



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EL PAPEL DE LA CINASA JAK3 EN EL PROCESO DE MIGRACIÓN MEDIADO POR
QUIMIOCINAS EN LINFOCITOS T

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
XOCHITL AMBRIZ PEÑA

DIRECTOR DE TESIS
DRA. MARÍA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
COMITÉ TUTOR

DRA. MARINA MACÍAS SILVA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.
DR. EDUARDO GARCÍA ZEPEDA
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA, UNAM.

MÉXICO, D.F. FEBRERO DEL 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi Madre

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A CONACYT por su apoyo económico como estudiante y por la financiación del proyecto de investigación.

A los miembros de mi comité tutorial: A la Dra. Marina Macías Silva, cuya orientación, sentido crítico y postura científica intachable ha sido para mi el ejemplo a seguir. Al Dr. Eduardo Garcia Zepeda, por sus aportaciones, apoyo al proyecto, pero sobre todo por exigirme siempre el dar más, sabiendo lo que realmente podía hacer. Su carácter y actitud forman alumnos de excelencia.

A mi tutor de Tesis: Dra Gloria Soldevila, por aceptarme en su laboratorio para el desarrollo de este trabajo como estudiante de doctorado, y por enseñarme a confiar en mis capacidades y recursos intelectuales por sobre todas las cosas.

A mis amigas de vida, compañeras, psicoterapeutas, maestras y muchas veces instructoras: Roxana Olgún Alor, Erika Aide Méndez Enriquez, Berenice Martinez Cuatepotzo, por el enorme apoyo, tanto profesional como a nivel personal, porque me dieron las herramientas en conocimiento y el apoyo moral cuando más lo necesite y más sola me sentí. Un millón de gracias, porque estoy segura que sin su ayuda y apoyo este día y los venideros no serían posibles.

A mi familia por estar y no estar...

A mi segunda familia, Herrera-Bracho por ser un apoyo en todos los sentidos, económico, moral e intelectual. Por ser mamá, papá y hermana, y darme, durante estos más de siete años su apoyo incondicional.

RESUMEN

La cinasa Jak3 es necesaria para la migración de los linfocitos T en respuesta a quimiocinas, sin embargo se desconoce cual es su papel en la transducción de señales mediada por los receptores de quimiocinas CCR7 y CXCR4. Jak3 se activa en respuesta a diversas quimiocinas, como CCL19, CCL21 y CXCL12, y se sabe que la inhibición o ausencia de Jak3 en linfocitos T resulta en una migración deficiente ante dichas quimiocinas. En el presente trabajo se estudió la función de Jak3 en la transducción de señales activada por CCR7 y CXCR4 involucradas en la reorganización del citoesqueleto de actina. Se utilizaron células murinas de ganglios linfáticos de ratones silvestres o células humanas PBMCs para el tratamiento con WHI-P131 o PTX, y linfocitos de ratones Jak3^{-/-}. Se analizó la reorganización del citoesqueleto inducida por las quimiocinas, y se encontró una reducción significativa de la polimerización de actina en las células tratadas con WHI-P131, con respecto a las células control, así como una disminución en la polimerización de actina en los linfocitos T Jak3^{-/-}. Asimismo, la cinética de activación de cofilina se alteró mediante la inhibición farmacológica de Jak3, permaneciendo activa por más tiempo, pero el tratamiento con PTX no modificó de la cinética de cofilina. La inhibición de Jak3 tuvo como consecuencia la disminución de la activación de Rac1, pero permitió generar estructuras lamelares al frente de migración, mientras que la activación de RhoA se inhibió completamente. El presente estudio demuestra que Jak3 se requiere para la activación de moléculas clave en la reorganización del citoesqueleto de actina, como cofilina y las GTPasas Rac1 y RhoA. Con base en los resultados obtenidos se propone un modelo en el cual las vías Jak3 y proteína G α_i se activan de manera independiente, pero ambas vías tienen un papel complementario para la reorganización del citoesqueleto de actina durante la migración celular en respuesta a quimiocinas en linfocitos T.

ABSTRACT

The kinase Jak3 is required for the chemokine-dependent migration of T lymphocytes; however, it is unknown its role in the signaling pathway mediated by the chemokine receptors CCR7 and CXCR4. Jak3 is activated in response to chemokines, like CCL19, CCL21 and CXCL12, and it is known that pharmacological inhibition of the kinase or in absence of Jak3, T lymphocytes have an impaired migration towards this chemokines. In this work we studied the role of Jak3 in the signal transduction mediated by the receptors CCR7 and CXCR4 involved in the actin cytoskeleton reorganization. In the experiments of pharmacological inhibition with WHI-P131 or PTX, were used murine cells from lymph nodes or periferic blood human cells. Other experiments were performed with T lymphocytes from Jak3^{-/-} mice. The cytoskeleton reorganization induced by chemokines was analized, and was found a significant reduction in the actin polymerization in WHI-P131-treated cells in comparison to the control cells, and the Jak3^{-/-} T lymphocytes showed a remarked reduction in the actin polymerization. Also, the kinetic of cofilin activation was altered in Jak3-inhibited cells reminding activated for a longer period of time than the controls, but G protein inactivation had no effect on cofilin kinetic. Otherwise, Jak3-inhibition affect Rac1 activation, but the cell was capable to generate lamellar structures at the leading edge, while RhoA activation was completely lost. This study demonstrates that Jak3 is required for the activation of key molecules responsible of the actin cytoskeleton reorganization, like cofilin and the small GTPases Rac1 and RhoA. Supported by the results obtained in this study, we propose a model of independent activation between Jak3 and G protein pathways, where both pathways have a complementary role in the actin cytoskeleton reorganization during cell migration towards chemokines in T lymphocytes.

ÍNDICE

Tabla de abreviaturas	07
Índice de figuras	09
Índice de tablas	10
Índice de anexos	10
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Linfocito T	12
1.1.1. Migración de los linfocitos T durante su diferenciación y desarrollo en el timo	14
1.1.2. Migración de los linfocitos T a los ganglios linfáticos	15
1.2. Receptores de quimiocinas	20
1.3. Quimiocinas	22
1.4. Transducción de señales mediadas por los receptores de quimiocinas	24
1.5. Reorganización del citoesqueleto	28
1.5.1. Dinámicas de actina	27
1.5.2. Familia de GTPasas Rho	31
1.5.3. Cinasas LIM	34
1.5.4. Familia de ADF/cofilina	34
1.6. Vía de las Cinasas Janus o vía Jak/STAT	37
2. Antecedentes	42
2.1. Jak3 en migración	42
3. JUSTIFICACIÓN	44
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	47
6. MATERIALES Y MÉTODOS	48
7. RESULTADOS	53
8. DISCUSIÓN	68
9. CONCLUSIONES	76
10. PERSPECTIVAS	77
11. ANEXOS	78
12. BIBLIOGRAFÍA	79

Tabla de abreviaturas

cTEC	Cortical Thymic Epithelial Cells Células Epiteliales Corticales Tímicas
mTEC	Medular Thymic Epithelial Cells Células Epiteliales Medulares Tímicas
TCR	T Cell Receptor Receptor de Células T
CD	Cluster Differentiation Grupo de diferenciación
DN	Double Negative Doble negativo
DP	Double Positive Positivos Dobles
SP	Single Positive Positivos simples
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1 molécula de adhesión vascular 1
S1P1R	Sphingosine-1-Phosphate-1 Receptor Receptor de Esfingosina-1-Fosfato
PNAd	Peripheral Lymph Nodes Adresin Adresina de ganglios linfáticos periféricos
HEVs	High Endothelial Venules Vénulas Endoteliales Altas
GAGs	Glycosaminoglicanes Glicosaminoglicanos
GlyCAM-1	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1 Molécula de Adhesión-1 dependiente de Glicosilación
LFA-1	Lymphocyte Function-Associated Antigen 1 Antígeno 1 asociado a la función del linfocito
ICAM-1, CD54	Intracellular Adhesion Molecule 1 Molécula de adhesión intracelular 1
GPCR	G Protein-Coupled Receptor Receptor acoplado a proteínas G
Jak	Janus Kinase Cinasa Janus
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription Transductor de señal y activador de Transcripción
GDP	Guanosine Diphosphate Difosfato de guanosina
PTX	Pertussis Toxin Toxina Pertussis
PLC	Phospholipase C Fosfolipasa C
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphate fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphate Inositol 1,4,5-trifosfato
DAG	Diacylglycerol Diacilgricerol
PKC	Protein Kinase C Proteína cinasa C
PH	Plecstrin Homology domain Dominio homólogo a plecstrina
ABP	Acitin Binding Protein Proteína de Unión a la Actina
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein Proteína del síndrome Wiskott-Aldrich
WAVE	Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) family verprolin-homologous Proteína homóloga a verprolina.
WHI-P131	4-(4'-hydroxyphenyl)-amino-6,7-dimethoxyquinazoline 4-(4'-hidroxifenil)-amino-6,7-dimetoxiquinazolina
SH2	Src Homology 2 Homología al dominio 2 de la proteína Src
FAK	Focal Adhesion Kinase Cinasa de adhesión focal
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor Factor intercambiador de nucleótido de guanina
GAP	GTPase-Activating Protein Proteína activadora de GTPasa
RhoA	Ras homolog family member A Miembro A de homología con la familia Ras
ROCK	Rho-associated protein kinase Cinasa asociada a la proteína Rho
MLC	Myosin Light Chain Cadena ligera de la miosina
ADF	Actin Depolymerizing Factor Factor despolimerizador de actina
PAK	p21-Activated Kinases Cinasas activadas por p21
PLN	Peripheral Lymph Nodes Ganglios linfáticos peritéricos
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells Células mononucleares de sangre periférica

Índice de figuras

Figura 1	Desarrollo de los linfocitos T.	12
Figura 2	Etapas de la migración de los linfocitos T a los ganglios linfáticos.	16
Figura 3	Estructura y regulación de las integrinas.	18
Figura 4	La familia de las integrinas.	19
Figura 5	Organización de los ganglios linfáticos y la entrada de las células del sistema inmunológico.	19
Figura 6	El estado actual de la familia de los receptores acoplados a proteínas G.	20
Figura 7	Quimiocinas y sus receptores expresados en leucocitos.	22
Figura 8	Representación esquemática de los cuatro grupos de quimiocinas.	23
Figura 9	Familias de las Proteínas G y las vías que activan.	25
Figura 10	Modelo de activación/inactivación del GPCR.	26
Figura 11	Estados estructurales de la actina.	29
Figura 12	El modelo de nucleación y polimerización de actina al frente de migración de células móviles.	30
Figura 13	Representación esquemática y simplificada de la secuencia de eventos en la activación de las GTPasas y las estructuras de actina dependientes de cada una en la migración de los linfocitos T.	31
Figura 14	Efectores de las GTPasas Rho para la formación de las estructuras de actina.	33
Figura 15	Sitios de regulación de cofilina.	35
Figura 16	Efectos de cofilina en las dinámicas de polimerización y despolimerización de la actina.	36
Figura 17	Representación esquemática de la estructura de las Jaks.	38
Figura 18	Transducción de señales de los receptores de citocinas.	39
Figura 19	La motilidad y la migración de los linfocitos está disminuida en ausencia de la actividad e Jak3.	54

Figura 20	Cuantificación de la respuesta morfológica de las células observada tras a estimulación con CCL21.	55
Figura 21	Jak3 se requiere para la polimerización de actina dependiente de CCR7 en linfocitos T.	56
Figura 22	La polimerización de actina dependiente de CCR7 en linfocitos T requiere de Jak3.	57
Figura 23	La inhibición de Jak3 resulta en la disminución de inducción de F-actina dependiente de CXCR4 en células humanas.	59
Figure 24	La deficiencia de Jak3 resulta en el incremento de la cantidad basal de F-actina en linfocitos T murinos.	60
Figura 25	La inhibición de Jak3 afecta la fosforilación de cofilina en respuesta a quimiocinas.	62
Figura 26	La activación de Rac1 dependiente de CCL21 se disminuye tras inhibición de Jak3 o G α i.	64
Figura 27	La activación de RhoA es abatida en ausencia de la actividad de Jak3 o G α i en linfocitos T estimulados con CCL21.	65
Figura 28	Resumen esquematizado de las vías de Jak3 y G α i activadas por las quimiocinas.	67
Figura 29	Jak3 y la proteína G tienen un papel complementario e independiente en la señalización mediada por los receptores de quimiocinas.	74

Índice de tablas

Tabla 1	Expresión de receptores de quimiocinas y sus ligandos durante el desarrollo tímico.	15
Tabla 2	Citocinas y los miembros de la familia Jak que se asocian a sus receptores.	40

Índice de anexos

Anexo 1	Las subpoblaciones de linfocitos T, tanto CD4 como CD8, requieren de Jak3 para la polimerización de actina en respuesta a CCL21.	78
Anexo 2	Análisis de la polimerización de actina en respuesta a CCL21 por microscopía confocal.	78

Video 1.

Videomicroscopía de “*time-lapse*” de la respuesta migratoria hacia la quimiocina CCL21 en el grupo control de linfocitos.

doi:10.1371/journal.pone.0088014.s003

(MOV)

Video 2.

Videomicroscopía de “*time-lapse*” de la respuesta migratoria hacia la quimiocina CCL21 en el grupo de linfocitos tratados con el inhibidor de Jak3.

doi:10.1371/journal.pone.0088014.s004

(MOV)

Video 3.

Videomicroscopía de “*time-lapse*” de la respuesta migratoria hacia la quimiocina CCL21 en el grupo de linfocitos tratados con PTX para la inhibición de Gαi.

doi:10.1371/journal.pone.0088014.s005

(MOV)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los linfocitos T

Los linfocitos T son células altamente migratorias cuyos progenitores inmaduros salen de la médula ósea o hígado fetal para llegar al timo [1]. En el timo se desarrollan los linfocitos T, dependiente de la interacción con diferentes tipos de células residentes que van dando señales para permitir la difrenciación [2]. Entre las células que interaccionan con los precursores de los linfocitos T están las cTEC que se localizan en la corteza externa, mientras que en la zona medular tímica se encuentran las células dendríticas tímicas, macrófagos y las células mTEC [3].

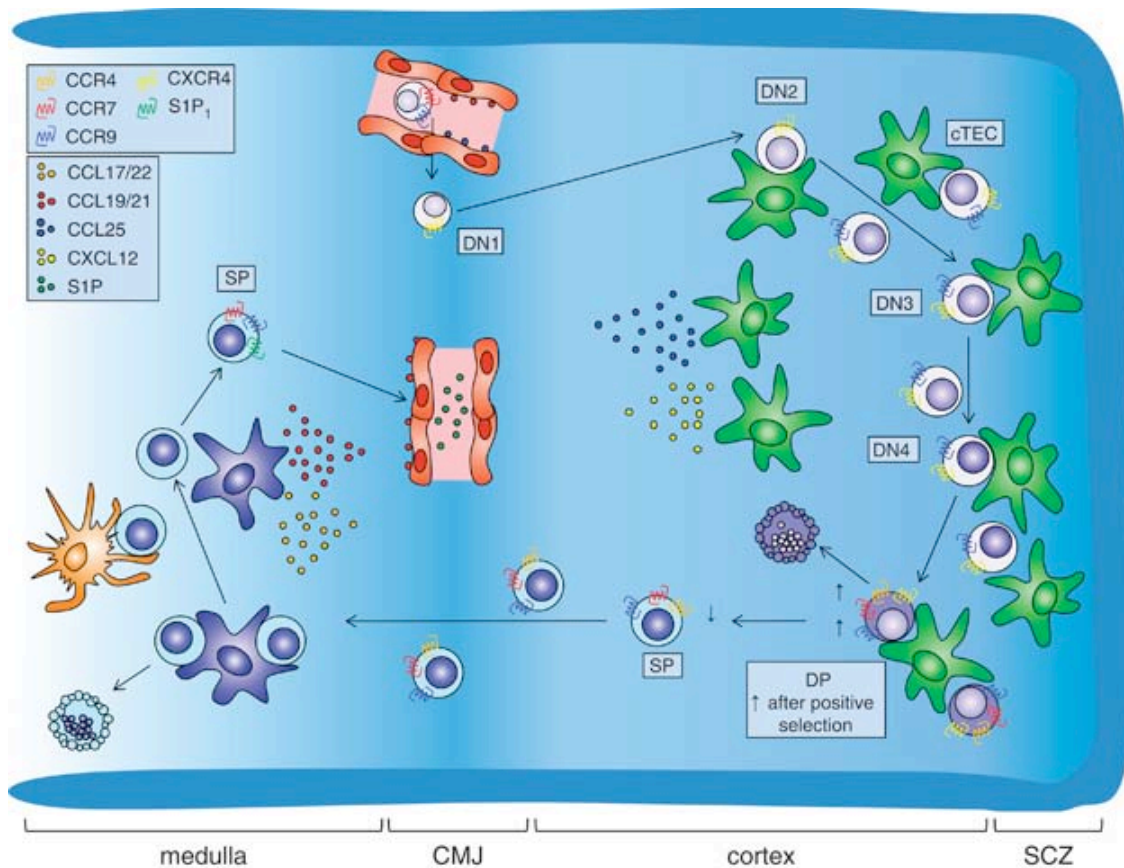


Figura. 1.-Desarrollo de los linfocitos T. Los progenitores circulantes entran al timo por las vénulas postcapilares. Las células transitan por varias etapas de desarrollo, clasificadas por la expresión de los marcadores en superficie CD44 y CD25, hasta la expresión de los marcadores CD4 y CD8 para poder determinar el subtipo de célula T que saldrá a la periferia ya como linfocito T maduro. Figura tomada de Love y Bhandoola, 2011.

Cuando entran al timo, las células no presentan TCR, tampoco los correceptores CD4 ni CD8, característicos de los linfocitos T (Fig. 1). En esta etapa temprana del desarrollo, por la ausencia de los correceptores CD4 y CD8, se les clasifica como DN1, que se distinguen por ser CD44+CD25-. Las células DN2 son CD44+CD25+ mientras que las células DN3 son CD44-CD25+ y es en este momento donde ya se tiene el compromiso de linaje de célula T. El TCR se rearregla dando lugar al pre-TCR, que mediará señales para permitir el rescate de la muerte por apoptosis. En el estadio DN4 (CD44-CD25-) los timocitos migran hacia la corteza tímica donde se diferencian en DP por la expresión de los correceptores CD4 y CD8. Durante esta etapa, el pre-TCR completa su rearreglo y ensamblaje con CD3 para ser TCR exitoso.

Los timocitos DP pasan por procesos donde se seleccionan aquellos que han concretado un TCR capaz de inducir señales apropiadas y para la elección del linaje CD4/CD8. A continuación se abordan de forma breve dichos procesos de selección.

Se denominado muerte por negligencia, cuando el TCR de los timocitos DP no tiene la capacidad apropiada de interacción con los péptidos presentados por las células epiteliales tímicas y no genere señales intracelulares o estas son débiles [4, 5].

La selección positiva es cuando el TCR del timocito DP interacciona con el péptido presentado y genera señales intermedias, lo que rescata de la muerte al timocito. Después de haber sido seleccionado positivamente el timocito expresa la molécula VCAM-1 que le ayudará a la migración hacia la médula tímica [6].

La selección negativa ocurre una vez que los timocitos han sido seleccionados positivamente y migran hacia la médula tímica. Las células mTEC presentan péptidos propios a los timocitos y si la interacción del TCR con los péptidos es alta, son eliminados por apoptosis, previniendo la generación de células potencialmente autorreactivas o también pueden ser rescatadas de la muerte, generando un repertorio de linfocitos T reguladores.

La elección de linaje CD4/CD8 se da durante la migración de los timocitos DP hacia la médula tímica. En este paso, los timocitos se diferencian a SP, quedando solo CD4 ó CD8, para posteriormente salir del timo, donde estas células ya se denominan linfocitos T maduros vírgenes [7].

1.1.1. Migración de los linfocitos T durante su diferenciación y desarrollo en el timo.

Las células precursoras de los linfocitos T provienen de la médula ósea y deben migrar por el torrente sanguíneo hasta el timo, donde pasan por el proceso complejo y riguroso de selección y maduración, generando el repertorio de linfocitos T con una variedad requerida para la defensa del organismo (capaz de reconocer más de 10^8 antígenos diferentes). Durante dicho proceso, desde la llegada al timo hasta la salida, los timocitos migran a diferentes zonas del timo guiados por receptores de quimiocinas y sus ligandos (Fig. 1 y tabla 1) [8, 9].

Se ha descrito que la llegada al timo depende de la expresión de los receptores de quimiocinas CCR7 y CCR9 por parte de las células precursoras de linfocitos T, así como de la expresión de los ligandos CCL19, CCL21 y CCL25 en las vénulas postcapilares que se encuentran en la región córtico-medular del timo. Ambos receptores y sus ligandos también son requeridos en diferentes estadios de diferenciación y maduración, donde las células del estroma tímico expresan las quimiocinas, permitiendo la migración y el contacto con los timocitos [10].

Otros receptores de quimiocinas y sus ligandos también participan en diferentes puntos del proceso del desarrollo de los linfocitos T. Asociado a la selección negativa de los timocitos se encuentra el receptor CCR4, expresado por timocitos, y sus ligandos CCL17 expresado por células dendríticas, principalmente en la médula del timo y CCL22 expresado en los corpúsculos de Hassall. Estos corpúsculos son estructuras formadas de láminas concéntricas de células epiteliales reticulares ricas en queratina y productoras de hormonas como la timosina, timopoyetina, entre otras. La quimiocina CCL22 también es expresada por algunas células mTEC. Por otra parte, la expresión de CXCR4 se asocia al desarrollo y relocalización de los timocitos DN hacia la corteza externa,

y su ligando CXCL12 se expresa en la región subcapsular, en la médula tímica, en los corpúsculos de Hassall, células epiteliales y por un subtipo de células cTEC.

Una vez que los linfocitos son SP y han completado su proceso de maduración, para poder salir del timo requieren la expresión en superficie del receptor S1P1R y de CCR7 para migrar a los órganos linfoides secundarios como son los ganglios linfáticos [8].

Receptor	Receptor-expressing cells in the thymus ¹	Ligand ⁵	Ligand-expressing cells in the thymus ⁴	Role in the thymus as identified in gene-knockout mice
CCR4	CD62L ⁺ CD69 ⁺ SP thymocytes (R, F) ⁵³ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ^{low} thymocytes (F) ⁵² Medullary thymocytes (R) ^{51*} CD4 ⁺ CD8 ^{low} and DP thymocytes (F) ^{53*}	CCL17 (TARC) CCL22 (MDC)	Dendritic cells (R) ^{50,51} Mostly in the medulla (R) ⁵¹ Outer walls of Hassall's corpuscles (H) ^{52,53*} A fraction of mTECs (H) ^{52*}	Not determined, although possibly associated with negative selection
CCR7	SP thymocytes (R, F) ^{52,53,52} (P) ^{51,54} TCR-stimulated DP thymocytes (P) ⁵⁴ DN1 and DN2 thymocytes (P) ⁵¹ SP and a fraction of DP thymocytes (F) ^{53,108*}	CCL19 (ELC, MIP3β) CCL21 (SLC, 6Ckine)	A fraction of mTECs (H) ⁵⁴ Endothelial venules in the medulla (H) ⁵⁵ Medulla, CMJ, blood vessels (H) ⁴¹ mTECs (high levels), cTECs (low levels), dendritic cells (R) ⁵⁵ mTECs (H) ^{53*} Most mTECs (H) ⁵⁴ Medulla, CMJ, cortical dendritic cells and macrophages (H) ⁵¹ mTECs (high levels), cTECs (low levels) ⁵⁵	Attraction of positively selected thymocytes to the medulla ⁵⁴ Guidance of postnatal thymus exit ⁵⁵ Outward relocation of DN thymocytes towards the outer cortex ⁴¹ Attraction of fetal progenitor cells to pre-vascular fetal thymus ⁵⁰
CCR9	DP thymocytes and CD62L ⁺ CD69 ⁺ SP thymocytes (F) ^{53,109-111} DN3-DN4, DP and a fraction of SP thymocytes (P) ⁵² DP thymocytes and γδ T cells (P) ¹¹² DP thymocytes (high levels), SP thymocytes (low levels) (R) ¹¹⁰ DP and SP thymocytes (F) ^{113*}	CCL25 (TECK)	cTECs and mTECs (H) ⁴¹ cTECs and a fraction of mTECs (H) ¹⁰⁹ mTECs (high levels), cTECs (low levels) (R) ¹⁰⁹	Outward relocation of DN2 or DN3 thymocytes to the subcapsular region ⁴² Fetal thymus accumulation ²¹
CXCR4	DN1-DN4 thymocytes (R, F) ^{22,40,52} DN, DP and SP thymocytes (R, F) ^{22,52} Dendritic cells (H) ^{114*} DP and SP thymocytes (P, F) ^{108*}	CXCL12 (SDF1, SDF1α)	Medulla, CMJ (H) ⁴¹ A subset of cTECs, not in the medulla (R) ⁴⁰ Hassall's corpuscles, epithelial cells (H) ^{114*}	Outward relocation of DN thymocytes towards the outer cortex ⁴⁰ Development of DN thymocytes ²²

Tabla 1. Expresión de receptores de quimiocinas y sus ligandos durante el desarrollo tímico. Datos obtenidos de células y tejidos humanos o murinos. Tabla tomada de Takahama, 2006.

