocitos, un resultado confirmado por nuestro análisis de citometría de flujo en nuestras preparaciones de amígdalas. Después de una semana de cultivo una monocapa de células pudo ser observada. Estas células adherentes contenían linfocitos adheridos a su superficie tanto apical como basal (observaciones no mostradas). Los linfocitos adherentes pierden su capacidad de adherir y migrar por debajo de estas células, puesto que a las tres semanas pueden ser completamente removidos por simple pipeteo. Por otra parte, linfocitos aislados de las amígdalas adhieren a las células AMG por

sobre un 20 %. Estudios de trans migración podrían ser realizados con estas células en tiempos aproximados de 2 horas (Szekanecs y col., 1992).

Con el fin de caracterizar más a las células AMG y determinar si ellas retienen sus características en cultivo se realizaron estudios adicionales de citometría. Para esto, se utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos a moléculas de adhesión presentes en células endoteliales, entre otras, como son las moléculas ICAM-1 y VCAM-1. Una fracción de las células expresa ICAM-1 y una fracción más pequeña VCAM-1. Ambas moléculas han sido implicadas en la adhesión y trans migración de los linfocitos a través de las células endoteliales (Shimizu y col, 1992; Springer, 1994). Tal como ha sido descrito, la expresión de estas moléculas pudo ser inducida por IFN- $\gamma$ . Aunque la expresión constitutiva e inducible de ICAM-1 permaneció inalterada durante el tiempo de cultivo, el número de células con expresión constitutiva de VCAM-1 disminuyó en los últimos pasajes, llegando a niveles casi indetectables en el décimo subcultivo. La inductibilidad de VCAM-1 por IFN- $\gamma$  también disminuyó proporcionalmente.

Dado que se conoce poco respecto de las bases moleculares de la migración de los linfocitos dentro de los OLS se investigó a las moléculas de adhesión involucradas en las interacciones linfocitos-AMG. Exploramos la adhesión de tres líneas linfoides humanas (RAMOS, DAUDI y MOLT-4) y de linfocitos de amígdalas. Los porcentajes de adhesión (20-60 % dependiendo de la célula linfoide) validan este sistema como un modelo para estudiar la adhesión. Nuestros datos experimentales nos entregan resultados interesantes: primeramente, el sistema de adhesión de RAMOS y DAUDI apoya la idea que las células AMG de los últimos pasajes no estimuladas, que carecen de VCAM-1, unen células a través de la integrina VLA-4. La adhesión de RAMOS fue casi completamente bloqueada por anticuerpos contra esta integrina. Esta línea celular no expresa las integrinas  $\beta_2$ , VLA-5 y tampoco  $\alpha_4\beta_7$ . Como ha sido mostrado por Vonderheide y Springer (1992), la adhesión de RAMOS a HUVEC no estimuladas (7-10 %) no es mediada por la integrina VLA-4 puesto que el anticuerpo anti- $\alpha_4$  (HP2/1) no bloqueó la adhesión de RAMOS. En cambio, la estimulación de HUVEC con TNF- $\alpha$  induce la expresión de VCAM-1 y permite la adhesión de RAMOS mediante VLA-4

(80%). En el trabajo de Vonderheide & Springer (1992) se determinó que los anticuerpos HP2/1 y 4B9 bloquean con la misma afinidad la unión de la línea RAMOS a VCAM-1 inmovilizado, pero no bloquean en la misma proporción la adhesión de RAMOS a HUVEC estimuladas, sugiriendo la presencia de un ligando alternativo de VLA-4, distinto de VCAM-1 y de fibronectina. Fibronectina esta presente en la superficie de las células AMG, pero su participación en la adhesión de RAMOS se descartó debido a la ausencia de un efecto inhibitor de los anticuerpos anti-fibronectina humana y de bovino.

Nuestros resultados sugieren de forma contundente la presencia de un tercer ligando para VLA-4 presente, esta vez, en células endoteliales no estimuladas. Si se considera que los linfocitos deben migrar a través del endotelio en los órganos linfoides secundarios en ausencia de inflamación, la presencia de un ligando de VLA-4 en AMG no estimuladas hace a las células AMG un excelente sistema para identificar este supuesto contrareceptor. Los resultados de adhesión de la línea DAUDI a AMG (30-40% de adhesión) fortalece la validez de este modelo de célula endotelial y apoya la idea de la presencia de un ligando de VLA-4 distinto de VCAM-1 y fibronectina. Las integrinas  $\beta_2$  cuya participación en la interacción con el endotelio ha sido descrita (Bevilacqua, 1993), también participan en la adhesión de DAUDI a AMG. La línea MOLT-4 adhiere en un porcentaje significativamente superior (50-70%) a las células AMG probablemente debido a la presencia, en estas células, de la integrina VLA-5 además de VLA-4.