1.1.2. Migración de los linfocitos T a los ganglios linfáticos

Los linfocitos T vírgenes recirculan entre el torrente sanguíneo y los tejidos linfoides, incluyendo los ganglios linfáticos. La salida de los linfocitos T desde el torrente sanguíneo y su entrada a los ganglios linfáticos depende de CCL21, cuya producción genera un gradiente en la pared vascular que permite a la célula guiarse hacia las HEVs postcapilares, en los vasos aferentes de los ganglios linfáticos (Fig. 2)[11].

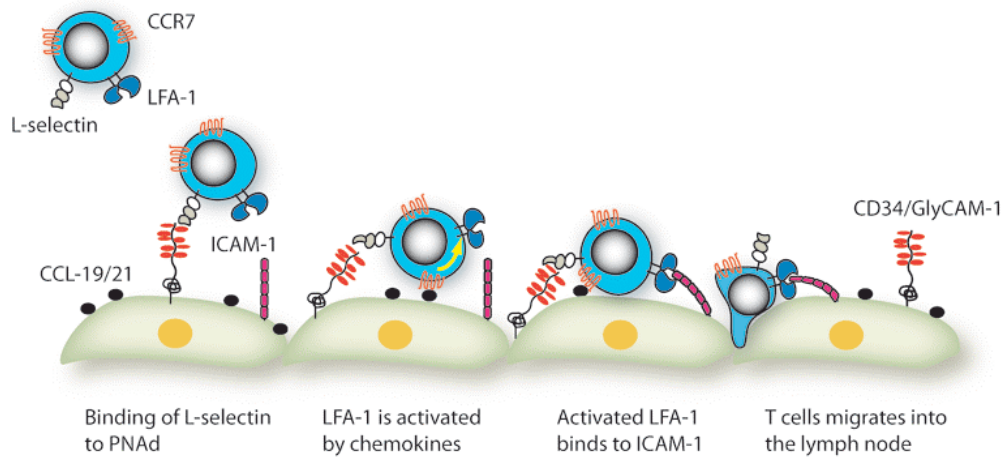


Figura 2.-Etapas de la migración de los linfocitos T a los ganglios linfáticos. En las HEVs, los linfocitos T pueden interactuar con PNA como son CD34 o GlyCAM-1. El rodamiento de la célula a lo largo del endotelio permite una mayor interacción con las moléculas para una adhesión firme que conducirá al anclaje de la célula. LFA-1 e ICAM-1 expresadas en los linfocitos T y endotelio, respectivamente, son los dos receptores clave para la unión firme o arresto de la célula a las paredes vasculares. En una célula en reposo la afección de LFA-1 por su ligando es débil, por lo que requieren otras señales para permitir la trans migración al nivel de las HEVs. Estas señales son activadas por las quimiocinas presentes en las células endoteliales (como CCL21 o CCL19) que interactúan con CCR7 en las células T. Figura tomada de Carrette, 2009.

Se ha propuesto que el gradiente de CCL21 se genera mediante el anclaje de esta quimiocina a GAGs unidos a la matriz extracelular de las células del endotelio vascular. El mecanismo que permite la entrada de los linfocitos T a los ganglios linfáticos involucra la activación de distintas señales moleculares que llevan a la activación de la maquinaria celular involucrada en la reorganización del citoesqueleto, lo que permite un cambio en la morfología del linfocito y facilita las interacciones con el endotelio, para finalmente conducir a la extravasación hacia los tejidos.

La migración de los linfocitos T a los ganglios linfáticos inicia con la circulación libre de la célula por el torrente sanguíneo, a una velocidad promedio de 4000 micras/segundo, hasta que se encuentra con el gradiente de la quimiocina CCL21, lo que provoca la activación de los primeros receptores para dicha quimiocina y esto a su vez lleva a la activación de las vías encargadas de la

reorganización del citoesqueleto permitiendo la proyección anterógrada de las ondulaciones membranales, exponiendo una cantidad mayor de receptores CCR7 y moléculas de adhesión [12].

A medida que más receptores CCR7 se unen a su ligando, la señal mediada por cada receptor activado se va sumando, teniendo un efecto sinérgico para la integración de las señales intracelulares. En esta primera etapa, las moléculas de adhesión débil, L-selectinas (CD62L) interaccionan con su correspondiente en la célula de endotelio, GlyCAM-1, lo que causa que la célula empiece a rodar y viajar más lento por el torrente sanguíneo disminuyendo su velocidad 100 veces (a 40 micras/segundo) y de esta manera se permite una mayor interacción con el gradiente de quimiocinas.

Como segunda etapa, las señales intracelulares desencadenadas por la unión de CCR7 a CCL21 provocan la activación de las integrinas, esto permite una adhesión fuerte, que lleva a la unión firme o arresto de los linfocitos T al endotelio, para facilitar la diapédesis o extravasación, ambos términos son dados al paso de la célula del torrente sanguíneo al exterior del vaso, en este caso conduciendo al interior del ganglio linfático a través de las HEVs [13].

Los receptores de quimiocinas activan a las integrinas mediante la vía “*inside-out*” (de dentro hacia afuera). Esta vía causa un cambio conformacional de las integrinas, teniendo como consecuencia el incremento de su afinidad por el ligando (Fig. 3a, panel superior). A su vez, las integrinas al interaccionar con sus ligandos activan la vía “*outside-in*” (de afuera hacia dentro), lo que genera la agrupación de varias integrinas y con ello el incremento de su avidéz por el ligando (Fig. 3a, panel inferior) [14]. En el caso de los linfocitos T vírgenes, la integrina que media la adhesión fuerte es la alfaLbeta2 o LFA-1 y su ligando es ICAM-1 o CD54. Existen varios tipos de integrinas cuya expresión depende del tipo celular y del microambiente (Fig. 4).

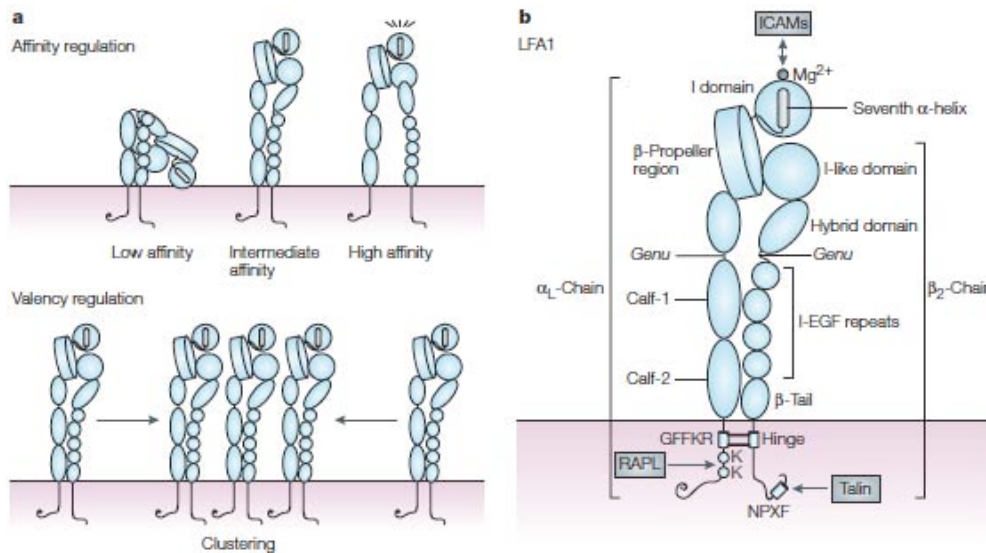


Figura 3.- Estructura y regulación de las integrinas. a) modelos de afinidad y avidéz. El panel superior muestra las diferentes conformaciones de una integrina que se asocian a diferentes afinidades: una donde las cadenas alfa y beta están dobladas y la cabeza está proyectada hacia la membrana celular, de conformación de baja afinidad; y la conformación extendida que corresponde a la afinidad intermedia y alta. La activación de señales intracelulares inducen la transición entre estos estados de afinidad, lo que conlleva al incremento de la unión del ligando y tiene como resultado la regulación de la avidéz por el ligando. En el panel inferior se muestra la regulación de valencia de la avidéz mediante agrupamiento de las integrinas, que no precisamente requiere de la conformación extendida. b) Representación esquemática de la integrina LFA-1. El dominio de unión a ligando de LFA-1 une a ICAM-1 en una forma que depende de la presencia del ion magnesio. Tomado de Kinashi 2005.

En los ganglios linfáticos, las quimiocinas CCL19 y CCL21 atraen a los linfocitos T a una zona denominada “zona de células T”, ya que es la región del ganglio rica en linfocitos T. En la zona de células T, las células dendríticas, que acarrean antígenos a los ganglios linfáticos, estimulan a los linfocitos T y permiten la activación y diferenciación a células efectoras, la pérdida de la expresión del receptor CCR7 y su salida de los ganglios linfáticos dependiente de otros receptores de quimiocinas específicos (diferentes de CCR7) y de moléculas superficiales de adhesión [13].

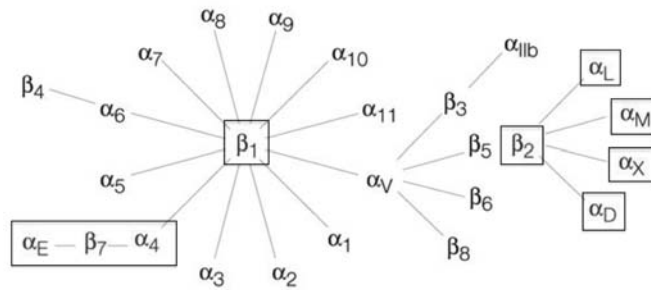


Figura 4.- La familia de las integrinas. Se muestran las diferentes asociaciones que existen entre los 18 tipos de cadenas alfa de integrinas y los 8 tipos de integrinas beta, permitiendo la formación de al menos 24 integrinas. Las integrinas expresadas por los leucocitos se muestran en los recuadros. Tomado de Kanishi, 2005.

Asimismo, las células efectoras dan origen a un tipo de células de memoria que re-expresan el receptor CCR7 y migran de nueva cuenta a los ganglios linfáticos para ser células de memoria central y esperar para una posterior re-exposición al antígeno que respondieron previamente.

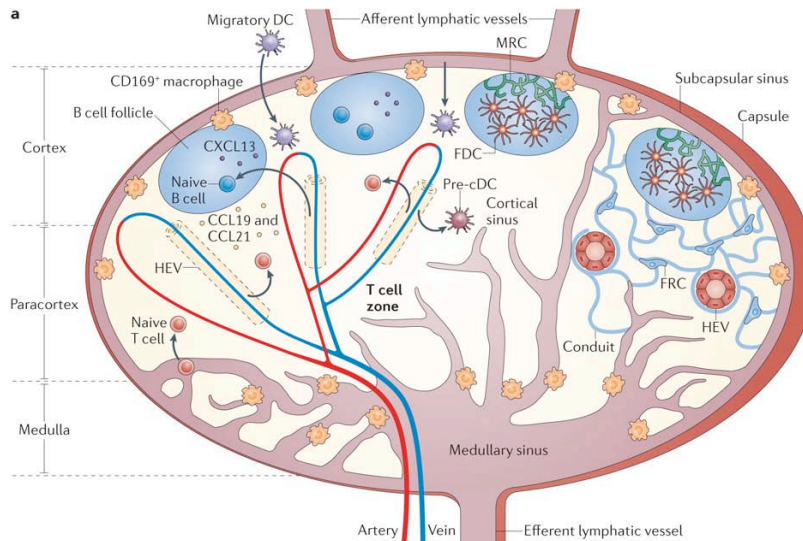
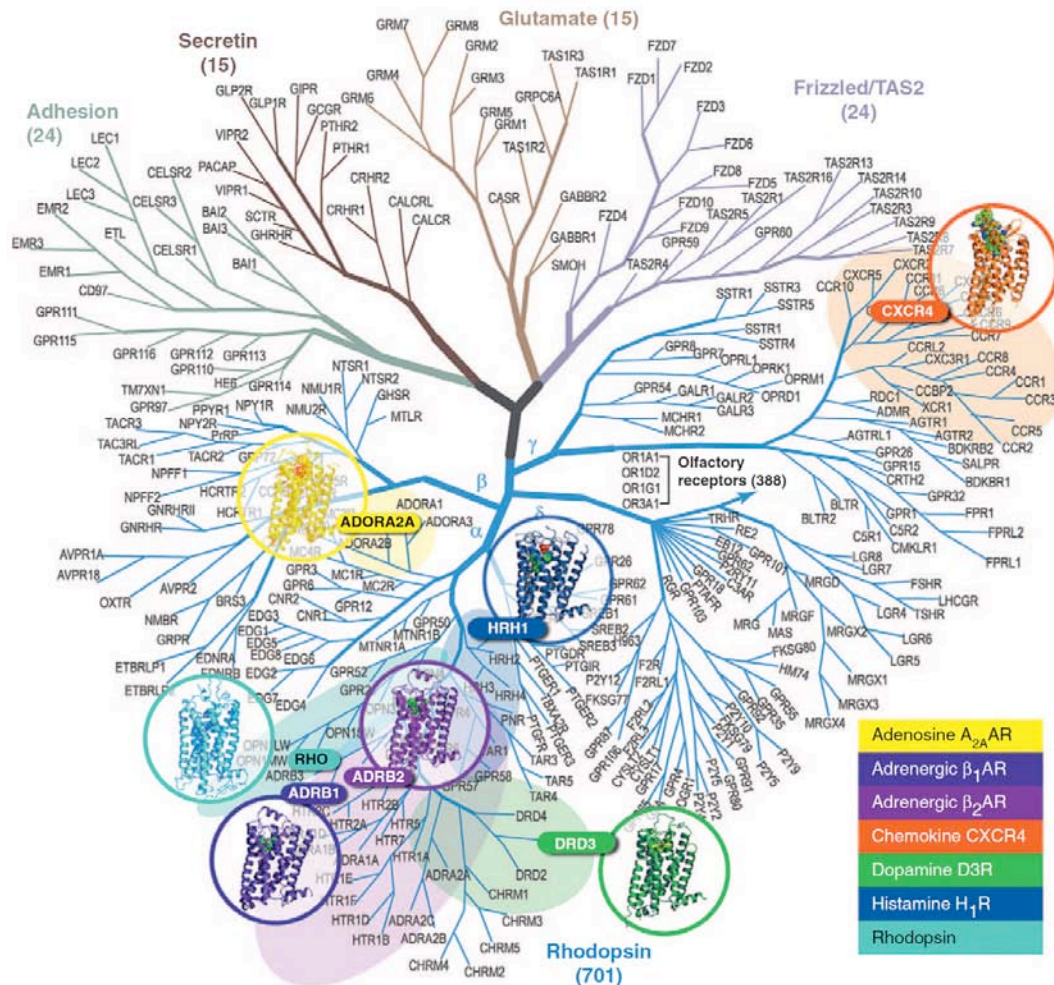


Figura 5.- Organización de los ganglios linfáticos y la entrada de las células del sistema inmunológico. Los ganglios linfáticos son órganos linfoides encapsulados en forma de frijol que se encuentran subdivididos en tres regiones principales: La corteza, la paracorteza y la médula. Los linfocitos vírgenes entran a los ganglios linfáticos vía HEVs o vasos linfáticos aferentes, y salen por los senos corticales, senos medulares y los vasos aferentes linfáticos en la médula. Existe una zona en la paracorteza, denominada zona de células T, donde los linfocitos T se acumulan. Tomado de Giraldo, 2012.

1.2. Receptores de quimiocinas

Los receptores de quimiocinas son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), que agrupa a más de 800 miembros y se divide en 5 clases o familias: Rodopsina, Secretina, Adhesión, Glutamato y Frizzled/Tas2 (Fig. 6).



TRENDS in Pharmacological Sciences

Figura 6.- El estado actual de la familia de los receptores acoplados a proteínas G. El árbol de la familia de GPCRs, incluyendo los receptores de los que se cuenta por lo menos con una estructura. En la imagen se muestra las 5 principales clases de GPCRs agrupados por análisis filogenético: Rodopsina, Secretina, Adhesión, Glutamato y Frizzled/Tas2. Los receptores de quimiocinas forman parte de la clase Rodopsina. Se muestran dentro de un círculo, los receptores representativos de algunas rama, con base a las estructuras cristalizadas. Tomado de Katritch, 2012.

Los GPCRs son receptores integrales de membrana y cuentan con siete hélices que cruzan la membrana celular, con el extremo amino terminal proyectado extracelularmente y el carboxilo terminal citoplásmico. Las zonas variables específicas de los distintos receptores suelen localizarse en extremo amino terminal, pero también existen zonas variables en el extremo carboxilo terminal y en las asas intracelulares que conectan los segmentos transmembranales.

En la porción citoplásmica de los GPCRs se asocian las proteínas G heterotriméricas, que se clasifican en 4 subfamilias: G_s , G_i , $G_{q/11}$ y $G_{12/13}$ [15]. Dependiendo del GPCR en cuestión, será el tipo de proteína G que se asocie. Particularmente, para los receptores de quimiocinas CCR7 y CXCR4 transducen señales mediante la proteína G_i , mientras que el segundo receptor también activa a la proteína G_q , de lo que se aborda a detalle en la sección de transducción de señales mediadas por los receptores de quimiocinas.

Por otra parte, hay evidencias que indican que, en algunos casos, los receptores pueden formar dímeros u oligómeros [16, 17] y esto podría modificar la activación de los GPCRs, es el caso de la familia de receptores para glutamato y receptores de quimiocinas [18].

La función de los GPCRs es transducir estímulos extracelulares en señales intracelulares, que llevan a diferentes finalidades, dentro de las que se encuentran la diferenciación, proliferación y migración celular. Estos receptores son activados por una amplia variedad de ligandos, entre los que se encuentran hormonas, feromonas, iones, neurotransmisores, péptidos, y otros; controlando diversos procesos homeostáticos o patológicos en el sistema endócrino, neural, cardiovascular e inmunológico, así como en el cáncer [16].

En el sistema inmunológico, los receptores de quimiocinas tienen un papel fundamental como moduladores del tráfico y la actividad de las células. Estos receptores se clasifican con base en su secuencia primaria de aminoácidos y se subdividen en 4 subfamilias: CCR, CXCR, CX3CR y XCR (Fig. 7).

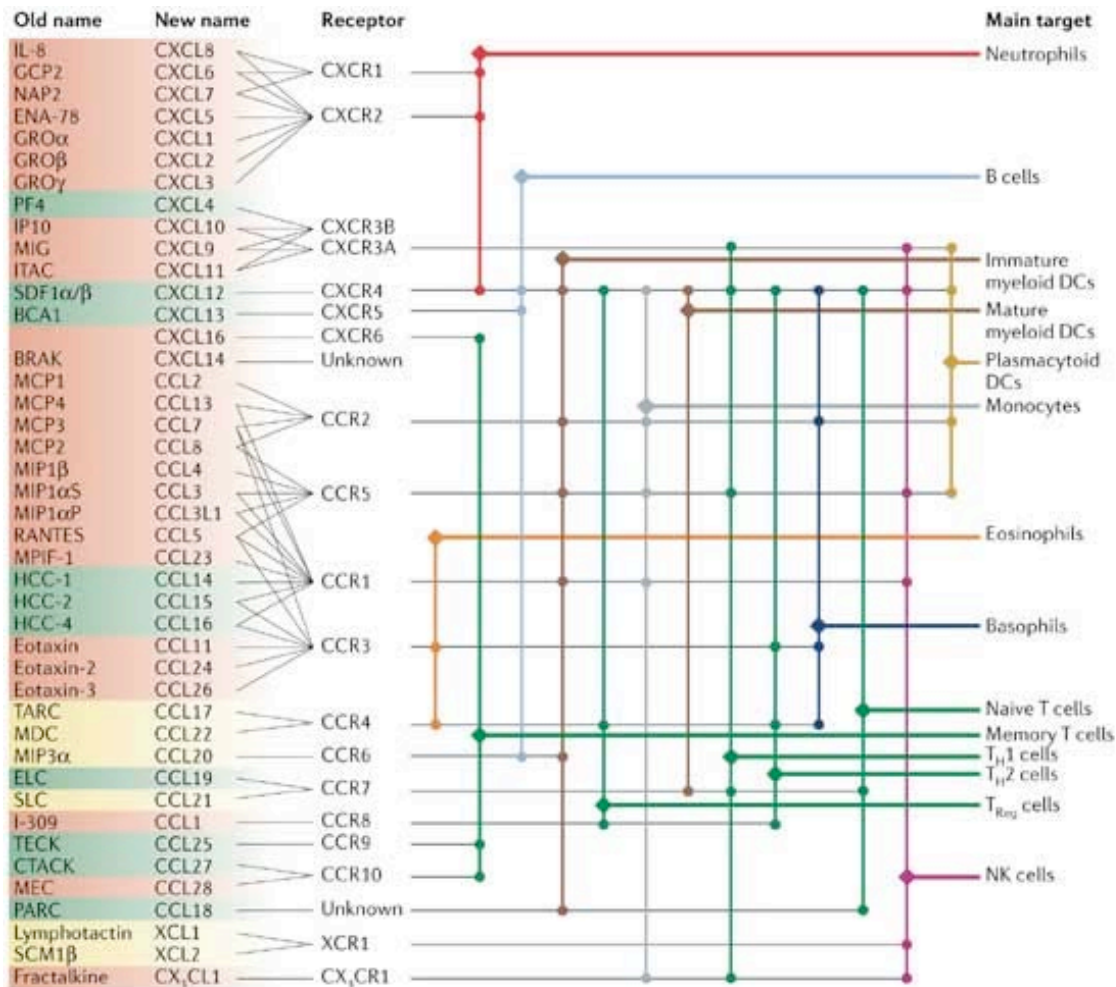


Figura 7.- Quimiocinas y sus receptores expresados en leucocitos. Las quimiocinas se unen a una subfamilia de GPCRs, y hasta el momento se han identificado 18 receptores de quimiocinas en humanos. Se clasifican como CCR, CXCR, CX₃CR y XCR según el tipo de quimiocina que unen. A la derecha se muestra su patrón de expresión en leucocitos. Tomado de Mantovani 2006.

1.3. Quimiocinas

Las quimiocinas son una familia de citocinas quimioatrayentes que coordinan la migración celular tanto en homeostasis como en condiciones de inflamación, en organogénesis, comunicación neuronal, angiogénesis [19], pero también en procesos patológicos inflamatorios como cáncer, enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, Alzheimer, entre otros.

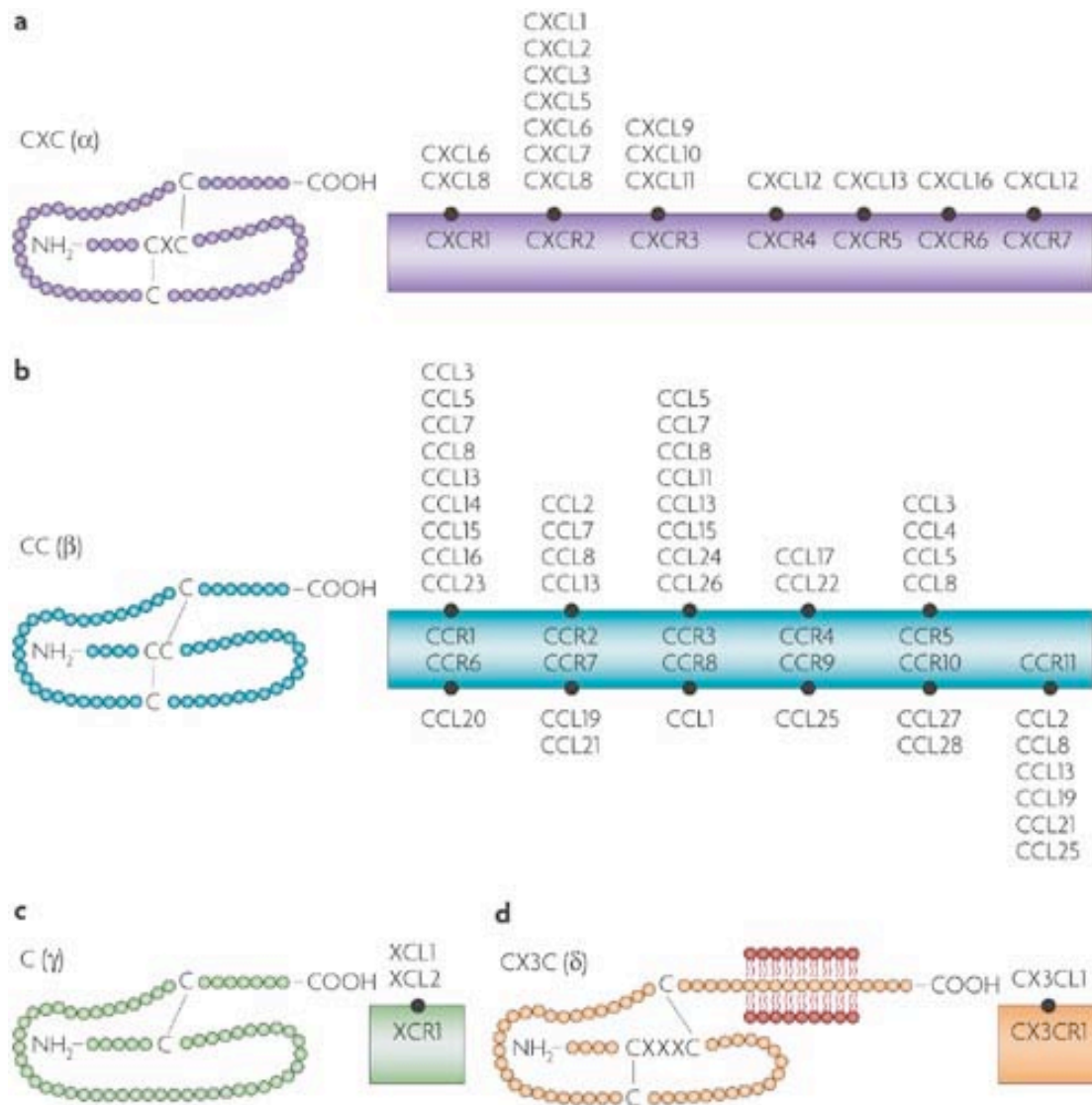


Figura 8.- Representación esquemática de los cuatro grupos de quimiocinas. Las quimiocinas son pequeñas proteínas con una homología entre el 20 y 90% en sus secuencias. Su peso molecular es entre 8 y 14 kDa. Se subdividen en 4 familias, basada en el número y espaciado entre los residuos de cisteína conservados en su extremo amino. Estas familias son CXC, CC, C y CX3C. En el caso de CXC (a), un aa separa los primeros dos residuos de cisteína (cisteína-X aa-cisteína, o CXC). En CC (b), los dos residuos de cisteína están adyacentes uno del otro. En la subfamilia C (c) se distingue estructuralmente por tener solo dos de los 4 residuos conservados de cisteína que se encuentran en las otras subfamilias. La subfamilia CX3C, está representada por un solo miembro llamado fractalcina o CX3CL1, se caracteriza por presentar tres aa entre las primeras dos cisteínas, así como un dominio de tipo mucina (d). Tomado de Rostène 2007.

Las quimiocinas son péptidos de entre 60 a 125 amino-ácidos (aa) ricos en aminoácidos básicos. Se han clasificado en 4 subfamilias, basándose en el espacio entre los residuos conservados de cisteínas: CXC o quimiocinas alfa, CC o quimiocinas beta, C o quimiocinas gamma y CX3C o quimiocinas delta (Fig. 8) [20-22].

1.4. Transducción de señales mediadas por los receptores de quimiocinas

Los receptores de quimiocinas activan una gran cantidad de moléculas en los linfocitos T, incluyendo la vía canónica de proteínas G, la vía Jak-STAT e incluso llevan a una transactivación del TCR así como un entrecruzamiento (“crosstalk”) con otra vías de activación como la de las integrinas [17, 21-24].

Como los otros miembros de la superfamilia de GPCRs, los receptores de quimiocinas también activan la vía canónica de las proteínas G. Estas proteínas ha sido un elemento importante de referencia para la clasificación de los GPCRs y como se mencionó brevemente en la sección de receptores de quimiocinas, las proteínas G se subdividen en 4 subfamilias: G_s , G_i , $G_{q/11}$ y $G_{12/13}$, donde cada familia activa diferentes vías, con implicaciones biológicas como son el metabolismo, la migración celular, la proliferación, la progresión tumoral y la metástasis (Fig. 9).

La proteína G es un heterotrímero constituido por una subunidad alfa (G_α) con actividad GTPasa intrínseca, una subunidad beta (G_β) y otra gamma (G_γ), las dos últimas formando un dímero. Se han encontrado varias isoformas de estas subunidades cuya combinación define los distintos tipos de proteínas G. Hasta el momento han sido identificadas 21 isoformas de subunidad G_α , 6 isoformas de subunidad G_β y 12 isoformas de G_γ [25].

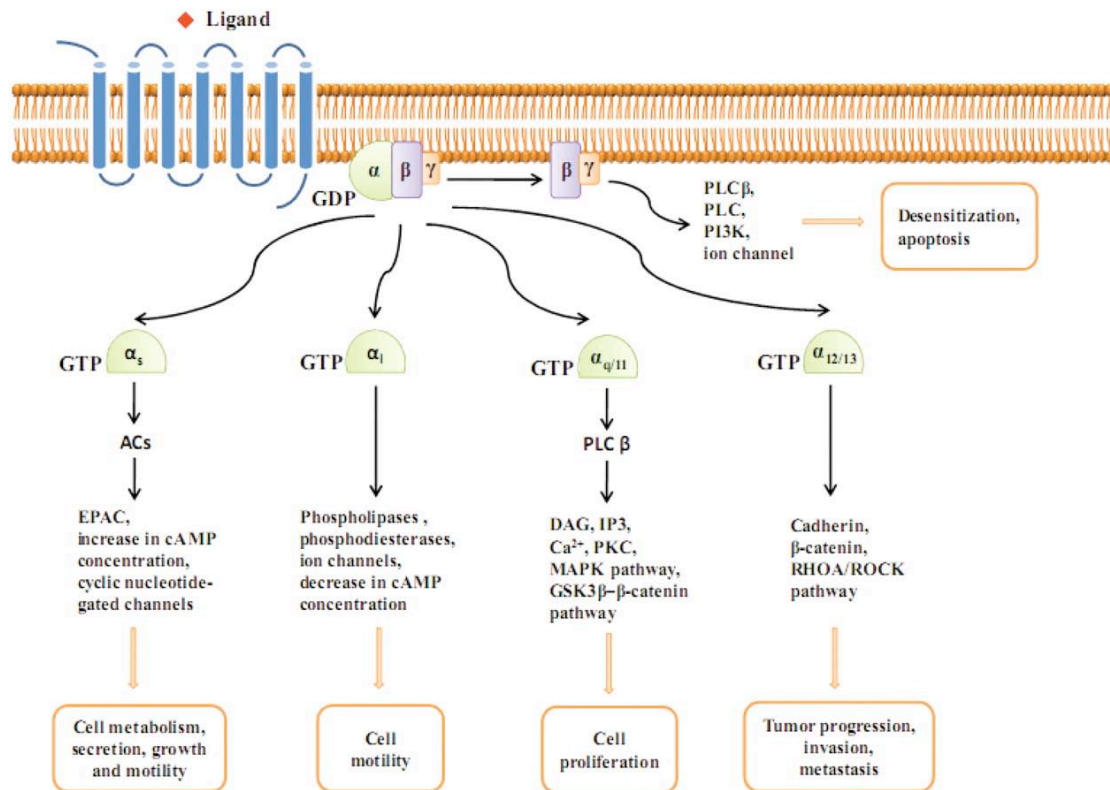


Figura 9.- Familias de las Proteínas G y las vías que activan. En la imagen se muestran las cuatro familias de proteínas G, que son Gs, Gi, Gq/11 y G12/13. Después de la activación del GPCR por su ligando, se regulan diferentes funciones biológicas, como son metabolismo, motilidad celular, proliferación, progresión tumoral, entre otras. Estas funciones biológicas dependen del tipo de proteína G α que se active. Tomado de Jinhua Wu, 2012.

En condiciones basales, la proteína G se encuentra como heterotrímero (G $\alpha\beta\gamma$), donde la G α está asociada al nucleótido GDP. En respuesta a la interacción ligando-receptor, se provoca un cambio alostérico de la G α , que expone el dominio tipo Ras, y con ello, el cambio del GDP por GTP, teniendo como consecuencia la activación de la G α y su disociación de G $\beta\gamma$ (el cual permanece unido como un dímero), y una vez disociados activan distintas moléculas efectoras (Fig. 9). La G α en estado activo tiene actividad GTPasa, por lo que rápidamente hidroliza el GTP a GDP, llevando a la reasociación con el dímero G $\beta\gamma$ y con esto restaurándose el estado inactivo del heterotrímero (Fig. 10) [25-27].

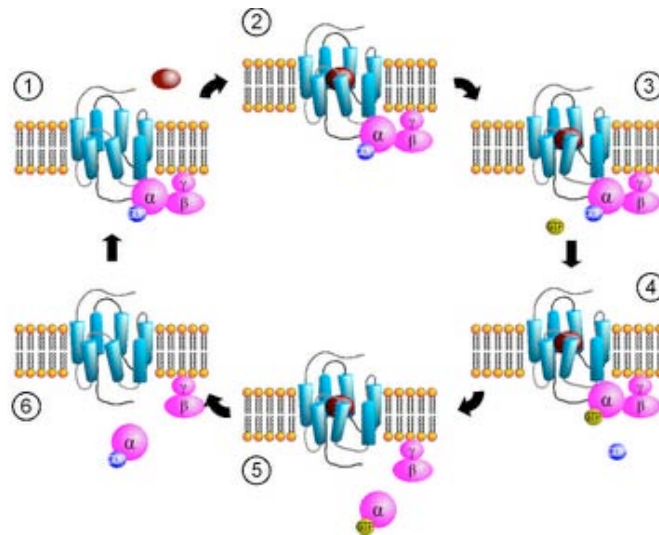


Figura 10.- Modelo de activación/inactivación del GPCR. 1) En estado de reposo, las proteínas G son heterotrómeros cuya $G\alpha$ está unida a GDP. 2,3) La unión ligando-receptor resulta en un cambio conformacional que lleva a la liberación del GDP. 4) Lo anterior induce la formación de un complejo estable y de alta afinidad entre el receptor activado y la proteína G. 5) Tras la liberación del GDP, se permite la unión del GTP a la subunidad alfa, lo que desestabiliza el complejo y causa la separación de la $G\alpha$ de $G\beta\gamma$ para permitir la interacción con proteínas efectoras. 6) La señal se termina mediante hidrólisis del GTP a GDP por la $G\alpha$ y la reasociación de esta subunidad con $G\beta\gamma$. Tomado de Sprang, 2007.

En el caso concreto del receptor CCR7 y CXCR4, ha sido ampliamente utilizada la toxina PTX para el estudio de la función y transducción de señales dependientes de estos receptores, ya que esta toxina altera la función de las proteínas $G\alpha$ de la subfamilia G_i . El mecanismo de acción de la PTX es bloquear la actividad GTPasa de la subunidad $G\alpha_i$ mediante ADP-ribosilación.

Tras la activación de los receptores de quimiocinas, la disociación de la subunidad $G\alpha$ de $G\beta\gamma$ permite la activación, iniciando cambios pleiotrópicos, en una gran diversidad de moléculas, como algunos tipos de PLC, que permiten la hidrólisis de PIP2 a IP3 y DAG, induciendo un incremento del Ca^{2+} citoplásmico mediante su liberación del retículo endoplásmico, así como la activación de la PKC, respectivamente.

En linfocitos T, se ha mostrado que la PI3K tipo IA es esencial para la quimiotaxis dependiente de GPCRs [28]. PI3K cataliza la formación de PIP3 a

partir de PIP2, efecto revertido por PTEN. Los fosfoinosítidos de membrana se acumulan en la cara interna de la membrana celular, sirviendo de anclaje para moléculas que se encuentran en el citosol, las cuales se unen mediante el dominio PH. En este sentido, PIP3 recluta a la cinasa Akt (también conocido como PKB) a la membrana para que PDK1 le fosforile en la treonina 308 y mTOR en la Serina 473, (descrito en el caso de los receptores acoplados a cinasas de tirosina) [29]. Sin embargo, también existe la propuesta de transfosforilación de Akt donde TCL1 (limitado a tejido linfoide) se uniría a Akt α y γ , induciendo su hetero-oligomerización y de esta forma Akt se podría transfosforilar en Serina 473 [30].

Se ha descrito que río bajo de la PI3K se activan GEFs como VAV que, a su vez, activan a GTPasas pequeñas de la familia Rho. Estas GTPasas participan en la reorganización del citoesqueleto que genera la formación del frente de migración o "*leading edge*" y el urópodo [31, 32]. Paralelamente al cambio de forma, se activan las moléculas Pyk2, FAK y paxilina, para permitir a la célula adherirse mediante activación de integrinas, lo que da un soporte mecánico al desplazamiento de la célula para la transmigración.

Por otra parte, se activa la molécula Src, resultando en la activación de las cinasas activadas por mitógenos MAPK, p38 y Erk1/2 que participan en la activación de la transcripción y diferenciación celular [33].

La vía de desensibilización del receptor también es dependiente de la proteína G, que tiene como función la regulación negativa de las señales activadas por el receptor de quimiocinas. La internalización del receptor depende de la activación de las moléculas GRK, β -arrestina y clatrina. Según el ligando que active al receptor será el tipo de desensibilización: internalización que lleve al reciclamiento del receptor o a su degradación [34, 35]. En el caso de CCR7, la activación por CCL19 tiene como consecuencia la internalización y degradación del receptor en lisosomas; mientras que su activación por CCL21 induce menos internalización en comparación con CCL19, y no tiene como consecuencia la degradación del receptor, sino el reciclaje que permite su reincorporación a la membrana plasmática. En el caso de CXCR4, su activación por CXCL12 tiene

como mecanismo de desensibilización la ubiquitinación del receptor y su degradación en lisosomas [36].

1.5. Reorganización del citoesqueleto

El citoesqueleto es un complejo de andamiaje dinámico, constituido por filamentos dispuestos por todo el citoplasma. No solo le confiere rigidez y estructura a la célula, sino también permite la organización subcelular y el transporte intracelular, la mecanotransducción de estímulos externos, así como la posibilidad de movimiento, división celular, entre otros [33, 37, 38].

El citoesqueleto se compone de tres diferentes clases de filamentos proteicos, ensamblados mediante uniones no covalentes entre los monómeros: microfilamentos o F-actina, microtúbulos y filamentos intermedios. En la migración celular se ha descrito como principales componentes responsables del proceso a la F-actina y a las proteínas motoras miosina II, que forman parte del complejo actomiosina [38].

1.5.1. Dinámicas de actina

El citoesqueleto de actina está en constante cambio, incluso en condiciones basales. Las dinámicas de actina se refieren al proceso de ensamble y desensamble de la F-actina, que permiten el mantenimiento o modificación de la forma celular y la generación de proyecciones membranales dependientes de actina. Tanto en condiciones basales como en respuesta a un estímulo, existe un recambio de la F-actina. Un linfocito T en reposo tiene actina formando parte de filamentos pero también en forma monomérica (Fig. 11). Los monómeros de actina (G-actina) se encuentran unidos a profilina o a β 4-timosina, moléculas encargadas de mantener y resguardar la reserva de G-actina, siendo en primera instancia la profilina quien cede más fácilmente el monómero de actina para la polimerización [39-41].

La G-actina tiene polaridad y cada monómero se orienta de la misma manera al polimerizarse, de tal forma que el filamento tiene diferente polaridad en cada extremo.

Los filamentos de actina son fibras delgadas, flexibles y polares. El filamento de actina tiene un extremo “más” o “barbado”, donde se puede incorporar rápidamente G-actina para un óptimo crecimiento del filamento. Es en este extremo donde la maquinaria de polimerización inicia la elongación de los filamentos. El otro extremo del filamento es el extremo “menos” o “en punta”, donde principalmente se despolimeriza el filamento, ya que es en este extremo donde la hidrólisis del ATP a ADP (regulada por el la propia actina) permite el desensamble de los monómeros, pero también se puede dar una lenta incorporación de monómeros cuando se requiera mayor polimerización (Fig. 12). [40].

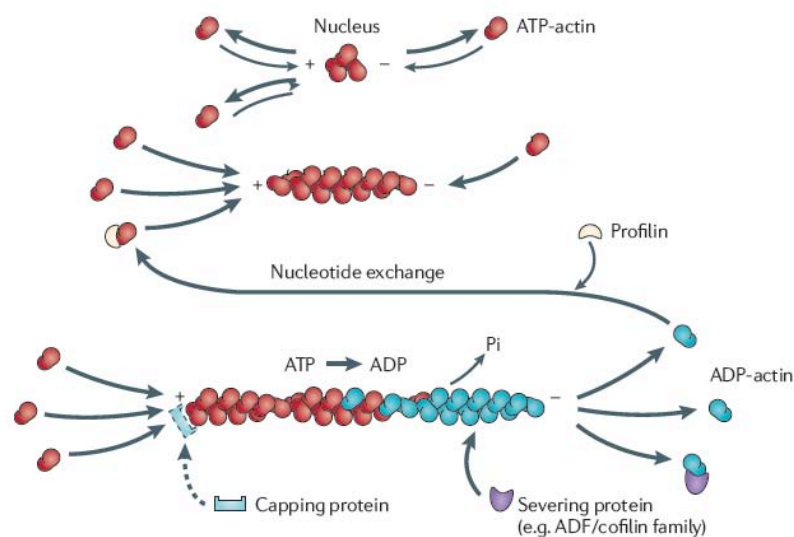


Figura 11.- Estados estructurales de la actina. G-actina y F-actina se muestran en la imagen. Los filamentos de actina son polímeros de actina enlazados formando una doble hélice levógira. Cada monómero de actina tiene polaridad, lo que le confiere al filamento también la misma característica. Tomado de Nürnberg, 2011.

Existe una gran diversidad de moléculas que se encuentran unidas a los filamentos de actina para conferirle estabilidad, flexibilidad, permitir la polimerización o despolimerización, entre otras funciones. A estas proteínas se les denomina como ABP, dentro de las que se encuentran las proteínas “capping” o de caperuza, que se unen al extremo “más” del filamento de actina

para prevenir la incorporación espontánea de monómeros de actina, algunas de las proteínas de caperuza son la Gelsolina y CapZ [42].

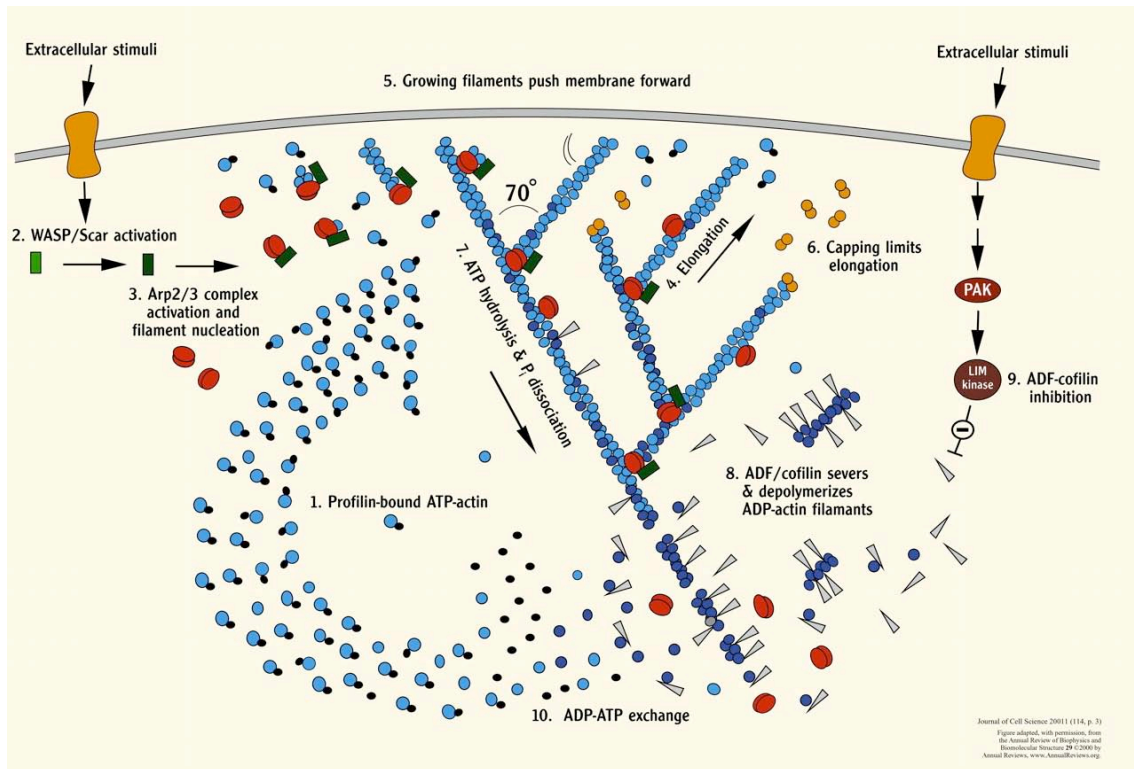


Figura 12.- El modelo de nucleación y polimerización de actina al frente de migración de células móviles.

La actina (cículos azules) al frente de migración de células migrantes se organiza en redes, con rápido crecimiento, llamados extremos barbados, proyectados hacia la membrana celular. La polimerización ocurre en los extremos barbados libres, generándose una fuerza anterógrada por el crecimiento rápido de los filamentos de actina, permitiendo la protrusión de la membrana. La iniciación de un nuevo filamento recae en el complejo Arp2/3 (cículos rojos), activado por las proteínas WASP, WAVE o SCAR (rectángulos verdes), que responden a una variedad de señales (forma amarilla a la izquierda). Las ramificaciones se generan por la unión del complejo Arp2/3 al lado de los filamentos preexistentes. Otras moléculas también participan en la generación de estructuras dependientes de actina, las cuales dependerán del contexto celular y del estímulo de que se trate.

Tomado de Pollard, 2001.

Otra de las proteínas fundamentales para el citoesqueleto de actina es el complejo Arp 2/3 (formada por las subunidades Arp2, Arp3 y otras 5 moléculas más) la cual es un factor de nucleación (generación de novo de un filamento de actina) y la polimerización (elongamiento de filamentos preexistentes), pero el tipo de filamento que forme dependerá de otras moléculas a las que se asocia para la polimerización, como es el caso de WASP, WAVE, entre otras. [40-44]

1.5.2. Familia de GTPasas Rho

La remodelación del citoesqueleto de actina es una consecuencia de muchos tipos de estímulos externos. En diversos tipos celulares, estas señales al interior de la célula convergen en un grupo de GTPasas de la familia de Rho [45]. Las tres principales subclases de GTPasas que participan en la reorganización del citoesqueleto en linfocitos son RhoA, Rac y Cdc42 y estas moléculas definen las estructuras de actina que se forman en la célula [46]. Dependiendo de la GTPasa que participe en un fenómeno será el tipo de remodelación y disposición de la F-actina (Fig. 13), así como los efectores moleculares activados en cada caso, que más adelante se detalla para cada GTPasa que interviene en la migración de los linfocitos T.