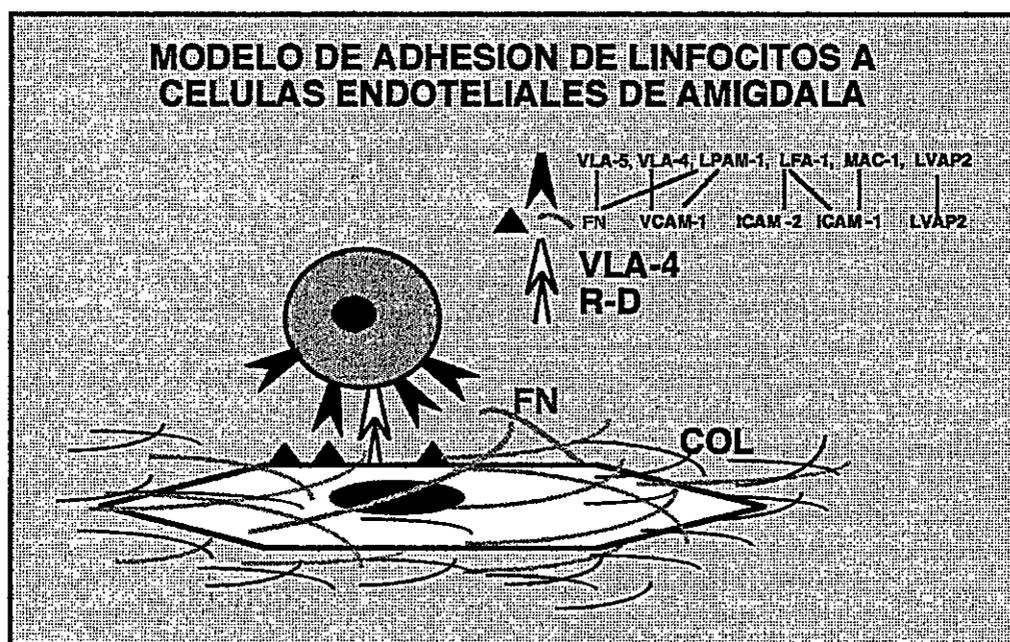
Los experimentos de adhesión de linfocitos de amígdala a las células AMG muestran que estos linfocitos se adhieren probablemente a través de una combinación de receptores, puesto que ninguno de los anticuerpos utilizados tuvo un efecto inhibitorio significativo en la adhesión. Lo anterior, podría estar relacionado a la presencia de subpoblaciones de linfocitos que posean distinto nivel de expresión y estado funcional de sus moléculas adhesivas. No se puede descartar la posibilidad que moléculas de adhesión aún no identificadas puedan estar operando en este caso.

Para investigar la posible participación de elementos de la matriz extracelular en la adhesión, se investigó la presencia de fibronectina,

colágenos (I,III y IV) y laminina (no mostrado). En las células AMG se detectó fibronectina y colágenos tipo I y III. Sin embargo, no se encontró laminina y la tinción para colágeno tipo IV fue débil. En cultivo, las células HUVEC sintetizan además de fibronectina y colágenos tipo I y III, laminina y colágeno tipo IV (Tannenbaum y col., 1989; Timpl & Dziadecek, 1986). Es probable que las condiciones de cultivo de las células AMG fueran insuficientes para la síntesis y deposición de estos elementos en la MEC. Por otra parte, la matriz de fibronectina asociada a la superficie de las células AMG, no colocalizó con células RAMOS adheridas a ellas descartando la participación de fibronectina y apoyando la idea de un ligando de VLA-4 distinto de VCAM-1 y fibronectina. Cabe mencionar que recientemente se ha descrito que trombospondina, un elemento de la MEC sintetizada por las células endoteliales, actuaría como un ligando de VLA-4 (Timpl & Dziadeck, 1986; Yabkowitz y col., 1993).

En el esquema de la figura 22, se describen las interacciones adhesivas probables entre los linfocitos y las células endoteliales de amígdala (AMG) no estimuladas. Se considera a las moléculas de adhesión presentes en los linfocitos, y a las moléculas de adhesión o de la MEC detectadas por citometría de flujo en los cultivos de AMG. La interacción de VLA-4 con un ligando desconocido (R-D) se destaca por sobre otras interacciones, puesto que en la adhesión via VLA-4 no se encontró efecto bloqueador de los anticuerpos anti-fibronectina o anti-VCAM-1 utilizados. Sin embargo, la presencia de fibronectina en la superficie de las células y la presencia de la integrina VLA-5 en los linfocitos de sangre periférica (Skekanecz y col., 1992), en los linfocitos de amígdala (tabla VII) y en la línea MOLT-4 (Kovach y col., 1992) sugiere su participación. Si bien, se ha descrito que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> unen a TSP purificada, esto ocurre mediante el reconocimiento simultáneo de las integrinas VLA-4 y VLA-5, y sólo en linfocitos activados (Yabkowitz y col., 1993). Por lo tanto, pensamos que TSP no sería el ligando reconocido por VLA-4 en este sistema. La participación de la molécula LVAP2 en la adhesión de linfocitos de sangre periférica a HUVEC no estimuladas ha sido descrita (Airas y col., 1993). Sin embargo, al evaluar la participación de LVAP2, presente en AMG, en la adhesión de DAUDI no se detectó efecto (un experimento). La participación de esta molécula espera ser evaluada con más

experimentos y utilizando linfocitos de sangre periférica. Las moléculas LFA-1 y MAC-1, presentes en las líneas DAUDI, MOLT-4 y en los linfocitos de amígdala, colaborarían en la interacción con AMG. Como ya ha sido comentado, la participación de colágeno en la adhesión a AMG sólo ocurriría en el caso de linfocitos activados por varias semanas (Hemler y col., 1987 a y b).