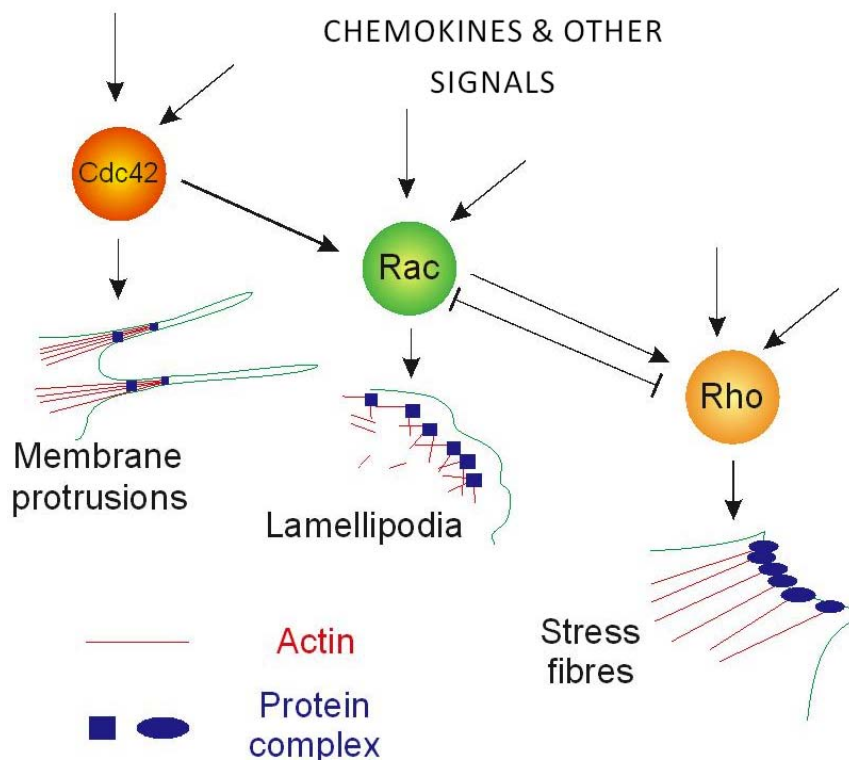


Figura 13.- Representación esquemática y simplificada de la secuencia de eventos en la activación de las GTPasas y las estructuras de actina dependientes de cada una en la migración de los linfocitos T. Las señales que activan a las GTPasas permiten la formación de estructuras de actina específicas. La activación de Cdc42 lleva a la formación de protrusiones finas, llamadas filopodios; Rac genera la formación de estructuras lamelares; Rho lleva a la generación de fibras de estrés, que son complejos motores. Tomado de Michael S. Samuel, 2011.

Las GTPasas en general tienen un ciclo de activación/inactivación mediado por el intercambio de GTP/GDP, respectivamente. Dicho intercambio es dado por moléculas GEFs que controlan la liberación de GDP de las proteínas Rho y su sustitución por GTP, llevando a un estado activo de la proteína Rho. Por otra parte, las moléculas GAPs facilitan la hidrólisis del GTP a GDP, lo que permite el retorno de la proteína Rho a su estado inactivo. Tanto GEFs como GAPs permiten la regulación del ciclo de las GTPasas de Rho, pero existe una gran diversidad de GEFs y GAPs pudiendo tener redundancia pero también especificidad según la célula y el estímulo que se trate. [45-47].

En linfocitos T, la GTPasa Cdc42 es la primera activada en respuesta a quimiocinas y es uno de los pasos iniciales que permiten una pérdida de simetría, conduciendo a la adquisición de una forma de mayor eficiencia para la migración [48]. Su activación se polariza al sitio donde la célula recibe el estímulo quimiotáctico, que en conjunto con WASP y su asociación con el complejo Arp2/3, conlleva la polimerización de actina para la formación de los filopodios, estructuras conformadas de filamentos de actina dispuestos paralelamente que generan protrusiones finas de la membrana celular.

En el mismo contexto del linfocitos T, posterior a la activación de Cdc42, se da la activación de Rac, la cual se asocia a WAVE y Arp2/3 para permitir la polimerización de actina en forma de redes, generando ramificaciones dispuestas a 70° con respecto al filamento de origen [43]. Estas redes permiten que la protrusión de la membrana sea más extensa, plana y alargada, a la que se denomina lamela. El lamelipodio es la estructura lamelar polarizada y orientada hacia el gradiente quimiotáctico.

Una vez que se ha establecido el frente de migración mediado por Cdc42 y Rac1, las señales moleculares, activadas por los receptores de quimiocinas, dan el “switch” de activación a la GTPasa RhoA [51], que es responsable de la activación de la cascada de señalización que conduce a la formación del urópodo, una estructura migratoria fundamental para el desplazamiento de la célula y con una capacidad de contracción y retracción que le confiere a la célula

una fuerza mecánica de empuje, mediada por la formación de focos de adhesión inmaduros [52].

Moléculas efectoras de RhoA son ROCK I y II, las cuales incrementan la actividad de la MLC, mediante dos vías: inhibición de su fosfatasa (MLCP) y activación mediada por fosforilación [53]. Lo anterior regula la contracción del complejo acto-miosina [54, 55]. Otra molécula efectora de RhoA es mDia, que participa en la nucleación y polimerización de filamentos de actina. Una vez generados los filamentos de actina, ROCK y sus efectores, permiten la unión de las proteínas motoras (miosinas) y la F-actina para formar complejos acto-miosina. [56].

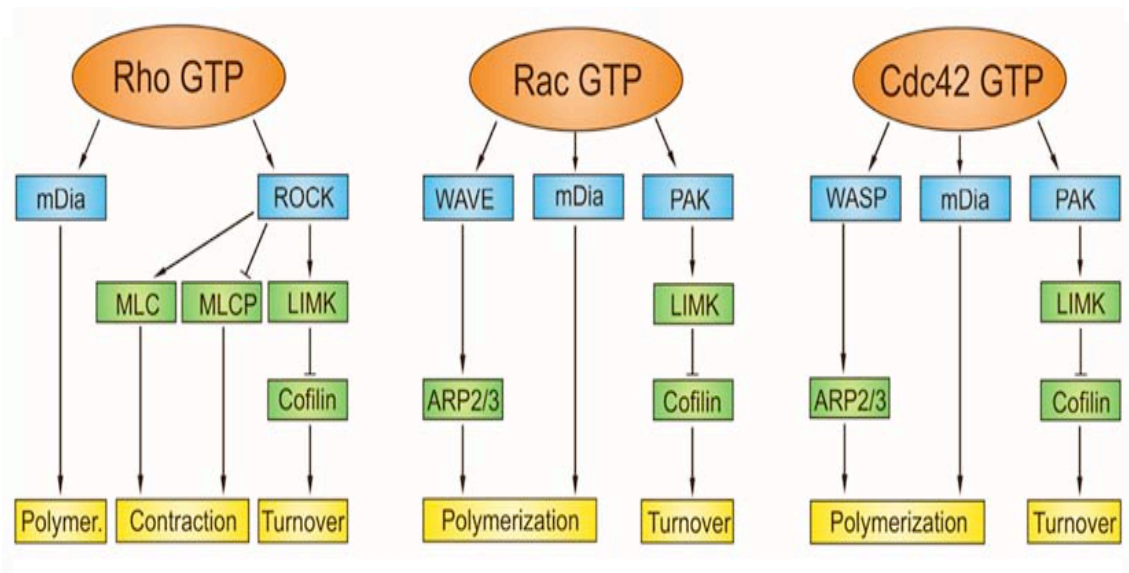


Figura 14.- Efectores de las GTPasas Rho para la formación de las estructuras de actina. Las GTPasas activas tienen como efectores varias moléculas como las forminas WASP, WAVE y mDia, las GEFs ROCK, PAK, entre otras. En general, mDia permite la nucleación de actina, mientras que WASP, WAVE y su interacción con el complejo ARP2/3 permiten la ramificación de los filamentos de actina. PAK fosforila a LIMK que a su vez fosforila e inactiva a cofilina. El efector de Rho, ROCK, promueve la interacción de los filamentos de actina con las miosinas y, por fosforilación directa de MLC y MLCP, regula la contractibilidad de las fibras de estrés y de las adhesiones focales, lo que repercute en la función del urópodo. Rac, por su parte activa la formación del lamelipodio, mientras que Cdc42 es el responsable de la formación de los filopodios. Tomado de Dráber, 2012.

1.5.3. Cinasas LIM

Existen dos isoformas de la cinasa LIM; LIMK1 y LIMK2, y éstas son reguladas de manera diferencial por las GTPasas Rho. LIMK1 es activada por PAK en la treonina 508, efector de Cdc42 y Rac, mientras que LIMK2 es activada en la treonina 505 por ROCK, efector de RhoA, y por el efector de Cdc24 (PAK) [58-60].

De manera interesante, las tres GTPasas activan a la molécula LIMK, que a su vez fosforila a cofilina, molécula reguladora de las dinámicas de actina, de la cual hablaremos en el siguiente apartado.

1.5.4. Familia de ADF/cofilina

El citoesqueleto de actina durante la migración celular requiere ser lo suficientemente dinámico para responder con eficiencia a los estímulos del microambiente. Para conferir ese dinamismo, existen moléculas con capacidad de despolimerizar y reorganizar los filamentos de actina, como es la familia de ADF/cofilina. En mamíferos, se expresan tres isoformas: ADF o destrina; cofilina-1, la más ampliamente expresada en células no musculares y altamente conservada; y cofilina-2, principalmente expresada en células musculares diferenciadas [61-63].

La función de ADF está bien establecida como molécula despolimerizadora de la F-actina, mientras que cofilina, a pesar de haber sido descrita como molécula despolimerizadora, actualmente se sabe que tiene una función reguladora de la polimerización y despolimerización de actina. Mediante estudios *in vitro*, se pudo analizar la función cualitativa de cofilina como un activador de las dinámicas del citoesqueleto de actina [64].

Cofilina es una proteína de 166 aminoácidos, con diferentes sitios de regulación: por fosforilación, en los residuos serina3 y tirosina68; por óxido-reducción, en residuos de cisteína; por unión a fosfolípidos (Fig. 15). [65]

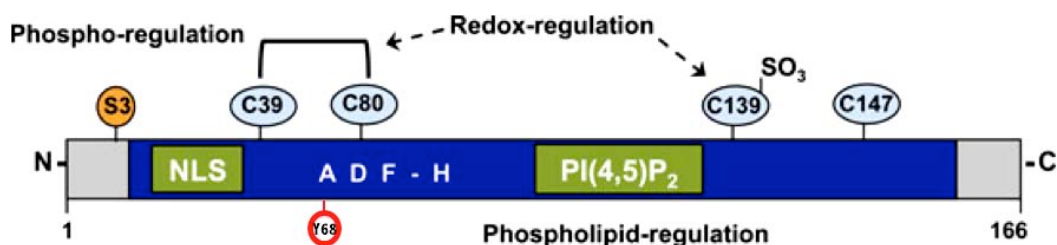


Figura 15.- Sitios de regulación de cofilina. Cofilina es una molécula que presenta diversos sitios de regulación. En la representación esquemática de cofilina se muestran sitios regulados por fosforilación (Ser3, Tyr68), de óxido-reducción (residuos de cisteína), y por fosfolípidos vía unión a PIP2. Modificado de Samstag, 2013.

Cofilina tiene la capacidad de unirse tanto a la ADP-actina como a ATP-actina, pero con una afinidad 100 veces mayor por la primera, y esto permite la interacción con la G-actina (a una relación molar de 1:1) y con la F-actina.

La visión de cofilina como un interruptor maestro de las dinámicas de actina se basa en que su interacción con la F-actina tiene las siguientes repercusiones: puede separar monómero por monómero de actina, y así despolimerizar; puede cortar los filamentos, generando nuevos extremos barbados, sitios de elongación de los filamentos preexistentes; tiene la función de nucleación cediendo la G-actina secuestrada; y también puede incrementar la flexibilidad de los filamentos al unirse a ellos (Fig. 16). [63-65].

La actividad y función de cofilina, regulada por fosforilación, es dependiente de cinasas y fosfatasas, de las que se destacan: LIMK1 y LIMK2 como fosforiladoras en serina 3 de cofilina, interfiriendo en su unión con actina y así presentando su estado inactivo; las fosfatasas PP1/PP2A [66], calcineurina (PP2B) [67], Slingshot (SSH1L, -2L y -3L) [68, 69] y cronofina [70], que desfosforilan la Ser3 y con ello activando a cofilina. Recientemente, se mostró que la fosforilación de la tirosina 68 regula la función de cofilina [71]. La actividad de cofilina también puede ser regulada por los fosfoinosítidos de membrana PIP y PIP2. La unión de cofilina a los fosfoinosítidos inhibe el dominio de unión a actina.

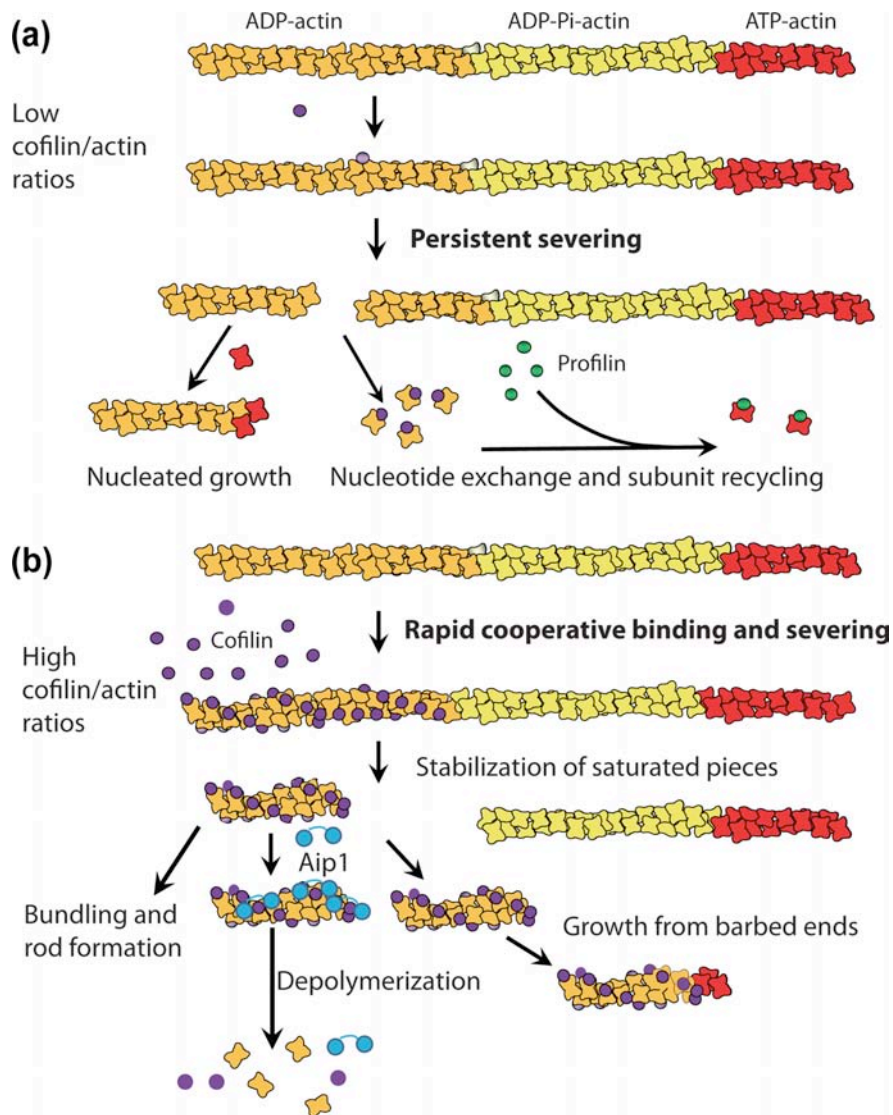


Figura 16.- Efectos de cofilina en las dinámicas de polimerización y despolimerización de la actina. a) La cofilina (morado) se une preferentemente a actina-ADP (naranja) y a baja estequiometría con respecto a las subunidades de actina, cortando los filamentos y de esta forma creando nuevos extremos barbados ("barbed ends") y en punta. La cofilina se disocia con una subunidad de actina en la forma ADP, y el cambio de nucleótido por Srv2/CAP1 (factor de intercambio para la unión a actina cuando esta acompañada con cofilina) y/o profilina (verde), ocurre en la actina. Cofilina puede reciclar a cortar de nueva cuenta. Los fragmentos de F-actina pueden permitir el elongamiento o la despolimerización de los filamentos. b) La cofilina también puede unir a actina pero con la finalidad de cooperar saturando el filamento de actina estabilizándolo. Puede darse la despolimerización pero no de manera persistente ya que la cofilina estará ocupada en las piezas de actina. La despolimerización se da en presencia de Aip1 (azul) para generar monómeros o para permitir el crecimiento de los filamentos preexistentes. Tomado de Bamburg, 2010.

Otro factor que influye en la unión de cofilina es su localización subcelular. En fibroblastos se ha visto a cofilina localizada en la membrana plasmática correspondiente al frente de migración, donde se da principalmente la polimerización de actina. Cofilina también se encuentra en el extremo citoplásmico de la estructuración del lamelipodio donde potencia el flujo anterógrado de los monómeros de actina, donde cientos de G-actina por segundo deben de ser removidos de los filamentos más viejos [72] controlando las dinámicas de actina en el lamelipodio [73].

En leucocitos y otras células, cofilina está presente en dos estados, tanto fosforilada como desfosforilada, pero se mantiene una mayor proporción de su estado inactivo vs su estado activo, entre el 80-90% de cofilina inactiva y el 10-20% de cofilina activa, ya que basalmente el citoesqueleto de actina también está en movimiento y participando en diversos procesos celulares. Los estímulos quimiotácticos inducen una activación sumamente rápida de cofilina, seguida de su inactivación, mientras que otro tipo de estímulos inducen principalmente su inactivación, pero en general, la cinética de activación/inactivación de cofilina es muy rápida [63].

1.6. Vía de las cinasa Janus o vía Jak/STAT

Las cinasas de la familia Janus participan en muchos procesos como desarrollo, supervivencia, crecimiento celular, así como en la diferenciación de muchos tipos celulares dentro de los que se destaca de manera crucial tanto el sistema nervioso como el inmunológico. En mamíferos, esta familia consta de 4 miembros, Tyk2, Jak1, Jak2 y Jak3, que comparten un peso molecular entre 120-140 kDa y 1100 aminoácidos de extensión, de gran homología estructural. Estas cinasas, por tener un dominio cinasa y uno pseudocinasa, reciben su nombre del dios romano Janus, de dos caras; de los inicios y los finales.

En humanos, el gen para Jak1 se localiza en el cromosoma 1p31.3, para Jak2 en el 9p24, para Jak3 y Tyk2 en el 19p13.1 y 19p13.2, respectivamente, mientras que en roedores se localizan en los cromosomas 4 para Jak1, 19 para Jak2 y 8 para Jak3 y Tyk2. [74, 75].

Estructuralmente, las cinasas Janus presentan cuatro dominios: un dominio cinasa (en el extremo amino) con capacidad catalítica; uno pseudocinasa, carente de actividad catalítica; uno SH2, de unión a tirosinas fosforiladas; y uno FERM (en el extremo carboxilo), de unión a proteínas transmembranales (Fig. 17). [75].

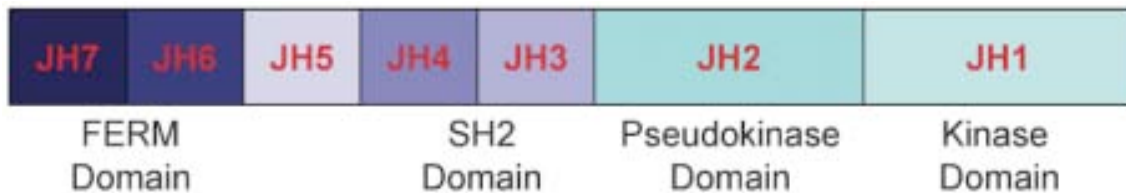


Figura 17.- Representación esquemática de la estructura de las Jaks. Los miembros de la familia de cinasas Janus están agrupados ya que comparten cuatro dominios estructurales y siete regiones homólogas (JH): el dominio de actividad cinasa con capacidad catalítica (JH1), el dominio pseudocinasa carece de actividad catalítica (JH2), el dominio SH2 (JH3, JH4) y el dominio FERM (JH6, JH7). Tomado de Ghoreschi, 2009.

La transducción de las señales mediadas por las Jaks se da tras la unión del ligando a su receptor, la cual induce un cambio conformacional de las cadenas del receptor, permitiendo trans- y/o auto-fosforilación de las Jaks asociados. Tras la activación de las Jaks, éstos a su vez fosforilan al receptor en tirosinas para generar sitios de unión y reclutamiento de los transductores de señal y activadores de transcripción STATs mediante el dominio SH2. Ya reclutados, los STATs son fosforilados por las Jaks, permitiendo que los STATs se homo- o hetero-dimericen y se transporten al núcleo para activar la transcripción de diferentes genes, dependiendo del receptor que se trate (Fig. 18) [75].

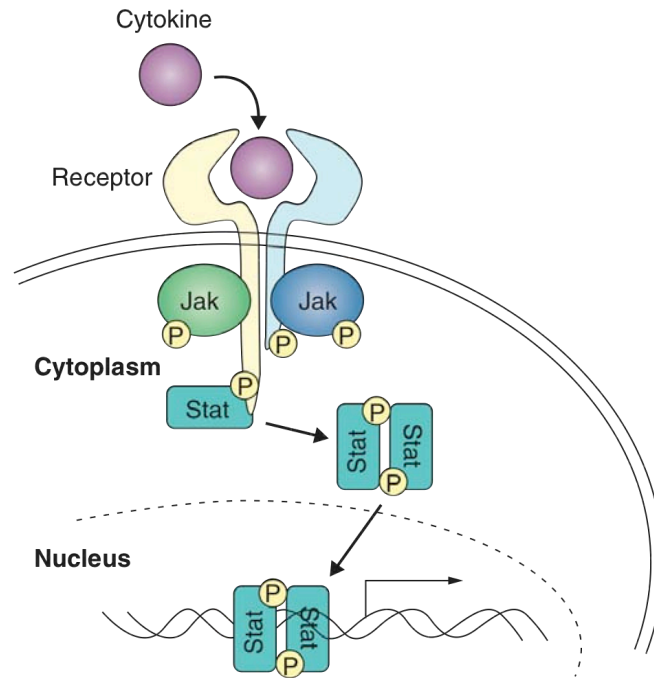


Figura 18.- Transducción de señales de los receptores de citocinas. La unión de las citocinas a los receptores, que se encuentran acoplados a las Jaks, causa un cambio conformacional que activa a las Jaks. El cambio conformacional permite que las Jaks, asociadas a las porciones intracelulares de los receptores, que se trans- y/o auto-fosforilen. Las Jaks una vez fosforiladas, fosforilan al receptor y estos sitios fosforilados sirven de reclutamiento y unión a STATs, que a su vez son fosforilados por las Jaks, formando dímeros de STATs y su transporte al núcleo, donde regula la expresión de genes. Tomado de Yamaoka, 2004.

Estas cinasas son fundamentales para la señalización de los receptores de citocinas (ver tabla 2), por lo que su deficiencia causa muy diversos efectos. La deficiencia de Jak1 solo se ha estudiado en ratones debido a que en humanos no han sido identificado algún paciente. En ratones carentes de esa cinasa causa muerte postnatal temprana, defectos neurológicos así como deficiencia inmunológica combinada severa. Estudios *in vitro* con células deficientes en Jak1 revelaron que no responden a IFN de tipo I y II.

La deficiencia de Jak2 tiene como consecuencia muerte embrionaria a causa de defecto en eritropoyesis. Mutaciones en Jak2 se han encontrado en tumores malignos, caracterizados por un exceso en proliferación de uno o varios tipos de linajes mieloides, así como en pacientes con leucemia mieloide (AML) y leucemia megacarioblástica (AMKL).

La deficiencia de Tyk2 es menos dramática, ya que son viables y fértiles. Presentan susceptibilidad a virus y parásitos pero resistencia a LPS y a artritis inducida por colágeno. La señalización en respuesta a IL-12 está fuertemente afectada en ausencia de Tyk2, así como la activación de STAT3 y STAT4, provocando un defecto de producción de IFN- γ por los linfocitos T. En humanos, hasta el 2009 solo se había identificado un caso de deficiencia en Tyk2. El paciente presentó infecciones oportunistas por virus, bacterias, hongos y otras características reportadas por los estudios realizados en el modelo murino. [74-76].

<i>Cytokine</i>	<i>JAK-kinase</i>	<i>SOCS/CIS/JAB proteins</i>	<i>STAT</i>
IL-2	Jak1, Jak2, Jak3	CIS1, CIS3, SOCS1	Stat5a, Stat5b, Stat3
IL-3	Jak2	CIS1, CIS2, CIS3, SOCS1	Stat3, Stat5a, Stat5b
IL-4	Jak1, Jak3	CIS1, CIS2, CIS3	Stat6
IL-5	Jak2	ND	Stat1, Stat3, Stat5a, Stat5b
IL-6	Jak1, Jak2, Tyk2	CIS1, CIS2, CIS3, SOCS1	Stat1, Stat3
IL-7	Jak1, Jak3	CIS1, CIS3	Stat5a, Stat5b, Stat3
IL-9	Jak3	ND	Stat5a, Stat5b, Stat3
IL-10	Jak1, Tyk2	CIS3	Stat1, Stat3
IL-11	Jak1, Jak2, Tyk2	CIS3	Stat3
IL-12	Jak2, Tyk2	CIS1, CIS3	Stat4
IL-13	Jak1, Jak2, Tyk2	CIS1, CIS3, SOCS1	Stat6
IL-15	Jak1, Jak3	ND	Stat5a, Stat5b, Stat3
IFN α/β	Jak1, Tyk2	ND	Stat1, Stat2
IFN γ	Jak1, Jak2	CIS1, CIS2, CIS3, SOCS1	Stat1
Epo	Jak2	CIS1, CIS2, CIS3	Stat5a, Stat5b
Tpo	Tyk2, Jak2	CIS1, CIS3	Stat5a, Stat5b
G-CSF	Jak2, Jak3	CIS1, CIS2, CIS3	Stat3
GH	Jak2	CIS1, CIS2, CIS3, SOCS1	Stat5a, Stat5b, Stat3
PRL	Jak2	CIS1, CIS2, CIS3, SOCS1	Stat5a, Stat5b
Leptin	Jak2	CIS1, CIS3	Stat3, Stat6, Stat5a, Stat5b
GM-CSF	Jak2	CIS1, CIS2, CIS3, SOCS1	Stat5a, Stat5b
CNTF	Jak1, Jak2, Tyk2	ND	Stat3
CT-1	Jak1, Jak2, Tyk2	ND	Stat3
LIF	Jak1, Jak2, Tyk2	CIS1, CIS2, CIS3, SOCS1	Stat3
OSM	Jak1, Jak2, Tyk2	ND	Stat3
EGF	Jak1	ND	Stat1, Stat3, Stat5
PDGF	Jak1	ND	Stat1, Stat3, Stat5
Insulin	Jak2	ND	Stat1, Stat5B

Tabla 2.- Citocinas y los miembros de la familia Jak que se asocian a sus receptores. En la tabla se enlistan los Jaks y STATs que se activan en respuesta a las citocinas, así como los reguladores negativos de la vía que participan en cada caso. Modificada de Sushil, 2000.

Jak3 tiene una expresión restringida a las células de origen hematopoyético, y se asocia a la cadena gamma común de los receptores para las interleucinas (IL) -2, -4, -7, -9, -15 y 21 [76]. Su deficiencia o mutaciones que alteren su función de cinasa de tirosina, tanto en humanos como en ratones, resultan en inmunodeficiencia combinada severa (SCID) [77]. En ratones, la deficiencia de Jak3 causa defecto en células T, B y NK, y en humanos el defecto es en los

linfocitos T y las células NK, pero presentan números normales o incrementados de linfocitos B. Estas diferencias se atribuyen a la ausencia de señalización por IL-7, que actúa como factor de crecimiento de células pre-B en ratones pero no en humanos. [75]. Además, en los pacientes deficientes en Jak3, los linfocitos B tienen alterada su función, porque las citocinas IL-4 e IL-21 regulan la producción de anticuerpos y la maduración de los linfocitos B a células plasmáticas.

El fenotipo de los ratones deficientes en Jak3 presenta características fácilmente distinguibles al diseccionarlos, ya que su timo está severamente hipoplásico con una reducción de 10 a 100 veces en la celularidad, sus ganglios linfáticos son casi imperceptibles (exceptuando uno o dos mesentéricos) y los ratones adultos tienen esplenomegalia. Los ratones recién nacidos presentan disminución en el conteo de linfocitos T periféricos, pero se normalizan al llegar a la adultez (exceptuando los linfocitos T CD8+) [78]. Por otra parte, linfocitos T pueden ser activados a través de su TCR en coestímulo con CD28 pero fallan en proliferar y son más susceptibles a morir por apoptosis, o quedar anérgicos-activados, además de secretar menos IL-2 [79].

2. Antecedentes

2.1. Jak3 en migración

El hecho que tanto el timo como los ganglios linfáticos presenten una celularidad disminuida, pero que en circulación peritérica y en el bazo la cantidad de linfocitos T no estén disminuidos [78], fueron indicios que llevaron a iniciar el estudio de la capacidad de migración de los linfocitos T por parte de nuestro grupo de trabajo y diversos grupos en el mundo, teniendo como producto una serie de resultados sumamente interesantes vinculando a Jak3 y la migración celular en respuesta a quimiocinas [76-80].

En la actualidad, existen evidencias sólidas sobre la participación de las cinasas Janus en la migración en respuesta a quimiocinas de diferentes tipos celulares. En particular, se ha establecido la participación de Jak3 en la migración de los linfocitos dependiente de las quimiocinas CXCL12 [81, 82, 84], CCL25 [82], CCL19 y CCL21 [83]. En estos estudios se analizó tanto por inhibición farmacológica o mediante el uso de ratones deficientes para la cinasa Jak3, que los linfocitos T no migraban en respuesta a las quimiocinas, siendo un efecto intrínseco de las células y no por defectos en la expresión en superficie de los receptores.

Estudios recientes han mostrado la participación de Jaks en la adhesión de linfocitos T dependiente de las quimiocinas CCL21 [85] y CXCL12 [85, 86, 87]. En ambos estudios se muestra que la activación de la integrina LFA-1 es dependiente de Jaks en respuesta a las quimiocinas en linfocitos T.

Otros estudios muestran el vínculo entre Jaks y moléculas que participan en las dinámicas del citoesqueleto en respuesta a quimiocinas [86-89]. En el caso específico para Jak3, aún se desconoce el mecanismo mediante el cual esa cinasa participa en la transducción de señales mediada por las quimiocinas. Existen estudios que muestran otras cinasas Janus incidiendo en moléculas importantes para el rearrreglo del citoesqueleto. Particularmente, Jak2 se mostró que es requerido para la activación de PI3K, FAK y paxilina en células progenitoras

hematopoyéticas en respuesta de CXCL12 [86]. También, Jak2 puede inducir la formación del complejo de CCR2/Lyn/Paxillin/Stat3 en macrófagos peritoneales estimulados con CCL2. [88]. Así mismo, se mostró que Tyk2 y Jak1 interaccionan con Jamip-1, componentes del citoesqueleto de tubulina, en células T Jurkat, siendo esto sugerente de la participación de los Jaks en la polarización celular y migración inducida por quimiocinas. [89].

Por otra parte, se observó que la migración de enterocitos en respuesta a IL-2 requiere de Jak3 para la redistribución de F-actina. Pero también en ese mismo estudio los autores mostraron el requerimiento de Jak3 para la fosforilación de vilina [90]. Otro estudio reciente muestra que las proteínas de unión a actina vilina y gelsolina tienen interacción directa con Jak3 en células epiteliales intestinales. [91]. En el mismo año, se mostró que Jak3 inhibe la función como GEF de la fosfolipasa D2 sobre Rac2, durante la quimiotaxis de los neutrófilos hacia IL-8. [92].

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha establecido la participación de la cinasa Jak3 en la migración de los linfocitos T dependiente de CCR7 y CXCR4, sin embargo se desconoce la contribución de esta cinasa en la migración dependiente de las quimiocinas CCL19, CCL21 y CXCL12, ya que en ausencia de la cinasa Jak3 los linfocitos T estimulados con estas quimiocinas no migran. Diversos estudios sugieren el vínculo entre miembros de la familia Janus y cinasas del citoesqueleto, mostrando que cinasas Jak se requieren para la activación de cinasas que participan en la reorganización del citoesqueleto [86-92], además de datos preliminares de nuestro laboratorio donde se analizó mediante microscopía confocal la adquisición del fenotipo migratorio en respuesta a quimiocinas sugirieron un posible retraso en la adquisición de dicho fenotipo en los linfocitos deficientes de Jak3 en respuesta a CCL21 (G.S., observaciones no publicadas).

Puesto que la reorganización del citoesqueleto de actina es fundamental para la migración celular, nos interesa dilucidar a qué nivel de la transducción de señales activadas por los receptores de quimiocinas se ve afectada la migración de los linfocitos T en ausencia de Jak3 y si la ausencia de esta cinasa está afectando las vías de señalización involucradas en la reorganización del citoesqueleto, induciendo un ineficiente rearrreglo del citoesqueleto en respuesta a las quimiocinas, y por ello, un defecto en la migración celular.

El caracterizar el papel de Jak3 en la migración de los linfocitos T dependiente de CCR7 y CXCR4 ayudará al entendimiento de la reorganización del citoesqueleto durante la migración celular y la importancia que tienen las estructuras dependientes de actina que se forman en respuesta a las quimiocinas.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

En ausencia de Jak3, los linfocitos T presentan una migración deficiente dependiente de CCR7 y CXCR4, debido a defectos en la reorganización del citoesqueleto de actina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Investigar el papel de Jak3 en las vías de señalización dependientes de CCR7 y CXCR4 que conducen a la reorganización del citoesqueleto de actina en linfocitos T.

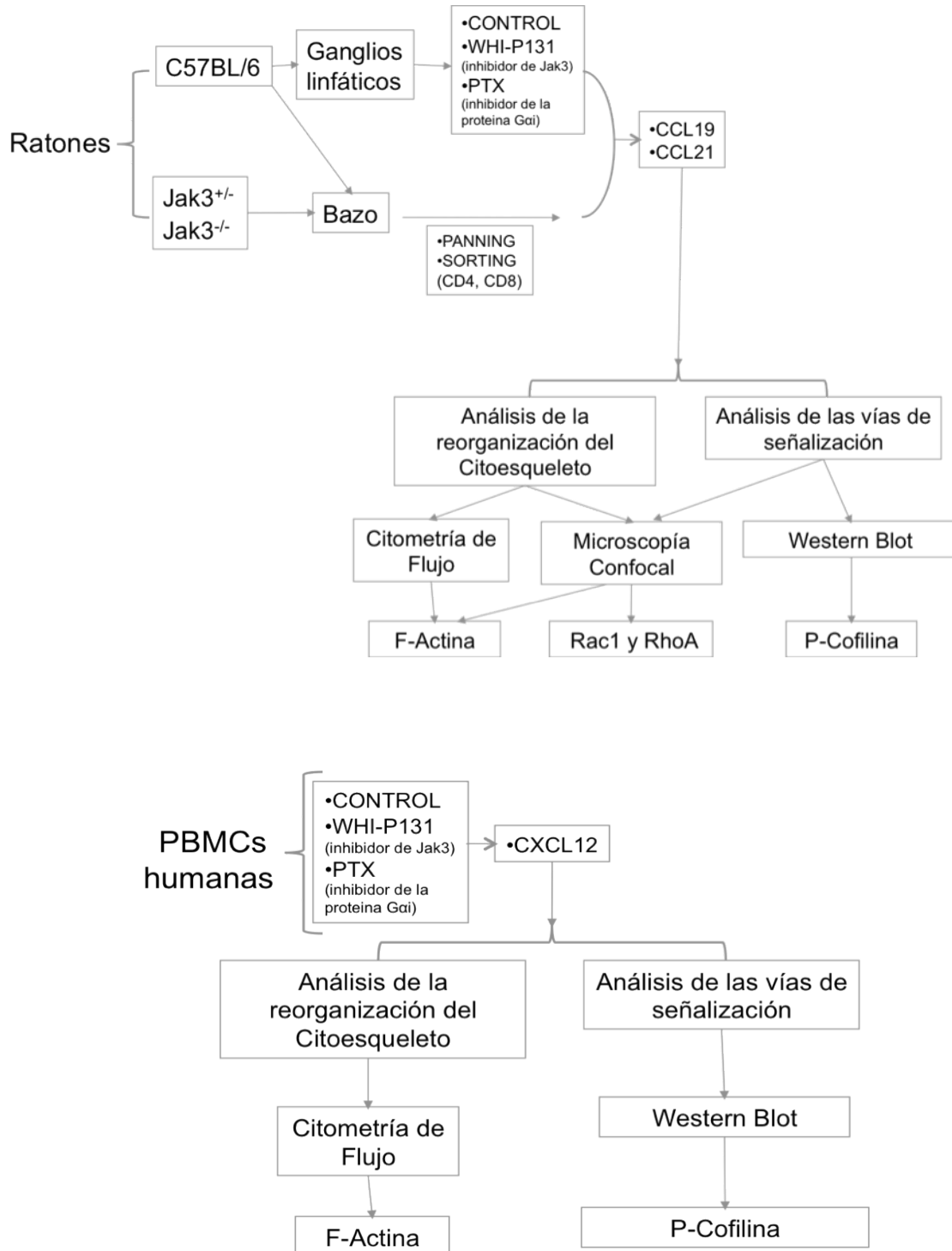
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar el cambio de forma y la adquisición del fenotipo migratorio de linfocitos de ratones C57BL/6 Jak3^{+/+} tratados o no, con el fármaco WHI-P131 o PTX en respuesta de la activación de CCR7.
- Analizar la polimerización de actina en linfocitos T vírgenes de ratones C57BL/6 Jak3^{+/-}, Jak3^{-/-}, así como en linfocitos de ratones Jak3^{+/+} tratados o no, con el fármaco WHI-P131 o PTX en respuesta a la activación de CCR7.
- Analizar la polimerización de actina en células humanas de sangre periférica (PBMC) tratadas o no, con el fármaco WHI-P131 o PTX en respuesta a la activación de CXCR4.

- Determinar la cinética de fosforilación de cofilina en linfocitos de ratones C57BL/6 Jak3^{+/+} tratados o no, con el fármaco WHI-P131 o PTX en respuesta a la activación de CCR7,
- Determinar la cinética de fosforilación de cofilina en células humanas PBMCs tratadas o no, con el fármaco WHI-P131 o PTX en respuesta a la activación de CXCR4.
- Determinar la cinética de activación de las GTPasas Rac1 y RhoA dependiente de CCR7, en linfocitos de ratones C57BL/6 Jak3^{+/+} tratados o no, con el fármaco WHI-P131 o PTX .

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

A continuación se muestra un esquema general de la estrategia experimental del presente trabajo.



6. MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones. Ratones Jak3^{-/-} o Jak3^{+/-} de la cepa C57BL/6 fueron obtenidos de los laboratorios Jackson y mantenidos en condiciones libres de patógenos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Los ratones fueron usados entre la 3^a y 6^a semana de vida. Todos los experimentos fueron desarrollados bajo los lineamientos éticos del Instituto de Investigaciones Biomédicas y bajo la aprobación del "Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL)" del Instituto.

Células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs).

Las células fueron aisladas mediante gradiente de densidad a partir de paquetes leuco-plaquetarios de sangre periférica de donadores sanos obtenidos del banco de sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México D.F., usando *Ficoll-Paque PLUS* (GE Healthcare, Suecia). Las células mononucleares se aislaron y lavaron cuatro veces con PBS pH 7.5 previamente a su uso. El protocolo fue aprobado por el Comité Bioético de Investigación Humana (CEISHUM) del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Reactivos y anticuerpos. Quimiocinas: CCL19 y CCL21 murinas recombinantes y CXCL12 humana fueron obtenidas de PeproTech (Rocky Hill, NJ). Inhibidores: El inhibidor específico de Jak3 WHI-P131 (30 µg/mL, Calbiochem, San Diego, CA), la toxina pertussis (PTX, 200ng/mL, (Sigma Chemicals, Saint Louis, MO) o el buffer de control de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma Chemicals), fueron usados en los experimentos en los casos de experimentación con linfocitos T de ratones silvestres. Anticuerpos: Los anticuerpos primarios empleados para el análisis mediante inmunoblot fueron los siguientes: policlonal de conejo anti-phospho-cofilina 1 (mSer3) y anti-actina fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA; como reactivos secundarios se utilizaron

anticuerpos anti-conejo y anti-raton conjugados con peroxidasa (HRP) (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Amersham, Buckinghamshire, UK) .

Para los ensayos de inmunofluorescencia, los anticuerpos anti-RhoA-GTP y anti- Rac1-GTP de raton (New East, Biosciences, Whitewoods Lane, Malvern, PA), así como faloidina rodaminada (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) fueron usados, seguido del anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 cabra anti-ratón IgG (Molecular Probes, Invitrogen Inc.). El medio de montaje para fluorescencia fue adquirido de Dako (Dinamarca A/S).

Videomicroscopía de “time-lapse”

Para los ensayos funcionales de migración ex-vivo se usaron 2×10^5 células de ganglios linfáticos periféricos colocadas en cámaras *Lab-Tek™ Chamber Slide™* y mantenidas a 37°C a lo largo del monitoreo de la respuesta a las quimiocinas. La adquisición de las secuencias se hizo mediante una videocámara digital a color Evolution VF acoplada a un microscopio invertido Olympus IX50 con objetivo LC Plan FL 40X. Las capturas se hicieron cada 3 segundos a lo largo de la secuencia total de 25 minutos. Todas las imágenes fueron procesadas mediante el software *Image-Pro Plus version 7.0* (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD).

Análisis de polimerización de actina.

La polimerización de actina se determinó mediante tinción con NBD-falacidina-FITC (Molecular Probes, Invitrogen Inc.) y el análisis de la intensidad de fluorescencia se hizo por citometría de flujo.

Para los ensayos de inhibición se utilizaron 1×10^6 células de ganglios linfáticos periféricos de ratones Jak3^{+/+}, las cuales fueron incubadas por 2 horas a 37°C (en medio RPMI, 10% de suero fetal bovino, SFB) en presencia del inhibidor específico de Jak3 WHI-P131, PTX o DMSO. Las células fueron lavadas dos veces con RPMI y estimuladas de 0 a 5 minutos con la quimiocina CCL19 o CCL21 (300ng/mL). Cada tiempo de estimulación fue detenido mediante la adición de

formaldehído (3.7% de concentración final) y se incubaron por 1 hora entre 15 y 18°C en obscuridad. Posteriormente, se permeabilizaron e incubaron por 1 hora más con un buffer en presencia de lisofosfatidilcolina (0.25mg/mL), 0.78 unidades de NBD-falacidina-FITC, formaldehído (7.4%) en PBS (1X).

Se realizaron experimentos similares usando linfocitos T totales de bazo de ratones Jak3^{+/+} o Jak3^{-/-}, de entre 3 y 6 semana de vida, enriquecidos mediante la técnica de “*Panning*”, un tipo de selección negativa utilizando el anticuerpo anti-B220 para eliminar los linfocitos B [83]. Después del enriquecimiento de los linfocitos T, las células fueron lavadas y estimuladas con CCL19 o CCL21. Por último, células humanas PBMCs fueron estimuladas con CXCL12 (300ng/mL), siguiendo el mismo protocolo empleado para las células murinas.

Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACScalibur® (BD) y los datos fueron analizados con el software FlowJo 8.7 (Tree.Star, Inc., Ashland, OR). Todos los análisis se hicieron bajo la delimitación de la región correspondiente al tamaño y granularidad de las células vivas, en las gráficas de puntos. Se calculó el incremento relativo (IR) como la relación entre el valor de intensidad de fluorescencia (IMF) de las células estimuladas con respecto a las células no estimuladas (basales).

Análisis de la fosforilación de cofilina.

Células murinas de ganglios linfáticos periféricos o PBMCs humanas fueron pre-tratadas con DMSO, WHI-P131 o PTX y estimuladas con CCL21 o CXCL12 (300ng/mL), respectivamente, de 0 a 5 minutos, en medio RPMI con 10% de SFB, a 37°C. Posteriormente, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en un buffer de lisis con 1% de Tritón X-100 e inhibidores de fosfatasas y proteasas, como se describe [82]. Los lisados totales fueron hervidos por 10 min a 95°C y separados en un gel SDS-PAGE 12%, mediante electroforesis y transferido a una membrana de polivinilo (PVDF) (Immobilon, 0.45 µm, Millipore Corporation, Bedford, MA). Las membranas fueron bloqueadas con una solución al 5% de BSA (Research Organics, Cleveland, OH) en TBS 1X,

seguido de la incubación con el anticuerpo anti-fosfo-cofilina y otra incubación posterior con el anticuerpo secundario conjugado con HRP. La detección de la señal se hizo mediante quimioluminiscencia utilizando la peroxidasa de rábano para *western blot* de la compañía Pierce (Pierce, Rockford, IL). Como control de carga se usó el anticuerpo anti-actina. Se utilizaron placas de autoradiografías (Kodak) las cuales se digitalizaron y la intensidad de la señal se cuantificó mediante el software ImageJ 1.46r (National Institutes of Health, USA). Los datos obtenidos del análisis densitométrico se expresaron como “Índice de P-Cofilina”, calculado como la relación entre los valores de densidad óptica de P-cofilina/actina.

Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Después de ser estimuladas, las células se fijaron en una solución de formaldehído al 3.7% en PBS 1X, y puestas en portaobjetos de vidrio tratados con poli-L-Lisina. Una vez que las células quedaron sedimentadas en los cubreobjetos, se permeabilizaron con Tritón-X100 al 0.1% por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se bloquearon con PBS-1X/0.05% Tween20 + 1% BSA y se incubaron con los anticuerpos monoclonales anti-RhoA-GTP o anti-Rac1-GTP (Neweast Bioscience PA), dirigidos a las formas activas de las proteínas, a una dilución de 1:75 en PBS-1% BSA por una hora a 37°C. Después de la incubación, las muestras se lavaron tres veces con una solución de PBS/0.05% Tween20 y se tiñeron por 1 hora con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG acoplado a Alexa-Fluor 488 a una dilución de 1:200 en PBS 1X/0.05% Tween20 + 1% BSA. La actina filamentosa se tiñó con faloidina-rodamina por 20 minutos a una dilución de 1:200 en PBS 1X, y posteriormente fue retirada mediante lavados con PBS 1X. Los cubreobjetos se montaron con en medio de montaje para fluorescencia de Dako. La observación de las células se hizo con el microscopio confocal Zeiss LSM5 equipado con el software LSM 5 PASCAL 2.8 y el análisis de las imágenes se hizo con el software ImageJ 1.46r.

Los datos obtenidos fueron normalizados calculando el IR como la relación entre el promedio de IMF de cada célula estimulada y el promedio de IMF de las células sin estimular.

Análisis estadístico.

Los datos se muestran como valores promedio \pm SEM. Las gráficas representan un experimento representativo, o el promedio de por lo menos tres experimentos independientes. La significancia de los resultados fue calculada mediante la prueba de t de Student (pareada o no pareada) utilizando el software de análisis estadístico GraphPad Prism 4.0b (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Los valores de p se muestran en cada figura.

7. RESULTADOS

La inhibición farmacológica de Jak3 tuvo como resultado una deficiente adquisición del fenotipo migratorio en respuesta de CCL21.

Se ha establecido que Jak3 participa en la migración de los linfocitos T dependiente de quimiocinas por nuestro grupo de trabajo y otros [82-85, 93]. Debido a que la adquisición del fenotipo migratorio es un requisito para permitir la migración celular, el primer paso fue analizar la respuesta celular a las quimiocinas por la técnica de video-microscopía de time-lapse. En la figura 19 (a) se muestra una representación esquemática de los fenotipos característicos de las células no polarizadas, polarizadas y migratorias que se adquieren en respuesta a la quimiocina CCL21, donde las células no polarizadas no presentan prolongaciones evidentes de su membrana celular, las células polarizadas cuentan con extensiones de estructuras lamelares o lamelipodio, y las células migratorias son aquellas que presentan un frente de migración o “*leading edge*” y el urópodo. En la misma figura (b) se muestran las imágenes representativas de células a diferentes tiempos de estimulación tomados de la video-microscopía.

Como se muestra en la figura 20 (a), las células control (tratadas con 0.06% de DMSO), fueron capaces de generar, en un 36.6% de las células analizadas, la forma característica del fenotipo de una célula en migración, mientras que solo el 16.7% de las células tratadas con WHI-P131 y un 7.6% de las células tratadas con PTX fueron capaces de generar algún cambio de forma en respuesta a la quimiocina CCL21.