**Figura 22. Modelo de adhesión en cultivo de linfocitos a células endoteliales de amígdala.**

En el esquema se destaca la participación de un ligando de VLA-4 desconocido (R-D). El ligando R-D sería el principal ligando de VLA-4 reconocido en el sistema *in vitro*. Este ligando es diferente de VCAM-1 y de Fibronectina (FN). La integrina LPAM-1 ( $\alpha_4\beta_7$ ) podría colaborar con VLA-4 y VLA-5 en el reconocimiento de fibronectina, un elemento de la MEC presente en el cultivo. LFA-1, la principal integrina  $\beta_2$  presente en los linfocitos, reconocería a ICAM-1 e ICAM-2 presentes en las células endoteliales. Mac-1 también colaboraría en la interacción de los linfocitos con ICAM-1, presente en el endotelio. La molécula LVAP2 podría colaborar en la adhesión por reconocimiento homotípico. La molécula VCAM-1 presente en los primeros pasajes de AMG, podría colaborar en la adhesión, pero su contribución sería mínima respecto de R-D. Colágenos (COL) tipos I y III fueron detectados en el cultivo y podrían participar en la interacción de linfocitos activados.

## Conclusiones y perspectivas

Se ha logrado por primera vez aislar células endoteliales de órganos linfoides secundarios humanos.

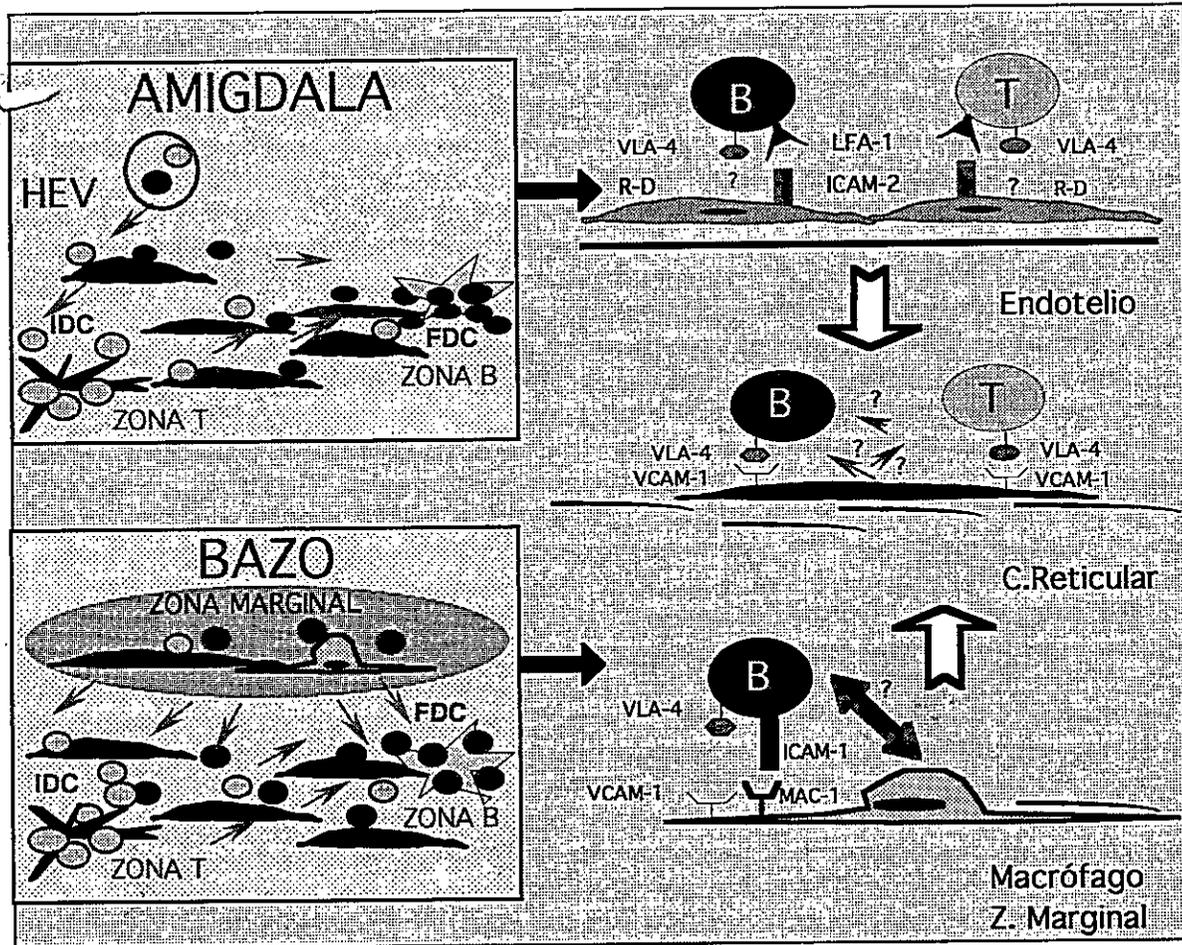
Las células endoteliales de amígdala humana (AMG) probablemente representan células de vénula debido a la expresión de la molécula LVAP2.

A diferencia de HUVEC, el modelo común de célula endotelial utilizado, estas células no requieren factores adicionales al suero para su cultivo.

Las células AMG no requieren de activación con citoquinas para mediar adhesión dependiente de la integrina VLA-4. Esto sugiere que las células AMG mantienen, *in vitro*, un estado adhesivo que sería característico de células endoteliales de vénula de órganos linfoides secundarios. Será interesante estudiar la adhesión de linfocitos vírgenes obtenidos de sangre periférica humana.

Un ligando de VLA-4 distinto de VCAM-1 y de fibronectina participa en la interacción de las líneas linfoides con AMG. La producción de anticuerpos monoclonales contra las células AMG, servirá para la identificación del ligando de VLA-4 en estas células.

En la figura 23 se describe un modelo que describe algunas de las interacciones *in vivo* que los linfocitos establecerían con el microambiente de los dos OLS utilizados como modelo de estudio.



**FIGURA 23. Modelo de interacción de linfocitos en amígdala y bazo**

La entrada de los linfocitos B y T a las amígdalas es selectiva e involucra interacciones con el endotelio de las vénulas postcapilares (HEV). El encuentro que la integrina VLA-4, presente en la línea RAMOS, reconoce un ligando diferente de VCAM-1 y de fibronectina, sugiere que la integrina reconocería un ligando desconocido (R-D) presente en el endotelio en condiciones basales (de no estimulación), y por lo tanto mediaría la recirculación en ausencia de estímulo inflamatorio. La molécula ICAM-2, presente de forma constitutiva y no inducible en el endotelio, contribuiría al mecanismo de reconocimiento. Las moléculas VCAM-1, ICAM-1 y LVAP2 serían inducidas en inflamación contribuyendo efectivamente al proceso de transvasación (no mostrado). Por otra parte, la entrada de los linfocitos al bazo involucraría el reconocimiento de moléculas de adhesión presentes en células de la zona marginal. En esta zona se ha descrito la presencia de macrófagos que reconocen moléculas ricas en ácido siálico mediante sialoadhesina detectada por el anticuerpo monoclonal Ser-4 (Timo y col., 1992). Nosotros sugerimos que las células esterasa positiva, presentes en B-2, podrían corresponder a macrófagos SER-4<sup>+</sup>, y que éstos participarían en interacciones adhesivas de reconocimiento principalmente de linfocitos B. Además de sialoadhesina las moléculas VCAM-1 y MAC-1 participarían mediante el reconocimiento de VLA-4 y de ICAM-1 presentes en los linfocitos. Células reticulares presentes en la zona marginal cooperarían en el reconocimiento de los linfocitos T. Mecanismos que implican activación de las integrinas para unión de sus ligandos deberían estar implicados. Luego que los linfocitos migran a través del endotelio (en amígdalas) y la zona marginal (en bazo) interactuarían con elementos de la matriz extracelular y con las células reticulares, presentes en el estroma de todos los OLS. La interacción con estos elementos involucraría eventos de adhesión-deadhesión y de diferenciación, que permitirían la migración para la diferenciación final en asociación con las FDC e IDC.

## REFERENCIAS

Abbas A.K., Lichtman A.H., and Pober J.S. 1994. Lymphocyte specificity and activation. In Cellular and molecular immunology. Second edition by Saunders company. page: 225.

Ager A. 1987. Isolation and culture of high endothelial cells from rat lymph nodes. *J. Cell. Science* 87: 133-144.

Airas L., Salmi M., and Jalkanen S. 1993. Lymphocyte-vascular adhesion protein-2 is a novel 70-kD molecule involved in lymphocyte adhesion to vascular endothelium. *J. Immunol.* 151: 4228-4238.

Arch R., Wirth K., Hoffman M., Ponta H., Matzku S., Herrlich P., and Zöller M. 1992. Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* 257: 682-685.

Arroyo A.G., Sánchez-Mateo P., Campanero M.R., Martín-Padura I., Dejana E., and Sánchez-Madrid F. 1992. Regulation of VLA Integrin ligand interaction through the  $\beta 1$  subunit. *J. Cell Biol.* 117: 659-671.

Aruffo A., Stamenkovic, Melnick M., Underhill C.B., and Seed B. 1990. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell.* 61: 1303-1313.

Austyn J. M. and Gordon S. 1981. A monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* 11: 805-811.

Barnstable C.J., Bodner W.F., Brown G., Galfre G., Milstein C., Williams A.F., and Ziegler A. 1978. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell.* 14: 9-20.

Bevilacqua M.P. 1993. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 767-804.

Binns R.M., and Licence S.T. 1990. Exit of recirculating lymphocytes from lymph nodes in directed by specific exit signals. *Eur. J. Immunol.* 20: 449-452.