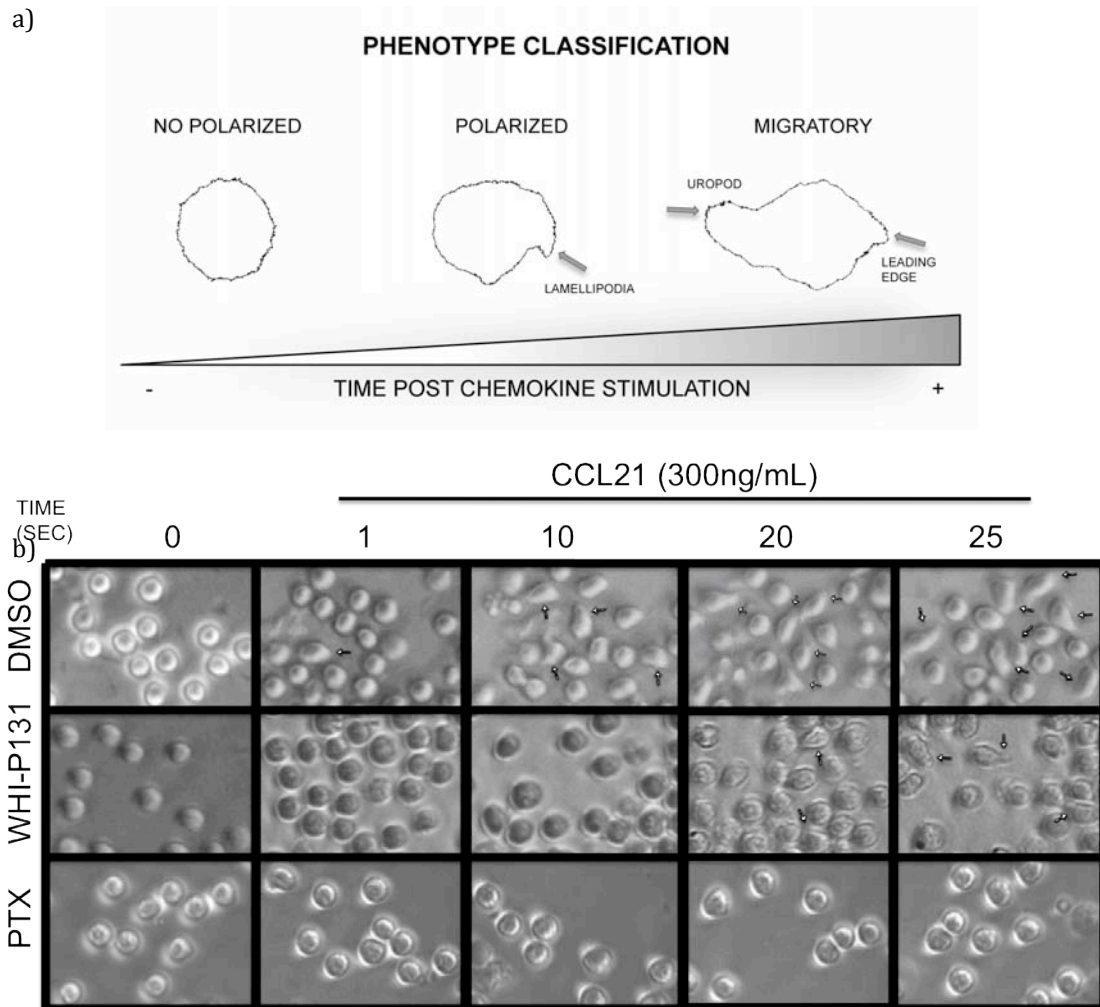


Figura 19.- La motilidad y la migración de los linfocitos está disminuida en ausencia de la actividad de Jak3. El análisis de la videomicroscopía de Time-lapse de células primarias provenientes de ratones silvestres para Jak3 pretratadas con DMSO, WHI-P131 o PTX, y estimuladas por 25 minutos con la quimiocina CCL21 (videos 1, 2 y 3). Representación esquemática de los fenotipos adquiridos por los linfocitos en respuesta a la estimulación y considerados para las cuantificaciones, con base en las estructuras migratorias generadas (a). Imágenes seleccionadas de uno de tres experimentos independientes, correspondientes a los 0, 1, 10, 20 y 25 minutos de la secuencia total de video-microscopía (b). Las flechas indican células polarizadas o con fenotipo migratorio.

Se hizo un análisis a mayor detalle del cambio de forma y estructuras generadas por las células en respuesta a la quimiocina (Fig. 20b), encontrando que el 24.4% de las células control formaron un frente de migración y un urópodo bien delimitados (fenotipo migratorio), mientras que solo el 12.2% de este grupo de células generó únicamente el frente de migración, sin formar el urópodo. Las células que mostraron el fenotipo migratorio también presentaron los movimientos característicos de retracción-contracción en respuesta al gradiente de quimiocina (video 1).

Por el contrario, la inhibición farmacológica de Jak3 produjo una disminución evidente en la motilidad celular (video 2) ya que solo el 16.7% de los linfocitos T tratados con el inhibidor WHI-P131 fueron capaces de responder a la quimiocina (Fig. 20a). A pesar de que un 5% de células pudieron adquirir un fenotipo migratorio, estas presentaron una motilidad disminuida y rigidez en el urópodo (Fig. 20b y video 2). De manera interesante, el porcentaje de células capaces de generar solo el frente de migración en células tratadas con WHI-P131 (11%) no mostró disminución respecto a las células control (12.1%), mientras que, de las células tratadas con PTX, solo un bajo porcentaje fueron capaces de generar un frente de migración (solo el 1.7%) así como en la adquisición del fenotipo migratorio (solo el 1.9%) (Fig. 20b y video 3).

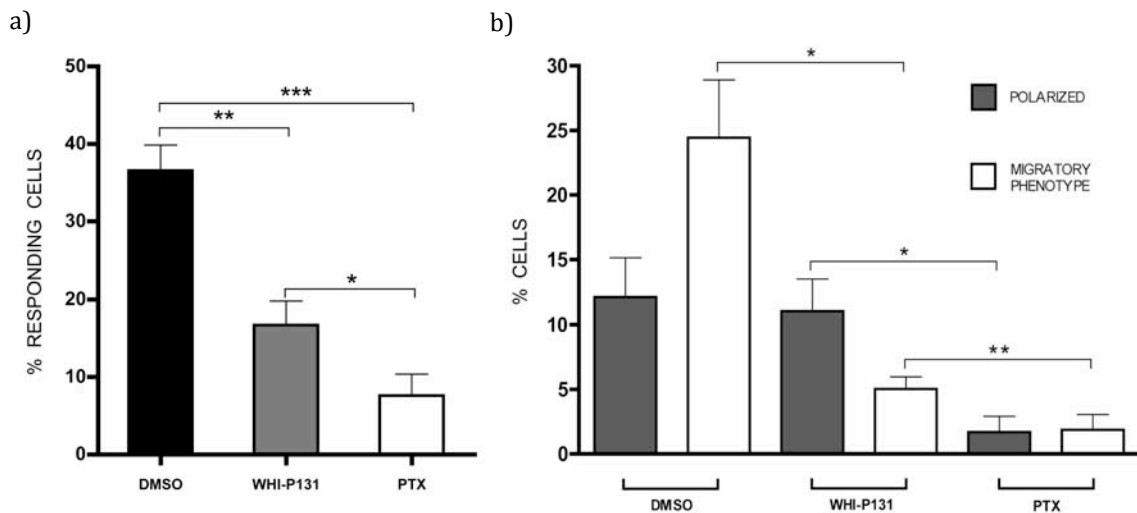


Figura 20.- Cuantificación de la respuesta morfológica de las células observada tras a estimulación con CCL21. Las gráficas muestran los porcentajes de células que generaron cambio de su forma, representada como *responding cells* (a) o como porcentaje de células formando estructuras migratorias (b), clasificadas como “*polarized*” (presentando solo el frente de migración “*leading edge*”) o “*migratory phenotype*” (con el frente de migración y urópodo). Las barras representan el promedio de los valores de tres experimentos independientes \pm SEM. La significancia estadística se determinó mediante T de *Students* pareada de una sola cola. Los asteriscos indican * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La inhibición de Jak3 produjo una deficiente polimerización de actina en respuesta a CCL19, CCL21 y CXCL12.

Para dilucidar el vínculo posible entre Jak3 y las dinámicas del citoesqueleto de actina, se determinaron los niveles de F-actina inducidos por las quimiocinas a diferentes tiempos mediante el análisis por citometría de flujo de linfocitos T

aislados del bazo de ratones $Jak3^{-/-}$ o $Jak3^{+/-}$. En respuesta a las quimiocinas CCL19 y CCL21, la cantidad de F-actina aumentó sumamente rápido, a tan solo 10 segundos de estimulación en los linfocitos T totales de ratón $Jak3^{+/-}$. El incremento se mantuvo hasta los 30 segundos de estimulación, regresando a los niveles iniciales a los 300 segundos. En contraste, los linfocitos T totales $Jak3^{-/-}$ (Fig. 21), así como los linfocitos T $CD4^{+}$ purificados $Jak3^{-/-}$ (anexo 1a) presentaron una marcada disminución del incremento de F-actina inducido por la quimiocina CCL21, de hecho, la diferencia fue de 5.6 veces menor en los linfocitos T $Jak3^{-/-}$ en comparación con los linfocitos T $Jak3^{+/-}$.

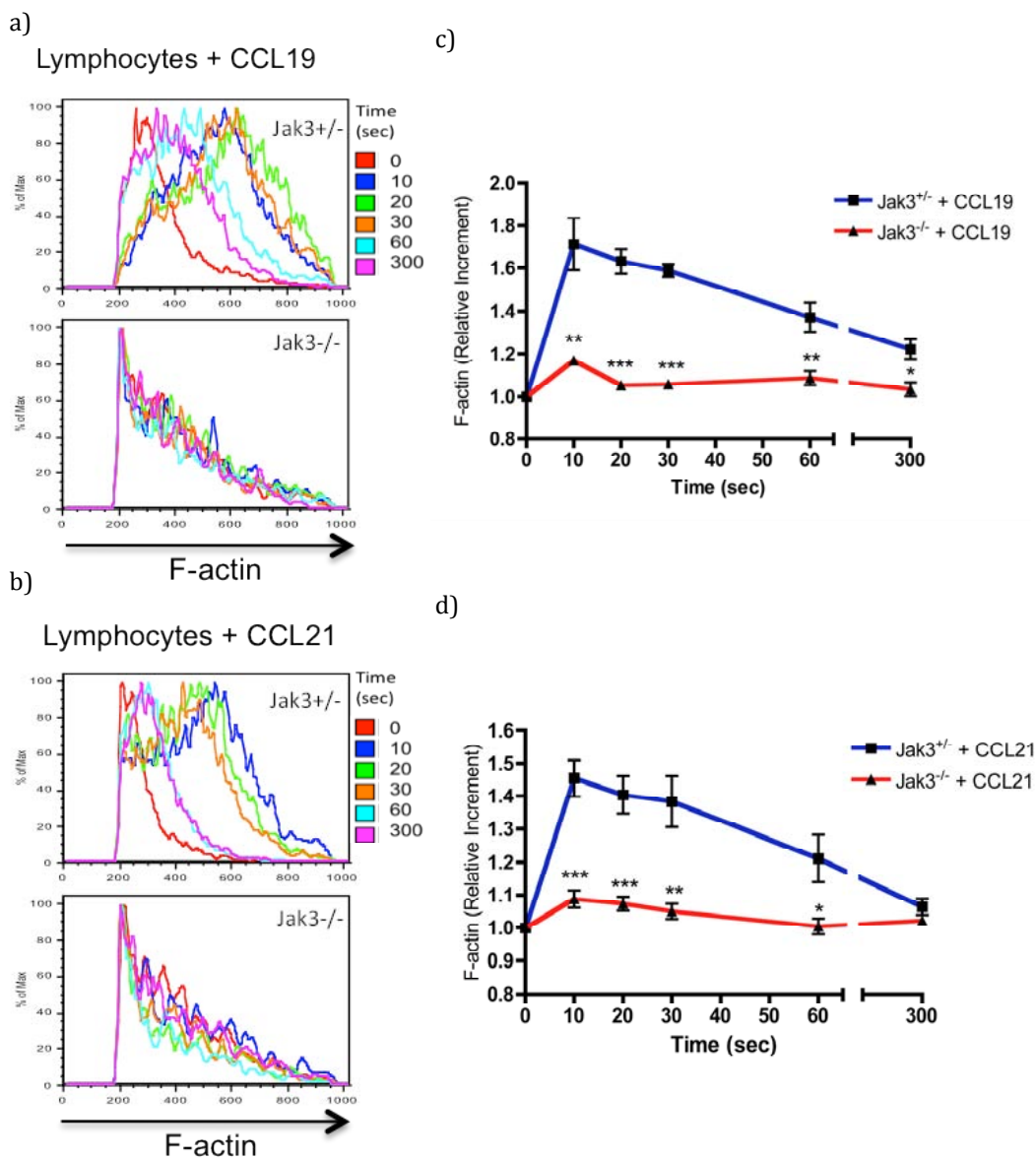
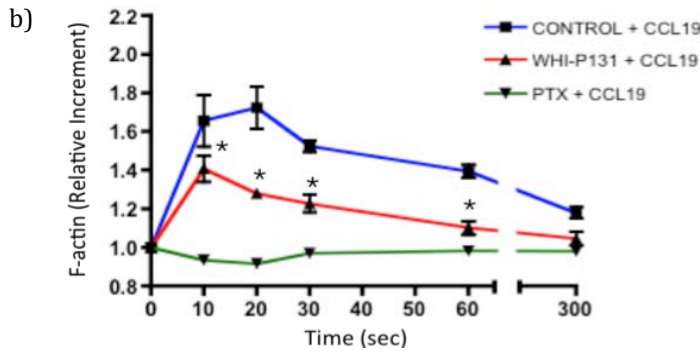
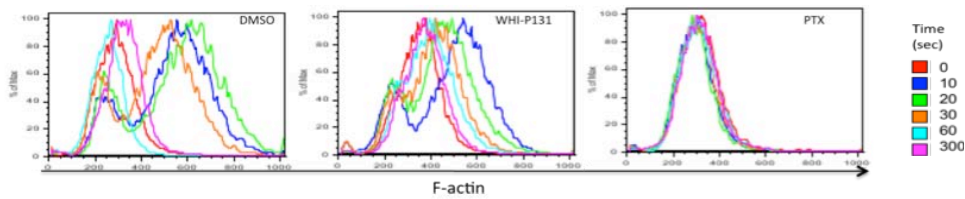


Figura 21.- Jak3 se requiere para la polimerización de actina dependiente de CCR7 en linfocitos T. linfocitos de ratones Jak3^{+/-} o Jak3^{-/-} se estimularon con las quimiocinas CCL19 ó CCL21 (300ng/mL) de 0-300 segundos y la cantidad total de F-actina fue detectada mediante tinción con NBD-falacidina-FITC como se describe en materiales y métodos. Histogramas representativos (a y b) y las gráficas (c, d y e) de los incrementos relativos (IR) de F-actina se muestran. linfocitos silvestres (línea azul) o deficientes de Jak3 (línea roja) fueron estimulados con las quimiocinas CCL19 (c) ó CCL21 (d). Las gráficas representan el promedio de 4 experimentos independientes ± SEM. La significancia estadística se calculó mediante la prueba T de Student no pareada de una cola. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

Para corroborar el papel positivo de Jak3 en la polimerización de actina dependiente de quimiocinas, se hicieron experimentos mediante inhibición farmacológica de la actividad de Jak3.

a)



c)

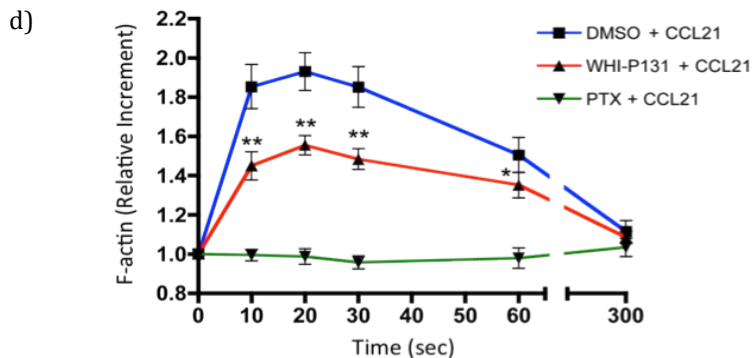
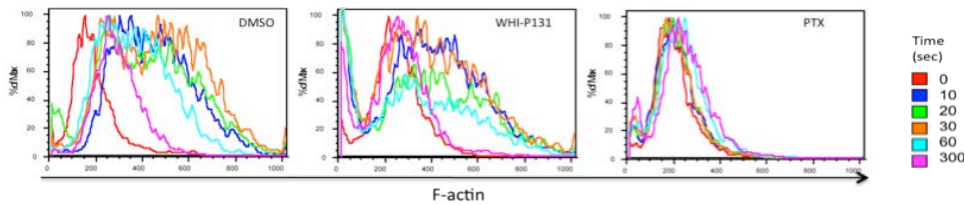


Figura 22.- La polimerización de actina dependiente de CCR7 en linfocitos T requiere de Jak3. Linfocitos primarios de ratones C57BL/6 se pretrataron con DMSO (línea azul), WHI-P131 (línea roja) o PTX (línea verde), estimuladas con la quimiocina CCL19 ó CCL21 a los mismos tiempos (0-300 segundos). Se muestran histogramas representativos (a y c) y las gráficas (b y d) de los IR de F-actina. Las gráficas representan el promedio de 5 y 9 experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. La significancia estadística se determinó con una T de *Student* pareada (una cola). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Primero, las células totales de los ganglios linfáticos de ratones silvestres se trataron con el inhibidor específico de Jak3, el vehículo del inhibidor (DMSO) o PTX. Como se muestra en la figura 22, la polimerización de actina inducida por quimiocinas fue afectada por la inhibición de la actividad de Jak3, siendo significativamente menor a todos los tiempos entre 10 y 60 segundos en comparación con las células control. Estos resultados fueron confirmados en muestras purificadas de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ (anexo 1b y c). El tratamiento con PTX tuvo como consecuencia el abatimiento completo de la respuesta de polimerización de actina, como ha sido reportado previamente [94] (Fig. 22).

Posteriormente, se investigó si la actividad de Jak3 se requería para la polimerización de actina en linfocitos T humanos. Para este propósito, se aislaron linfocitos humanos de sangre periférica (PBMCs) y se analizó la polimerización de actina en respuesta de la quimiocina CXCL12, reportada previamente como dependiente de Jak3 [82]. Así como se observó en las células murinas, las PBMCs humanas mostraron un incremento de F-actina a los 10 segundos de la estimulación que se mantuvo hasta los 30 segundos de la estimulación, seguido de una tendencia de regreso a los niveles de F-actina previos a la estimulación, de los 30 a los 300 segundos. En contraste, las células tratadas con WHI-P131 mostraron una disminución estadísticamente significativa de la polimerización de actina entre 10 y 60 segundos posteriores a la estimulación con la quimiocina, en comparación con las células que solo se incubaron con el vehículo del inhibidor, a pesar de que la cinética no mostró alteraciones. Por último, de manera similar a lo mostrado por las células murinas, el tratamiento con PTX previno la polimerización de actina en respuesta a CXCL12 (Fig. 23).

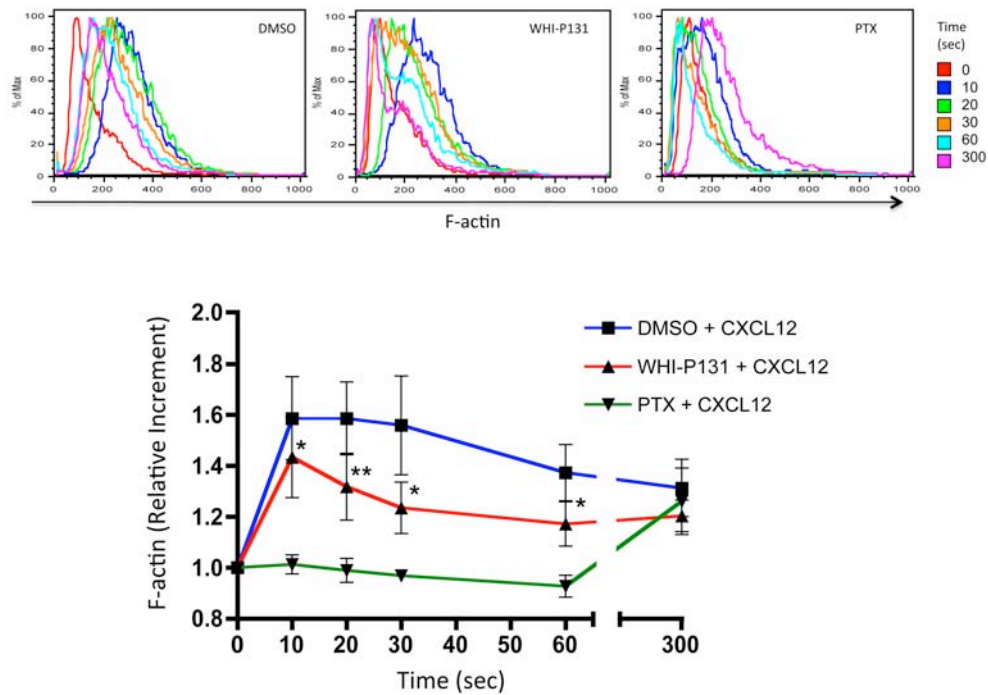


Figura 23.- La inhibición de Jak3 resulta en la disminución de la inducción de F-actina dependiente de CXCR4 en células humanas. Células PBMC humanas preincubadas con DMSO, WHI-P131 o PTX fueron estimuladas con CXCL12 (300ng/mL) a diferentes tiempos. La F-actina se detectó como se describe en materiales y métodos. Histogramas representativos (panel superior) y gráficas (panel inferior) de los incrementos de F-actina se muestran. Las gráficas representan los valores promedio de 4 experimentos independientes \pm SEM. La significancia se determinó usando una T de *Student* pareada (una cola). Los asteriscos indican valores de $p = * < 0.05$, $** < 0.01$.

De forma inesperada, se encontró que los niveles basales de F-actina estuvieron significativamente incrementados en los linfocitos $Jak3^{-/-}$ en comparación con las células $Jak3^{+/+}$. De la misma forma, los linfocitos T inhibidos para Jak3 mostraron los niveles basales de F-actina incrementados, pero no en las células controles o las tratadas con PTX (Fig. 24 a y b). A diferencia de las células murinas, los niveles basales de F-actina en las células PBMCs humanas no presentaron alteración mediante el tratamiento con WHI-P131 ni con PTX (Fig. 24c).

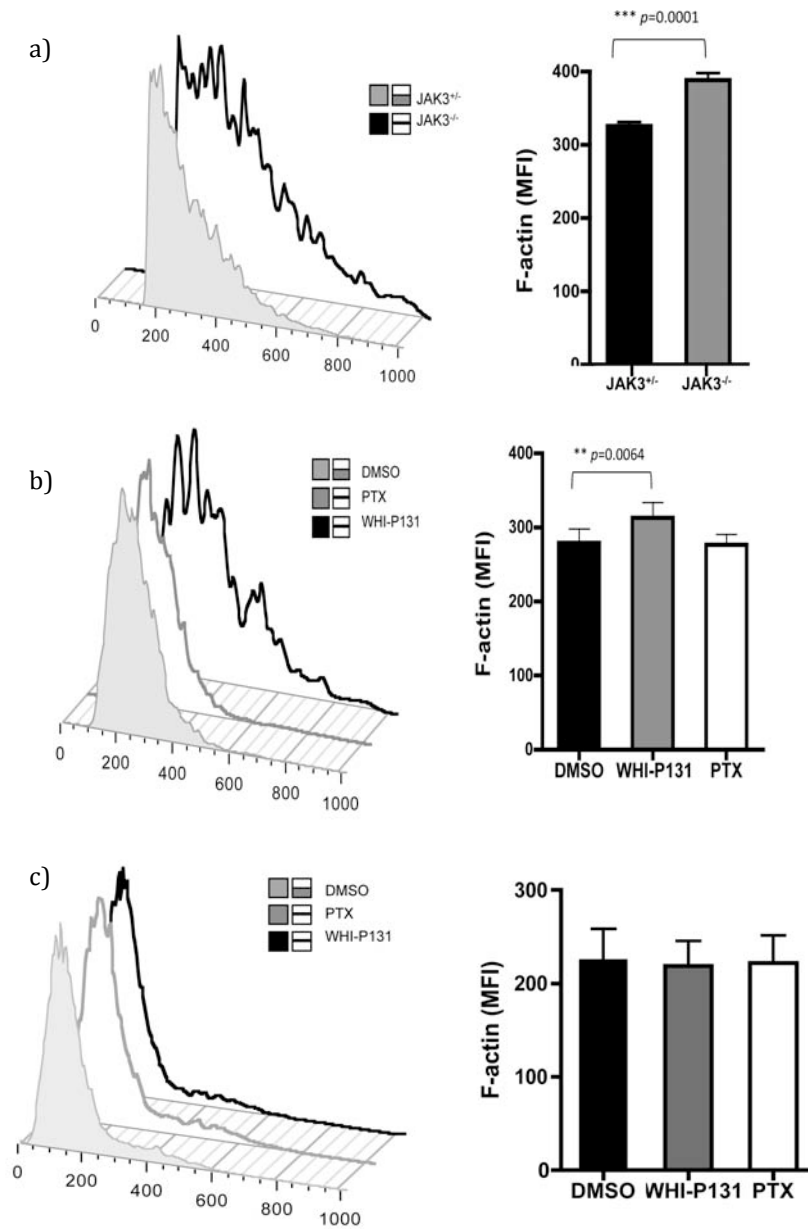


Figure 24. La deficiencia de Jak3 resulta en el incremento de la cantidad basal de F-actina en linfocitos T murinos. Linfocitos T Jak3^{+/+} y Jak3^{-/-} (a), o células pretratadas con DMSO, WHI-P131 o PTX (b) fueron empleadas en el estudio. El promedio de 4 ó 6 experimentos independientes (a y b respectivamente) se muestran en las gráficas ± SEM. **p < 0.01, ***p < 0.001. El análisis estadístico se hizo empleando una T de Student no pareada (a) o una prueba pareada (b y c). Las células humanas con los mismos tratamientos se utilizaron. Se muestra un histograma representativo, así como la gráfica del valor promedio de 4 experimentos independientes, ± SEM.