Bono M.R., Hyafil F., Koblar V., Wicls J., Wollman E., Mawas C., and Fellous M. 1978. Monoclonal antibodies against HLA-D, DRw antigens. *Transplant. Clin. Immunol.* 11: 109-117.

Bruce E., Symington F.W., McKearn T.J., and Sprent J. 1981. A monoclonal antibody discriminating between subsets of T and B cells. *J Immunol.* 127: 2496-2501.

Cabañas C., and Hogg N. 1993. Ligand intracellular molecule-1 has a necessary role in activation in integrin-lymphocyte function-associated molecule-1 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5838-

Campanero M.R., del Pozo M.A., Arroyo A.G., Sánchez-Mateo P., Hernández-Caselles T., Craig A., Pulido R., and Sánchez-Madrid F. 1993. ICAM-3 interacts with LFA-1 and regulates the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion pathway. *J. Cell. Biol.* 123: 1001-1016.

Capote M.C. 1994. Interacciones macromoleculares entre microtúbulos y filamentos intermedios en células de cultivo. Tesis de grado de Magister Mención Biología de la Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Clark E.A., Grabstein K.H., and Shu G.L. 1992. Cultured human follicular dendritic cells. *J. Immunol.* 148: 3327-3335.

Cushley W., and Harnett M.M. 1993. Cellular signalling mechanisms in B lymphocytes. *Biochem. J.* 292: 313-332.

Chan B.M.C., Elices M.J., Murphy E., and Hemler M.E. 1992. Adhesion to vascular cell adhesion molecule 1 and fibronectin. *J. Biol. Chem.* 267: 8366-8370.

Dana N., Styrt B., Griffin J.D., Todd III R.F., Klempner M.S., and Arnaout M.A. 1986. Two functional domains in the phagocyte membrane glycoprotein Mo1 identified with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 137: 3259-3263.

De Fougères A.R. and Springer T.A. 1992. Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175: 185-190.

Dean D.C., Iademarco M.F., Rosen G.D., and Sheppard A.M. 1993. The integrin  $\alpha_4\beta_1$  and its counter receptor VCAM-1 in development and immune function. *Ann. Rev. Respir. Dis.* 148: 543-546.

Dialynas D.P., Quan Z.S., Wall K.A., Pierres A., Quintans J., Loken M.R., Pierres M., and Fitch F.W. 1983. Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: similarity of L3T4 to the human Leu3/T4 molecule. *J. Immunol.* 131: 2445-2451.

Diamond M.S., Staunton D.E., Marlin S.D., and Springer T.A. 1991. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell.* 65: 961-971.

Elices M.J., Osborn L., Takada Y., Crousse C., Lühowskyj S., Hemler M.E., and Lobb R.R. 1990. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell.* 60: 577-584

Ferguson T.A., and Kupper T. 1993. Antigen-independent processes in antigen-specific immunity. *J. Immunol.* 150: 1172-1182.

Freelinger III A.L., Du X., Plow E.F., and Ginsberg M.H. 1991. Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (glycoprotein IIb-IIIa) alter receptor affinity, specificity, and function. *J. Biol. Chem.*: 266: 17106-17111.

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

Gieseler R.K.H., Röber R., Kuhn R., Weber K., Osborn M., and Peters L.H. 1991. Dendritic accessory cells derived from rat bone marrow precursors under chemically defined conditions in vitro belong to the myeloid lineage. *Eur. J. Cell. Biol.* 54: 171-181.

Guan Y., and Hynes R.O. 1990. Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor  $\alpha_4\beta_1$ . *Cell.* 60: 53-61.

Guan Y., and Shalloway D. 1992. Regulation of focal adhesion associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature.* 358: 690-692.

Hahn W.C., Burakoff S.J., and Bierer B.E. 1993. Signal transduction pathways involved in T cell receptor-induced regulation of CD2 avidity for CD58. *J. Immunol.* 150: 2607-2619.

Hemler M.E., Sanchez-Madrid F., Flotte T.J., Krensky A.M., Burakoff S.J., Bhan A.K., Springer T.A., and Strominger J.L. 1984. Glycoproteins of 210,000 and 130,000 M.W. on activated T cells: cell distribution and antigenic relation to components on resting cells and T cell lines. *J. Immunol.* 132: 3011-3018.

Hoffman R., Kung P.C., Hansen W.P., and Goldstein G. Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4914-4917.

Hogg N., Harvey J., Cabanas C., and Clive R. 1993. Control of Leuckocyte Integrin Activation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148: 555-559.

Hoyer L.W., De los Santos R.P., and Hoyer J.R. 1973. Antihemophilic factor antigen. Localization in endothelial cells by immunofluorescent microscopy. *J. Clin. Invest.* 52: 2737-2742.

Hynes R.O. 1987. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell.* 48: 549-554.

Hynes R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69: 11-25.

Julius M., Maroun C.R., and Haughn L. Distinct roles for CD4 and CD8 as co-receptors in antigen receptor signalling. *Immunol. today* 14: 177-1183.

Kappler J.W., Skidmore B., White J., and Marrack P. 1981. Antigen-inducible, H-2-restricted, interleukin-2 producing T cell hybridomas. *J. Exp. Med.* 153: 1198-1214.