La fosforilación de cofilina dependiente de los receptores CCR7 y CXCR4 se afectó en ausencia de Jak3.

Debido a que cofilina es un modulador de las dinámicas de actina [73], y ya que la polimerización de actina media la activación de cofilina [69], se investigó si la inhibición farmacológica de la actividad de Jak3 afectaría la activación de cofilina en respuesta a las quimiocinas.

Como los resultados presentados anteriormente indicaron que el incremento relativo de F-actina estaba disminuido en ausencia de la actividad de Jak3 (Fig. 21, 22 y 23), se analizó la cinética de fosforilación de cofilina en respuesta a las quimiocinas CCL21 o CXCL12 en linfocitos T murinos o células PBMCs humanas, respectivamente. Como se muestra en la figura 25, en las células control, el nivel de cofilina fosforilada (p-cofilin) disminuye entre 10 y 30 segundos de la estimulación con la quimiocina, indicando un incremento de la cofilina activa, regresando a los niveles basales a los 300 segundos de la estimulación. Esta cinética de activación-inactivación de cofilina es parecida a la publicada previamente en neutrófilos estimulados con IL-8 [95]. De forma similar a las células control, los grupos tratados con el inhibidor de Jak3 tanto de células murinas como humanas, presentaron un decremento en los niveles de p-cofilina entre 10 y 30 segundos de estimulación con las quimiocinas. De manera interesante, en las células tratadas con el inhibidor de Jak3, los niveles bajos de p-cofilina se mantuvieron hasta los 300 segundos, presentando una tendencia a aumentar, pero sin ser significativa. Estos resultados sugieren que Jak3 podría participar en la inactivación de cofilina en respuesta a las quimiocinas. De forma sobresaliente, la cinética de p-cofilina no presentó alteración alguna en las células tratadas con PTX, en comparación con las células control, hecho que contrasta con la deficiente polimerización de actina en respuesta a las quimiocinas en presencia de la toxina (Fig. 22 y 23).

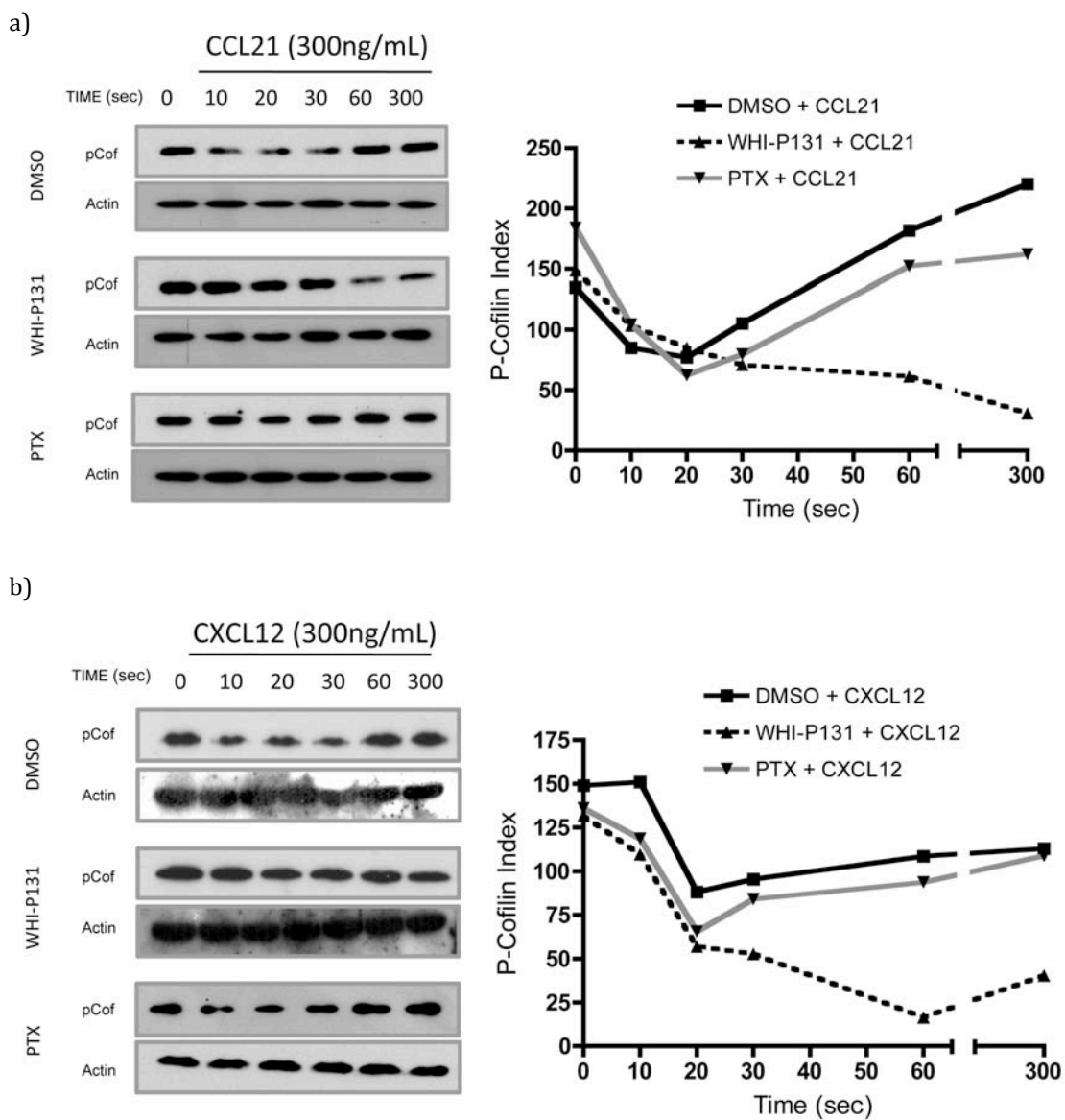


Figura 25. La inhibición de Jak3 afecta la fosforilación de cofilina en respuesta a quimiocinas. Linfocitos de ratones (a) o PBMCs humanas (b) fueron pretratadas con DMSO, WHI-P131 o PTX, para posteriormente ser estimulados con la quimiocina CCL21 (a) o CXCL12 (b) (0-300 segundos). Las células fueron lisadas y los sobrenadantes se prepararon como se describe en materiales y métodos. Se hicieron los **western blots** con el anticuerpo para fosfo-cofilina. Se utilizó anti-actina como control de carga. En cada experimento se utilizaron 4 ratones para un total de 3 experimentos independientes, y en el caso de las células humanas, un donador sano se utilizó para cada experimento, para un total de 3 experimentos independientes. El análisis densitométrico de un experimento representativo se muestra en cada caso.

La activación de Rac1 y RhoA se afectó mediante inhibición de Jak3 en linfocitos estimulados con CCL21

La adquisición del fenotipo migratorio, caracterizado por un frente de migración y un urópodo recae en la reorganización de estructuras específicas dependientes de actina que son reguladas por la activación y re-localización de las GTPasas pequeñas Rac1 y RhoA [96].

Como se mostró mediante el análisis de video-microscopía, las células tratadas con el inhibidor de Jak3 presentaron una disminución de respuesta a las quimiocinas (Fig. 19 y 20). Debido a que la activación de la GTPasa Rac1 se requiere para promover la polarización de actina que formará las protrusiones llevando al establecimiento del frente de migración, se investigó si la inhibición de Jak3 repercutiría en la activación de Rac1. La cinética de activación de Rac1 se analizó mediante microscopía confocal (ver materiales y métodos). Como se muestra en la figura 26, las células control muestran una activación significativa a los 30 segundos de estimulación con CCL21 en comparación con las células no estimuladas. Esta activación se correlaciona con la formación del lamelipodio, seguido se la adquisición del fenotipo migratorio a los 300 segundos y un enriquecimiento del Rac1 activo en el frente de migración (Fig. 26a). Esta re-localización de Rac1 se correlacionó con la redistribución de F-actina en el frente de migración en respuesta a el estímulo con la quimiocina. En contraste, un decremento significativo en la activación del Rac1 se presentó en las células inhibidas para Jak3 (Fig. 26b). La reducción de activación de Rac1 también se correlacionó con la deficiente polarización de Rac1 al frente de migración de la célula, así como con el decremento en los niveles de F-actina (anexo 2). Interesantemente, las células tratadas con el inhibidor de Jak3 presentaron niveles basales incrementados en Rac1 activo en comparación con las células control (Fig. 26b), de manera paralela a los niveles basales incrementados de F-actina (Fig. 24). De forma similar, el tratamiento con PTX tampoco mostró incremento de Rac1 activo, ni mostró relocalización de esta GTPasa en respuesta a las quimiocinas. De forma interesante, el tratamiento combinado de

WHI-P131 y PTX abatió completamente la activación de Rac1 (dato no mostrado).

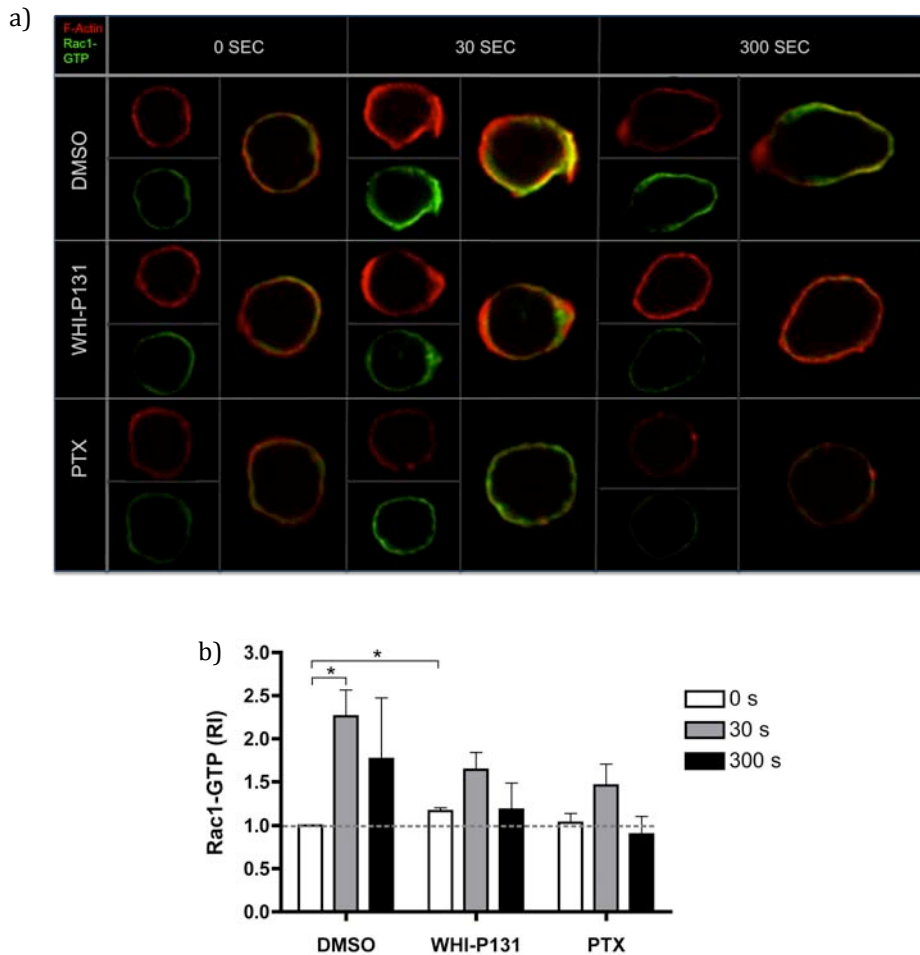


Figura 26. La activación de Rac1 dependiente de CCL21 se disminuye tras inhibición de Jak3 o Gαi. a) Imágenes representativas se muestran de linfocitos pretratados con DMSO, WHI-P131 o PTX y estimulados con CCL21 de 0-300 segundos. Se muestra una célula representativa de cada condición, marcada para F-actina con faloidina-rodamina y para Rac1-GTP detectado con un anticuerpo acoplado a Alexa-Fluor 488 (Rac1 activado). b) La gráfica representa el promedio de la intensidad media de fluorescencia de células individuales (entre 5-26 células por cubreobjeto). Un promedio de 36 células por condición fueron analizadas individualmente para la activación de la GTPasa para cada experimento. Los datos se expresan como IR de fluorescencia, donde en cada muestra se compara con los valores de las células control no estimuladas. Los valores de media se muestran \pm SEM de 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican el valor de significancia estadística (* $p < 0.05$).

Se ha establecido que la vía de señalización de Rac1 esta relacionada con la regulación de activación de la vía de RhoA como evento posterior [51]. Como se muestra a continuación y en publicaciones previas, la alteración en la activación de Rac1 puede conducir a una deficiente formación del urópodo, durante la respuesta quimiotáctica de neutrófilos [50, 97], y en linfocitos T [56, 98]. Por lo anterior, se analizó la activación de RhoA en linfocitos t estimulados con CCL21.

Según lo esperado, un incremento en RhoA-GTP se observó en las células control estimuladas con CCL21, comenzando a los 30 segundos, pero presentando un incremento considerablemente mayor a los 300 segundos de la estimulación, cuando el fenotipo migratorio se observó claramente en las células (Fig. 27). En contraste, tanto el grupo tratado con el inhibidor de Jak3, como el tratado con PTX, no presentaron activación de RhoA a ningún tiempo de la estimulación. Ambos tratamientos presentaron deficiencia de la formación del urópodo y la adquisición del fenotipo migratorio (Fig. 20 y 27 a).

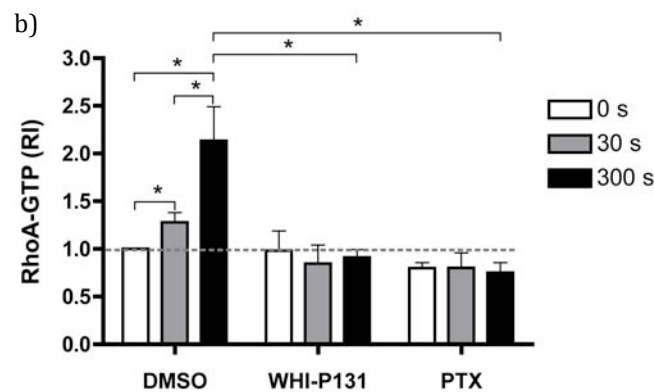
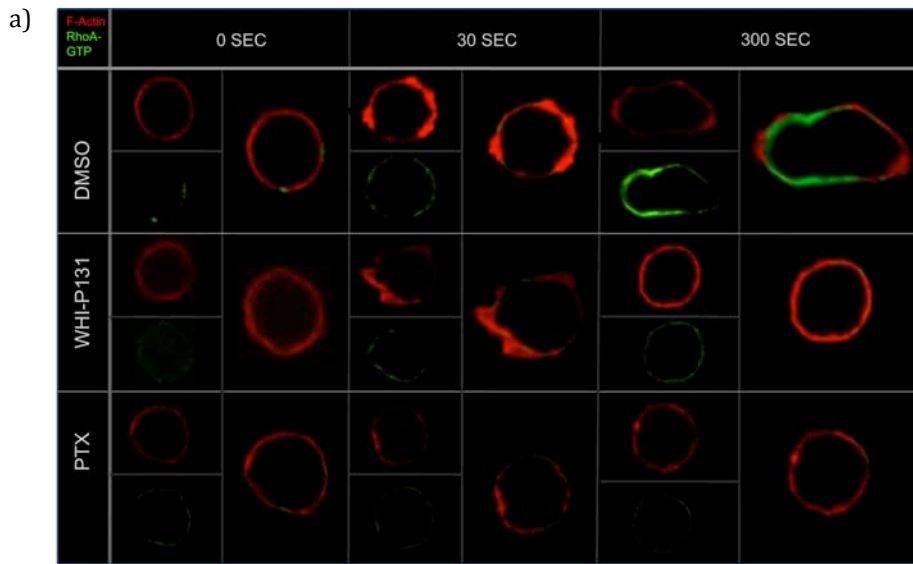


Figura 27. La activación de RhoA es abatida en ausencia de la actividad de Jak3 o Gαi en linfocitos T estimulados con CCL21. a) Imágenes de células individuales representativas para cada tiempo y tratamiento (DMSO, WHI-P131 o PTX) se muestran. Las células se marcaron para F-actina con faloidina-rodamina y para RhoA-GTP detectado con un anticuerpo acoplado a Alexa-Fluor 488 (RhoA activado), como se describe en materiales y métodos. Los datos se expresan como IR. b) Las gráficas representan los valores promedio de intensidad media de fluorescencia de cada célula (entre 3.19 células por cubreobjetos). El promedio de 36 células fueron analizadas individualmente para la activación de la GTPasa por cada condición para cada experimento. Los valores promedio (\pm SEM) de 4 experimentos independientes se muestran. (* $p < 0.05$).

En conjunto, los resultados presentados muestran que la ausencia o inactivación de Jak3 tiene como consecuencias tanto la alteración en activación, así como en la cinética de activación de moléculas involucradas en la reorganización del citoesqueleto de linfocitos T durante la migración en respuesta a quimiocinas (Fig. 28). En las células control (izquierda), el primer paso de activación (antes de 30 segundos), induce una rápida polimerización de actina a la par de una activación de cofilina (desfosforilación). Un segundo paso se da a los 30 segundos, que involucra a la activación de Rac1, la polarización de la F-actina y la formación del lamelipodio. Finalmente, un tercer paso (entre 30 y 300 segundos), se caracteriza por la activación de RhoA y esto ocurre de manera paralela a la formación del urópodo y el establecimiento del fenotipo migratorio. La ausencia o la inhibición farmacológica de la actividad de Jak3 (Fig. 28 columna central), resulta en el incremento de los niveles basales de F-actina (en células murinas). En respuesta a las quimiocinas, las células polarizan la inducción de F-actina a los 30 segundos para formar el lamelipodio pero en una magnitud menor que las células control. Al mismo tiempo que otros cambios se van dando en la célula, la actividad de cofilina se va incrementando para llegar a un punto máximo a los 30 segundos de estimulación, pero en contraste a los controles, las células inhibidas para Jak3 no presentan una inactivación de cofilina por lo menos no hasta los 300 segundos de estimulación con la quimiocina. Más aún, similar al defecto presentado en la cantidad de F-actina, los niveles basales de Rac1-GTP mostraron incremento estadísticamente significativo, pero no presentaron una inducción significativa en respuesta a la quimiocina. De manera sobresaliente, la GTPasa RhoA no presenta incremento alguno en la activación durante el curso temporal de la estimulación.

Por último, el tratamiento con PTX (Fig. 28 columna derecha), previene completamente de la polimerización de actina, a pesar de que la cinética de fosforilación de la cofilina no presentó alteraciones en comparación con las células control. De igual manera que lo mostrado por las células inhibidas para Jak3, la activación de Rac1 no presentó incremento significativo en su activación en respuesta a la quimiocina, pero contrario a la inhibición de Jak3, no presentó

incremento del basal de Rac1-GTP. Adicionalmente, en estas células, RhoA no presentó activación tras la estimulación con la quimiocina.

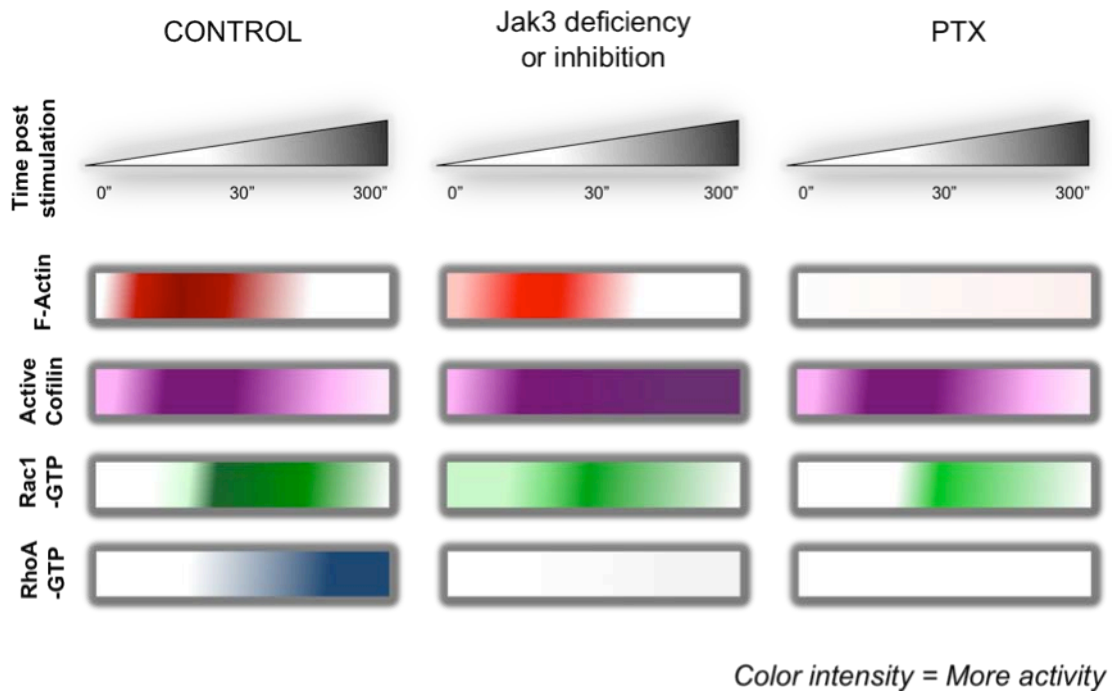


Figura 28. Resumen esquematizado de las vías de Jak3 y Gai activadas por las quimiocinas. En las células control (*izquierda*), la polimerización de actina (rojo), desfosforilación de cofilina (morado) y la activación de Rac1 (verde) son eventos tempranos (30 segundos) responsables de la generación del lamelipodio y el posterior establecimiento del frente de migración. Como evento posterior está la activación de RhoA (azul), que permitirá la formación y funcionamiento apropiado del urópodo para con ello completar el fenotipo migratorio del linfocito. La deficiencia de Jak3 o su inhibición (*centro*) resulta en el incremento de los niveles basales de F-actina, pero una reducción de la cantidad de F-actina generada por la estimulación con quimiocinas, siendo esta suficiente para la polarización de la célula, formando el lamelipodio, y resultando en un frente de migración inestable. Por otra parte, cofilina incrementa su activación, manteniéndola de manera sostenida después de los 30 segundos y hasta los 300. De manera semejante a la F-actina, la cantidad basal de Rac1-GTP es significativamente mayor, mientras que la cantidad no incrementa de manera significativa en respuesta al estímulo de la quimiocina. La activación de la GTPasa RhoA se encuentra completamente abatida durante todo el curso temporal de estimulación, evitando la adquisición del fenotipo migratorio. Por ultimo, el pretratamiento con PTX (*derecha*) evita por completo la polimerización de actina, mientras que la cinética de cofilina se mantiene sin alteración alguna. La activación de Rac1 no incrementa de forma significativa, mientras que RhoA no se activa en lo más mínimo tras la estimulación. Como resultado, ni polarización celular ni fenotipos migratorios se presentan en ausencia de la activación de la proteína G. El incremento en la intensidad del color en la barra representa la acumulación de a cantidad del estado de la proteína durante el curso temporal de la estimulación.