Kinkade P.W., Lee G., Watanabe T., Sun L., and Scheid M.P. 1981. Antigens displayed on murine B lymphocyte precursors. *J. Immunol.* 127: 2262-2268.

Koopman G., Keehnen R.M.J., Lindhout E., Newman, Shimizu Y. Van Seventer G.A., de Groot C., and Pals S.T. 1994. Adhesion Trough the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54 ) and the VLA-4 (CD49d)-VCAM-1 (CD106) pathways prevents apoptosis of germinal center B cells. *J. Immunol.* 22: 3760-3767.

Koopman G., Parmentier H.K., Schuurman H., Newman W., Meijer C.J.L.M., and Pals S.T. 1991. Adhesion of human B cells to follicular dendritic cells involves both the lymphocyte function-associated antigen 1/intercellular adhesion molecule 1 and very late antigen 4/vascular cell adhesion molecule 1 pathways. *J. Exp. Med.* 173: 1297-1304.

Kornberg L., and Juliano R.L. 1992. Signal transduction from the extracellular matrix: the integrin-tyrosine kinase connection. *TIPS* 13: 93-95.

Kosko M.H., Pflugfelder E., and Gray D. 1992. Follicular dendritic cells dependent adhesion and proliferation of B cells in vitro. *J. Immunol.* 148: 2331-2339.

Kovach N.L., Carlos T.M., Yee E., and Harlan J. 1992. A monoclonal antibody to  $\beta_1$  integrin (CD29) stimulates VLA-dependent adherence of leukocytes to human umbilical vein endothelial cells and matrix components. *J. Cell. Biol.* 116: 499-509.

Kraal G., Breel M., Janse M., and Bruin G. 1986. Langerhans cells, Veiled cells and Interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 183: 981-997.

Kraal G., Weissman I.L., and Butcher E.C. 1983. Differences in *in vivo* distribution and homing of T cell subsets to mucosal vs non mucosal lymphoid organs. *J. Immunol.* 130: 1097-1102.

Krstic R.V. 1991. Lymphatic or Immune System. In *Human Microscopic Anatomy*. Springer-Verlag, Berlin. pp 70-101.

Ledbetter J.A., and Herzenberg L.A. 1979. Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol. Rev.* 47: 63-70.

Long M.W. 1992. Blood cell cytoadhesion molecules. *Exp. Hematol.* 20: 288-301.

Mackay C.R. and Imhof B.A. 1993. Cell adhesion in immune system. *Immunol. Today* 14:99-102.

Mackay Ch.R., Marston W.L., Dudler L., Spertini O., Tedler T.F., and Hein W.R. 1992. Tissue specific migration pathways by phenotypically distinct subpopulations of memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 22: 887-895.

Main A.L., Harvey T.S., Baron M., Boyd J., and Campbell I.D. 1992. The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: An insight into RGD-mediated interactions. *Cell.* 71: 671-678.

Male D., Rahman J., Pryce G., Tamatani T., and Miyasaka m. 1994. Lymphocyte migration into the CNS modelled *in vitro*: roles of LFA-1, ICAM-1 and VLA-4. *Immunol.* 81: 366-372.

Malegapuru W., Makgoba, Saundres M.E., Gale E., Luce G., Dustin M.L., Springer T.A., Clark E.A., Mannoni P., and Shaw S. 1988. ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B,T and myeloid cells. *Nature*: 86-88.

Masumoto A., and Hemler M.E. 1993. Multiple activation states of VLA-4. *J. Biol. Chem.* 268: 228-234.

McNagny K.M., Bucy R.P., and Cooper M.D. 1991. Reticular cells in peripheral lymphoid tissues express the phosphatidylinositol-linked BP-3 antigen. *Eur. J. Immunol.* 21: 509-515.

Menko A.S. and Boettiger D. 1987. Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation. *Cell.* 51: 51-57.

Metlay J.P., Witmer-Pack M.D., Agger R., Crawley M.T., Lawess, D., and Steinman, M. 1990. The distinct mouse integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 171: 1753-1771.

Miyake K, Medina K.L., Hayashi S., Ono S., Hamaoka T., and Kinkade P.W. 1990. Monoclonal antibodies to pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. *J. Exp. Med.* 171: 477-488.

Miyake K., Weissman I.L., Greenberger J.S., and Kinkade P.W. 1991. Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J. Exp. Med.* 173: 599-607.

Moy V.T., and Brian A.A. 1992. Signalling by lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) in B cells: enhanced antigen presentation after stimulation through LFA-1. *J. Exp. Med.* 175: 1-7.

Naiem M., Gerdes J., Abdulaziz Z. Stein H., and Mason D. 1983. Production of a monoclonal antibody reactive with human dendritic reticulum cells and its use in the immunohistological analysis of lymphoid tissue. *J. Clin. Pathol.* 36: 167-175.

Nussenzweig M.C., Steinman R.M., Witmer M.D., and Gutchinov B. 1982. A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 161-165.

O'Rourke A.M., and Mescher M. 1993. The roles of CD8 in cytotoxic T Lymphocyte function. *Immunol. Today.* 14 :183-188.

O'Toole T., Mandelman D., Forsyth, Shattil S., Plow E., and Ginsberg M. 1991. Modulation of the affinity of integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb-IIIa) by the cytoplasmic domain of  $\alpha_{IIb}$ . *Science* 254: 845-847.

Obara M., Kang M.S., and Yamada K.M. 1988. Site directed mutagenesis of the cell-binding domain of human fibronectin: separable, synergistic sites mediate adhesive function. *Cell* 53: 649-657.

Ozato K., and Sachs D.H. 1981. Monoclonal antibodies to mouse MHC antigens. *J Immunol* 126: 317-321.

Pardi R., Inverardi L., and Bender J. 1992. Regulatory mechanisms in leukocyte adhesion: flexible receptors for sophisticated travelers. *Immunol Today* 13: 224-30.

Parwaresh M.R., Radzum H.J., Hansman M.L., and Peters K.P. 1983. Monoclonal antibody Ki-M4 specifically recognizes human dendritic reticulum cells (follicular dendritic cells) and their possible precursor in blood. *Blood* 62: 585-590.

Paul W.E. 1991. Fundamental immunology. In lymphoid tissues and organs. Raven Press New York. Second edition. page: 117-138.

Paul W.E. 1993. Fundamental immunology. In accessory molecules. Raven Press New York. Third edition. page: 531-575.

Peters J.H., Ruppert J., Gieseler R.K.H., Najjar H.M., and Xu H. 1991. Differentiation of human monocytes into CD14 negative accessory cells: do dendritic cells derive from the monocytic lineage?. *Pathobiology* 59: 122-126.

Phillips D.R., Charo I.F., and Scarborough. 1991. GPIIb-IIIa: The responsive integrin. *Cell* 65: 359-362.

Prickett T.C.R., McKenzie J.L., and Hart D.N.J. 1992. Adhesion molecules on human tonsil dendritic cells. *Transplantation* 53: 483-490.

Roseblatt M., Vuillet-Gaugler M.H., Leroy C., and Coulombel L. 1991. Coexpression of two fibronectin receptors, VLA-4 and VLA-5, by immature human erythroblastic precursor cells. *J. Clin. Invest.* 87: 6-11.

Rouse R. V., Reichert R.A., Gallatin W.M., Weissman I.L., and Butcher E.C. 1984. Localization of lymphocyte subpopulations in peripheral lymphoid organ: directed lymphocyte migration and segregation into specific microenvironments. *Am. J. Anat.* 170: 391-405.

Rüegg C., Postigo A., Sikorski E.E., Butcher E.C., Pytela R., and Erle D.J. 1992. Role of integrin  $\alpha_4\beta_7/\alpha_4\beta_p$  in lymphocyte adherence to fibronectin and VCAM-1 and in homotypic cell clustering. *J. Cell. Biol.* 117: 179-189.

Ruoslahti E. 1988. Fibronectin and its receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 375-413.

Salmi M., Kalimo K., and Jalkanen S. 1993. Induction and function of vascular adhesion protein-1 at sites of inflammation. *J. Exp. Med.* 178: 2255-2260.

Sánchez-Madrid F., Krensky A.M., Ware C.F., Robbins E., Strominger J.L., Burakoff S.J., and Springer T.A. 1982. Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte-mediated cytotoxicity; LFA-1, LFA-2, and LFA-3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 7489-7493.

Sánchez-Madrid F., Landazuri, M.O., Morago G., Cebrian M., Acevedo A., and C. Bernabeu. 1986. VLA-3: a novel polypeptide association within the VLA molecule complex: cell distribution and biochemical characterization. *Eur. J. Immunol.* 16:1343-1349.

Sandberg M., Tamminen M., Hirvonen H., Vuorio E., and Pihlajaniemi T. 1989. Expression of mRNAs coding for the  $\alpha_1$  chain type XIII collagen in human fetal tissues: comparison with expression of mRNAs for collagen types I, II, and III. *J. Cell. Biol.* 109: 1371-1379.

Scheeren R.A., Koopman G., Van Der Baan S., Meijer C.J.L.M., and Pals S.T. 1991. Adhesion receptors involved in clustering of blood dendritic cells and T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 21: 1101-1105.

Schlaepfer D.D., Hanks S.K., Hunter T., and van der Geer P. 1994. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372: 786-791.

Schriever F., Freedman A.S., Freeman G., Messner E., Lee G., Daley J., and Nadler L.M. 1989. Isolated human follicular dendritic cells display a unique antigenic phenotype. *J. Exp. Med.* 169: 2043-2058.

Seftor R.E.B., Seftor E.A., Gehlsen K.R., Stehtler-Stevenson W.G., Brown P.D., Ruoslahti E., and Hendrix M.J.C. 1992. Role of the  $\alpha_v\beta_3$  integrin in human melanoma cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 1557-1561.

Shimizu, Y., Newman, W., Tanaka, Y. and Shaw, S. (1992) Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol. Today* 13: 106-112.

Springer T.A. 1981. Monoclonal antibody analysis of complex biological systems. *J. Biol. Chem.* 256: 3833-3839.

Springer T.A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425-434.

Springer T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 76: 301-314.

Stevens S. K., Weissman I.L., and Butcher E.C. 1982. Differences in the migration of B and T lymphocytes: organ-selective localization in vivo and the role of lymphocyte-endothelial cell recognition. *J. Immunol.* 128: 844-851.

Streuli M., Morimoto Ch., Schrieber M., Schollossman S.F., and Saito H. 1988. Characterization of CD45 and CD45R monoclonal antibodies using transfected mouse cell lines that express individual human leukocyte common antigens. *J. Immunol.* 141: 3910-3914.

Szakai A.K., Kosko M.H., and Tew J.G. 1988. A novel in vivo follicular dendritic cell-dependent iccosome-mediated mechanism for delivery of antigen to antigen-processing cells. *J. Immunol.* 140: 341-353.

Szekanecz Z., Humphries M.J., and Ager A. 1992. Lymphocyte adhesion to high endothelium is mediated by two  $\beta_1$  integrin receptors for fibronectin,  $\alpha_4\beta_1$  and  $\alpha_5\beta_1$ . *J. Cell. Science* 101: 885-894.

Takei F. 1985. Inhibition of mixed lymphocyte response by a rat monoclonal antibody to a novel murine lymphocyte activation antigen (MALA-2). *J Immunol.* 134: 1403-1407.

Tamatani T., Kotani M., Tanaka T., and Miyasaka M. 1991. Molecular mechanisms underlying lymphocyte recirculation. II. differential regulation of LFA-1 in the interaction between lymphocytes and high endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* 21: 855-858.

Tanaka Y., Adams D.H., and Shaw S. 1993a. Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol. Today* 14: 111-115.

Tanaka Y., Adams D.H., Hubscher S., Hirano H., Siebelist U., and Shaw S. 1993b. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP1- $\beta$ . *Nature* 361: 79-82.

Tannenbaum S.H., Rick M.E., Shafer B., and Gralnick H.R. 1989. Subendothelial matrix of cultured endothelial cells contains fully processed high molecular weight von Willebrand factor. *Lab. Clin. Med.* 113: 372-378.

Timo K.V, Brevé J.J.P., Damoiseaux J.M.C., Döpp E.A., Kelm S., Crocker P.R., Dijkstra C.D., and Kraal G. 1992. Sialoadhesin on macrophages: its identification as a lymphocyte adhesion molecule. *J. Exp. Med.* 176: 647-655.

Timpl R. and Dziadek. 1986. Structure, development, and molecular pathology of basement membranes. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 29: 1-112.

Van Ewick W., Rozing J., Brons N.H.C., and Kepler D. 1977. Cellular events during the primary immune response in the spleen. *Cell. Tiss. Res.* 183: 471-489.

Van Voorhis W.C., 1983. Specific antimononuclear Phagocyte monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 158: 126-145.

Veerman A.J.P., and Van Ewick W. 1975. White pulp compartments in the spleen of rats and mice. *J. Exp. Med.* 156: 417-441.

Vonderheide R.H., and Springer T.A. 1992. Lymphocyte adhesion through very late antigen 4: evidence for a novel binding site in the alternatively spliced domain of vascular cell adhesion molecules 1 and an additional  $\alpha_4$  integrin counter-receptor on stimulated endothelium. *J. Exp. Med.* 175: 1433-1442.

Weiss J., Tedder T.F., and Fearon D.T. 1984. Identification of a 145,000 Mr membrane protein as the C3d receptor (CR2) of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 881-885.

Weston S.A., and Parish C.R. 1991. Modification of lymphocyte migration by mannans and phosphomannans. *J. Immunol.* 146: 4180-4186.

Weston S.A., and Parish C.R. 1992. Evidence the mannose recognition by splenic sinusoidal cells plays a role in the splenic entry of lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 22: 1975-1981.

Wu N.W., Jalkanen S., Streeter P.R., and Butcher E.C. 1988. Evolutionary conservation of tissue-specific lymphocyte-endothelial cell recognition mechanisms involved in lymphocyte homing. *J. Cell Biol.* 107: 1845-1851.

Yabkowitz R., Dixit V.M., Guo N., Roberts D.D., and Shimizu Y. 1993. Activated T-cell adhesion to thrombospondin is mediated by the  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4) and  $\alpha_5\beta_1$  (VLA-5) integrins. *J. Immunol.* 151: 149-158.

Yoshida K., Tamahashi N., Matsuura N., Takahashi T., and Tachibana T. 1991. Antigenic heterogeneity of the reticular meshwork in the white pulp of mouse spleen. *Cell Tissue Res.* 266: 223-229.

Yoshida K., Van Den Berg T.K., and Dijkstra C.D. 1993. Two functionally different follicular dendritic cells in secondary lymphoid follicles of mouse spleen, as revealed by CR1/2 and FcR $\gamma$ -mediated immune-complex trapping. *Immunol.* 80: 34-39.

Zachary I., and Rozengurt E. 1992. Focal adhesion kinase (p125FAK): a point of convergence in the action of neuropeptides, integrins, and oncogenes. *Cell.* 71: 891-894.