8. DISCUSIÓN

La dinámica del citoesqueleto de actina, así como la capacidad de polarización celular son fundamentales y condicionantes de la migración leucocitaria dependiente de quimiocinas [99]. Este proceso depende de una compleja maquinaria molecular, donde cofilina sobresale por su función reguladora de la reorganización del citoesqueleto de actina, mientras que las GTPasas Rac1 y RhoA participan en la formación y organización de los filamentos de actina para formar las estructuras características del fenotipo migratorio, el frente de migración (o *“leading edge”*) y el urópodo.

A pesar de que se ha establecido a Jak3 como necesaria para la migración dependiente de las quimiocinas CXCL12, CCL25, CCL19 y CCL21 [82, 83, 100], el mecanismo molecular mediante el cual Jak3 participa en la transducción de señales mediadas por las quimiocinas, y por el cual en ausencia de esta cinasa los linfocitos T son incapaces de migrar, previo a este estudio no se había establecido. En enterocitos migrantes, se observó la participación de Jak3 en la redistribución de F-actina y que Jak3 se requiere para la fosforilación de vilina en respuesta de IL-2 en enterocitos humanos intestinales [90]. En otro estudio reciente del mismo grupo, se evidenció un vínculo directo entre las ABPs vilina y gelsolina, en células de epitelio intestinal durante la reparación de tejido [91]. Más aún, otra publicación reciente revela que la función de GEF de PLD2 sobre Rac2 depende de la activación de Jak3 en la respuesta quimiotáctica de neutrófilos estimulados con IL-8 [92].

En el presente trabajo se demostró que la cinasa Jak3, como la proteína G α i, están claramente involucradas en la reorganización de la F-actina durante la quimiotaxis de los linfocitos hacia las quimiocinas CCL19, CCL21 y CXCL12. La participación de Jaks en la polimerización de actina es sustentada por otra publicación reciente, en la que se muestra que la interferencia de la expresión de Jak1/Jak2 por siRNA en linfocitos T lleva a una disminución de los niveles de F-actina en respuesta a las quimiocinas CCL21 y CXCL12 [85]. En este artículo

también prueban la interferencia individual de dichas Jaks, sin encontrarse disminución de la migración dependiente a CXCL12 en linfocitos T. Lo anterior se contrapone, en parte, con publicaciones donde afirman que Jak2 se requiere para la migración en respuesta de CXCL12 [86, 93, 101], pero cabe mencionar que en dichas publicaciones la actividad de Jak2 se bloqueó mediante inhibición farmacológica con la Tirfostina AG490, inhibidor que también afecta la actividad de Jak3 [102, 103]. Los resultados encontrados en nuestro trabajo, sobre la polimerización de actina, se correlacionan con los cambios de forma celular que llevan a la adquisición del fenotipo migratorio, que se encuentran afectados en los linfocitos pretratados con el inhibidor específico de Jak3 y estimulados con quimiocinas. En este caso, el tratamiento con el inhibidor WHI-P131 fue utilizando una concentración dentro de los márgenes de seguridad que previene la posibilidad de inespecificidad del inhibidor [104]. A pesar de que estas células fueron capaces de generar la polarización temprana, que incluye el lamelipodio, solo unas pocas células completaron la adquisición del fenotipo migratorio, el cual incluye la formación del urópodo. Los defectos en la migración se relacionaron a la disminución en la polimerización de actina dependiente de la estimulación con las quimiocinas y con la disminución en la activación de Rac1 (Fig. 27). En el video 2 se puede apreciar que el tratamiento con el inhibidor de Jak3 tiene como consecuencia en los linfocitos mayor inestabilidad de las protrusiones que se forman en el frente de las células, en la dirección del gradiente de la quimiocina. Lo anterior coincide con lo hallado en el análisis de la activación de Rac1, que se sabe es necesaria para la formación y mantenimiento de un frente de migración funcional en células migrantes [95].

Por otra parte, cofilina es una ABP requerida para la polimerización de actina y su reorganización, y también regula la migración de los linfocitos y la extensión celular mediante ciclos de desfosforilación/fosforilación [68, 105]. Los experimentos de la cinética de fosforilación de cofilina en linfocitos murinos y de humano, del presente trabajo, muestran que cofilina se activa rápidamente (30 segundos) en los tres grupos (DMSO, WHI-P131 y PTX), siendo solo en el grupo de inhibición de Jak3 donde posterior a los 30 segundos, la cofilina se mantiene activa hasta los 300 segundos. Esto no puede explicar la disminución

de polimerización de actina (Fig. 21, 22 y 23), debido a que dentro de los primeros 30 segundos ya se aprecia disminución de polimerización, mientras que la activación de cofilina se da en la misma magnitud que el grupo control. Lo anterior sugiere que otras vías de señalización pueden estar involucradas en la polimerización temprana de actina, como es la dependiente de la GTPasa Cdc42, que en conjunto con el acomplejamiento con WASP y Arp2/3, permite la formación de las primeras protrusiones de la membrana para la formación de los filopodios [47]. Por otra parte, Rac1 también contribuiría en este punto, pero debido a que su activación está afectada, es posible pensar que no se llegaría a las magnitudes totales de F-actina, como se ve dentro de los primeros 30 segundos de estimulación con la quimiocina mediante inhibición de Jak3, y en los primeros 10 segundos en los ensayos con células Jak3^{-/-}.

Por otra parte, la activación sostenida de cofilina en ausencia de Jak3, podría causar inestabilidad de las estructuras dependientes de F-actina, afectando la formación del frente de migración (video 2). En este sentido, hay indicios de que la cantidad de cofilina inactiva al frente de migración se encuentra disminuida los 30 segundos, mientras que a los 300 segundos pudiera estar aumentando, principalmente al frente de migración, lo que sugiere la participación de cofilina en la formación y mantenimiento de la polarización celular en respuesta a quimiocinas (artículo en preparación).

Con respecto a la activación de cofilina en los primeros 30 segundos de estimulación, podría ser dependiente de la SSH1L, ya que esta fosfatasa es activada tras la polimerización de actina y activa a cofilina [68, 106]. SSH1L, además de activar cofilina de forma directa [69,107], inactiva a LIMK, siendo esta última molécula la principal encargada de inactivar a cofilina en linfocitos T [60, 68]. En contraste, en las células control, Rac1 se activa eficientemente, lo que a su vez activa a LIMK permitiendo la inactivación de cofilina después de los 30 segundos de estimulación, llevando al regreso de los porcentajes basales de cofilina activa/inactiva.

Por otra parte, el incremento del nivel basal de F-actina en ausencia de Jak3 puede ser una consecuencia del incremento basal de Rac1-GTP (Fig. 26), teniendo como consecuencia la disociación de gelsolina del filamento de actina a causa del incremento en la actividad basal de la GTPasa, permitiendo la incorporación de la G-actina a los extremos libres de la proteína de caperuza. Proponemos esto basándonos en lo publicado por Arcaro en 1998, donde muestra que Rac1 puede promover la disociación de gelsolina en neutrófilos [108]. De manera alternativa, el incremento de F-actina podría ser consecuencia de una fosforilación deficiente de gelsolina en ausencia de Jak3, [91] llevando a la polimerización espontánea de actina.

Posterior a la activación de Rac1, la actividad de RhoA se encuentra completamente abatida en ausencia de Jak3 (Fig. 27), resultando en la deficiente formación y motilidad del urópodo como se muestra en la video-microscopía (Fig. 19, 20 y video 2). Esto se puede explicar por la disminución en la activación de Rac1 observada en las células tratadas con el inhibidor de Jak3, la cual es requerida para la organización del frente de migración y la posterior activación de RhoA para la adquisición del urópodo [50, 109, 110]. Más específicamente, a pesar de que algunas células tratadas con el inhibidor de Jak3 formaran urópodo, esta estructura parece con una contractilidad entorpecida de lento movimiento (video 2). Esta alteración en el urópodo podría ser una consecuencia de la activación deficiente de RhoA, la cual se requiere para la contracción del complejo actomiosina mediada por la activación de MLC. Niveles disminuidos de RhoA activa en muchos tipos celulares tiene como consecuencia una reducción de la fosforilación de MLC y en la formación del urópodo (109, 111).

Está bien establecido que la activación de Rac1 y RhoA se requieren para la activación de LIMK1 y LIMK2 al frente de migración y urópodo, respectivamente [58, 59]. Por el efecto de disminución en la activación de las GTPasas Rac1 y RhoA por la inhibición de Jak3, se sugiere que la activación de efectores como LIMK podrían estarse afectando negativamente, lo que se apoya por la activación sostenida de cofilina por un periodo de tiempo mayor (300 segundos) observada en las cinéticas de estimulación con las quimiocinas

CCL21 y CXCL12 (Fig. 25).

Hasta el momento, existe controversia sobre la aportación y función específica de los Jaks tienen en la transducción de señales activada por las quimiocinas y su posible dependencia en la actividad de la proteína G [101, 112]. El análisis de la cinética de fosforilación de cofilina muestra una dependencia en la actividad de Jak3, pero no de la proteína G α i, por lo encontrado en los tratamientos con el inhibidos de Jak3 o PTX, al no presentar alteración la cinética de cofilina tras el tratamiento con PTX (Figura 25). La diferencia encontrada en el análisis de cofilina aporta el indicio de que la activación de Jak3 es independiente de la actividad de la proteína G α i en respuesta a quimiocinas, pudiendo activar una vía de señalización que permita la inactivación de cofilina. También se encontraron diferencias claras en la polimerización de actina entre los tratamientos con WHI-P131 y PTX, presentando una polimerización moderada versus una ausencia total, respectivamente, mostrando la posibilidad de que río debajo de Jak3 y la proteína G α i existieran diferentes efectores. En este contexto, la polimerización inicial de actina probablemente dependa de la activación de Cdc42 y WASP [95] río abajo de la proteína G α i, sugerido por la presencia de filopodios en linfocitos Jak3^{-/-} e inhibidos con WHI-P131, pero no en las células tratadas con PTX (datos de video-microscopía no mostrados).

A pesar de que puedan existir vías independientes entre Jak3 o la proteína G, otras vías dependen de ambas moléculas, como es el caso de Rac1, sugerido por el hecho de que ambas muestran una disminución similar en su actividad dependiente de quimiocinas tanto el tratamiento con WHI-P131 o PTX, mientras que la activación de Rac1 se abate completamente cuando los tratamientos se hicieron simultáneamente (no mostrado).

Los datos presentados en el presente trabajo sustentan un modelo en el cual la proteína G heterotrimérica y Jak3 tienen papeles independientes pero complementarios en la transducción de señales mediada por los receptores CCR7 y CXCR4 (Figuras 28 y 29). Tras la estimulación con la quimiocina, tanto la proteína G como Jak3 se activan, mientras que la proteína G permite la

activación de Cdc42 (independiente de Jak3), seguido de la asociación de WASP y el complejo Arp2/3 para la polimerización temprana de actina y la formación de los filopodios. Ambas vías resultan en la activación de la GTPasa Rac1 de manera complementaria. Lo anterior permite la polimerización de actina principalmente en el frente que recibe el gradiente de quimiocinas y la formación del lamelipodio. A la par con la polimerización de actina, la cofilina se activa permitiendo la reorganización de la F-actina al frente de migración. También existe una relación estrecha entre Rac1 y cofilina, ya que en otras células el incremento en actividad de Rac1 lleva a la activación de cinasas LIM, lo cual permite que cofilina sea inactivada y las estructuras dependientes de F-actina se mantengan. En el modelo planteado, la activación de las cinasas LIM sería parcialmente dependiente de Jak3, pero no de la proteína Goi. Alternativamente, los niveles moderados de F-actina en ausencia de Jak3, como resultado de la actividad de la proteína Goi (en ausencia de Jak3), pudieran activar a SSH1L, contribuyendo en la inactivación de LIMK1. A pesar de que Jak3 no se ha identificado como un activador directo de cofilina, una publicación reciente mostró que las cinasas Src pueden regular la función de cofilina mediante fosforilación en la tirosina 68 (Y68), teniendo como consecuencia en la reducción de la F-actina y la extensión celular [71]. De esta manera, se abre la posibilidad de que Jak3 pudiera fosforilar directamente a cofilina y regular su función.

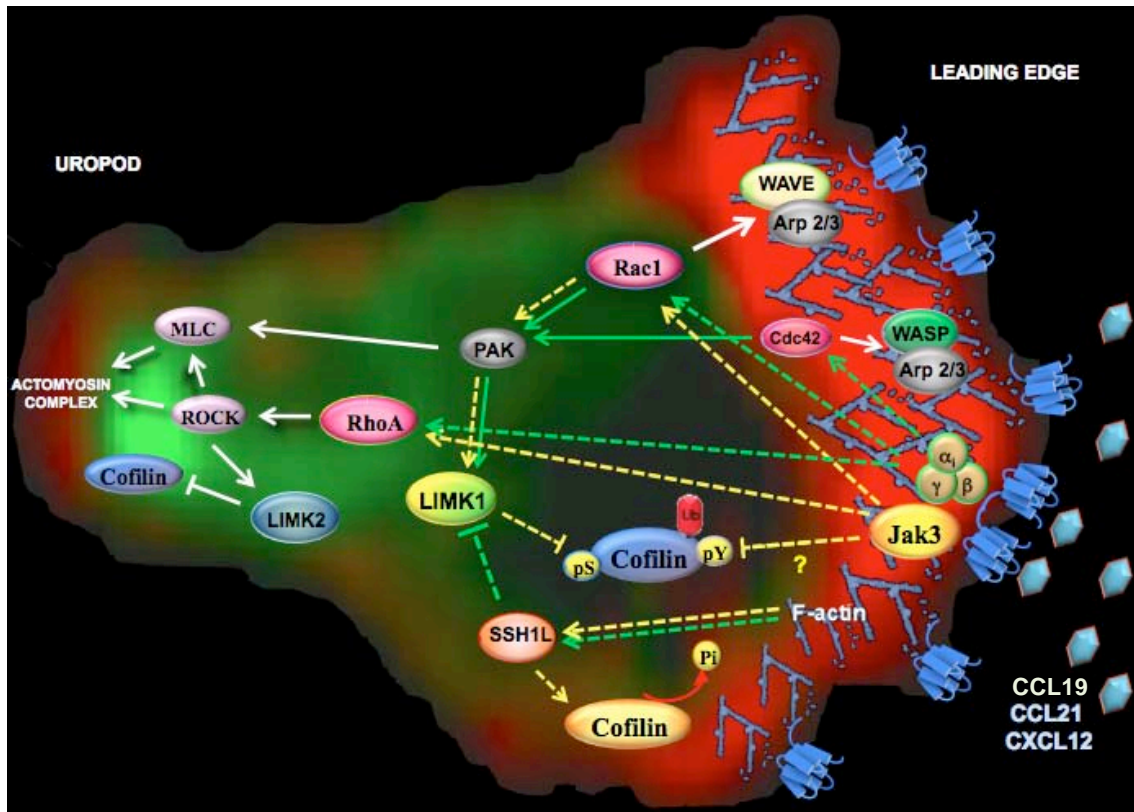


Figura 29.- Jak3 y la proteína G tienen un papel complementario e independiente en la señalización mediada por los receptores de quimiocinas. Los receptores de quimiocinas activan tanto la vía de la proteína G (líneas verdes) como la Jak3 (líneas amarillas). Las líneas de aristas ocultas indican las rutas propuestas, mientras que las líneas continuas las rutas ya reportadas. Primero, Gai activa Cdc42 y el complejo Arp2/3 generando la protrusión de la membrana celular mediada por la polimerización de actina lo que conduce a la formación de filopodios. Entonces, Jak3 activado independientemente a Gai y ambas moléculas permiten la activación de Rac1, que en asociación con Arp2/3 conduce al rearrreglo de la F-actina para la formación del lamelipodio. Este último paso es acompañado de la activación de la fosfatasa SSH1L que se requiere para la activación de cofilina y la inactivación de LIMK. La cofilina, una vez activa permite la generación de sitios de polimerización contribuyendo al ensamblaje de las redes de actina. A continuación, Jak3 y Gai son requeridas para la activación de RhoA, llevando a la activación de los efectores río abajo, ROCK y MLC, para la formación del complejo de actomiosina y para un apropiado funcionamiento. Al mismo tiempo, PAK activa a LIMK1 al frente de migración, resultando en la fosforilación de por este último, mientras que LIMK2 es activado por ROCK en el urópodo resultando de la misma manera que al frente de migración, en la inactivación de cofilina, lo que previene la desasociación del complejo actomiosina y la desestructuración del urópodo.

Una vez que se ha establecido un frente de migración funcional, el siguiente paso en la activación RhoA y sus efectores ROCK y MLC, favoreciendo la formación y función del complejo actomiosina y también de LIMK2 para la inactivación de cofilina y con ello, prevenir la disociación del complejo motor y así permitir una apropiada estructuración del urópodo, eventos que dependen de la activación de las vías de Jak3 y la proteína G.

En resumen, el modelo propuesto en este trabajo describe un nuevo elemento en la transducción de señales dependientes de quimiocinas en linfocitos T, donde Jak3 regula la migración celular a través de la reorganización del citoesqueleto de actina. Este mecanismo de señalización involucra la inactivación de cofilina por una vía dependiente de Jak 3 pero independiente de proteínas G.

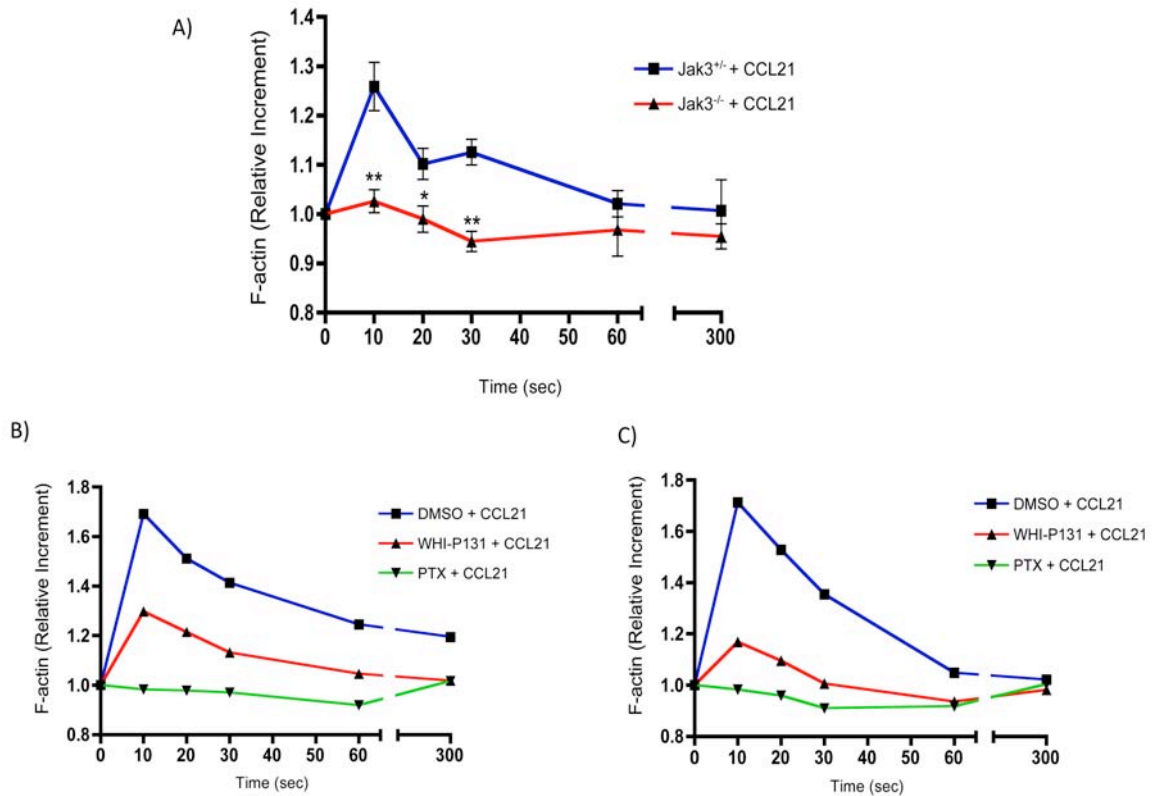
9. CONCLUSIONES

1. La actividad de Jak3 dependiente de CCR7, es necesaria para una eficiente adquisición del fenotipo migratorio así como de una apropiada motilidad del linfocito T estimulado con la quimiocina CCL21.
2. La polimerización de actina dependiente de la activación de los receptores CCR7 y CXCR4 requiere de Jak3 y la proteína G para alcanzar los niveles óptimos para la migración.
3. Jak3 es necesaria para la inactivación de cofilina, y probablemente para la activación de LIMK, molécula que inactiva a cofilina mediante fosforilación.
4. La cinasa Jak3 y la proteína G tienen papeles complementarios y no redundantes en la activación de las GTPasa Rac1 y RhoA, para la adquisición del fenotipo migratorio en respuesta a las quimiocinas.
5. Jak3 es necesaria para la reorganización del citoesqueleto de actina de los linfocitos T en respuesta a la activación de los receptores CCR7 y CXCR4.

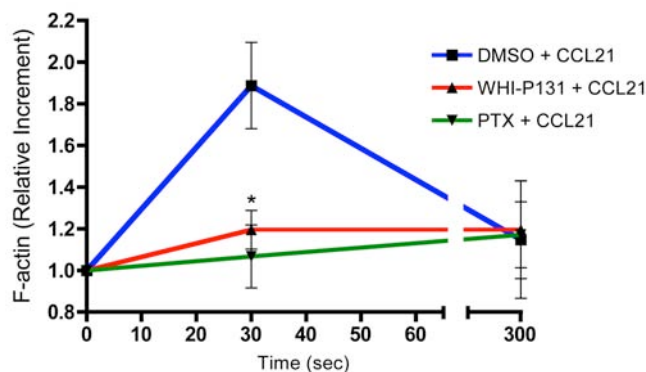
10. PERSPECTIVAS

- Para poner a prueba la hipótesis de que Jak3 lleva a la activación de LIMK (de manera directa o indirecta), se requiere analizar la cinética de fosforilación de LIMK en respuesta a las quimiocinas en linfocitos tratados con el inhibidor de Jak3.
- Corroborar los resultados encontrados con las GTPasas Rac1 y RhoA en el modelo de los ratones deficientes para Jak3.
- Analizar la cinética de activación de la GTPasa Cdc42 en células tratadas o no, con el inhibidor de Jak3 o PTX, para poder establecer si esta molécula depende de la proteína G, según lo propuesto en nuestro modelo.
- Analizar si existen diferencia de dependencia en Jak3 entre CCL19 y CCL21, ya que se ha reportado que la quimiocina CCL19 activa más Cdc42 induciendo principalmente la formación de filopodios, mientras que CCL21 activa principalmente Rac para la formación del lamelipodio.

11. ANEXOS



Anexo 1.- Las subpoblaciones de linfocitos T, tanto CD4 como CD8, requieren de Jak3 para la polimerización de actina en respuesta a CCL21. A) Esplenocitos de ratones Jak3^{+/-} (azul) o Jak3^{-/-} (rojo) fueron marcados con anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 para ser separados con el FACS. La subpoblación purificada de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ fue estimulada con CCL21 y la cantidad de F-actina se determinó como se describe en materiales y métodos. 2 ó 3 ratones se utilizaron para cada experimento de un total de tres experimentos independientes \pm SEM. *P < 0.05, **P < 0.01. CD3⁺CD4⁺ (B), CD3⁺CD8⁺ (C) linfocitos T purificados de ratones silvestres se pre-incubaron con DMSO (azul), WHI-P131 (rojo) o PTX (verde) como se describe anteriormente y de igual forma estimulados con CCL21. El resultado de un experimento representativo se muestra. Un total de 6 ratones fueron utilizados. Se muestra el promedio de dos experimentos independientes.



Anexo 2.- Análisis de la polimerización de actina en respuesta a CCL21 por microscopía confocal. Linfocitos de LN fueron pretratados con DMSO (azul), WHI-P131 (rojo) o PTX (verde) y estimulados con CCL21 para ser teñidos con faloidina-Rodamina (F-actina), como se describe en materiales y métodos. La gráfica representa el promedio de los IMF, representados como incrementos relativos al valor de las células sin estimular, \pm SEM de tres experimentos independientes por duplicado se muestran. *P < 0.05.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Lind, E.F., et al., Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med*, 2001. 194(2): p. 127-34.
2. Howard T. Petrie. Cell migration and the control of post-natal T -cell lymphopoiesis in the thymus. 2003. *Nat Rev*; 3: 859 – 866.
3. Ladi, E., et al., Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat Immunol*, 2006. 7(4): p. 338-43.
4. Zuniga-Pflucker, J.C. and M.J. Lenardo, Regulation of thymocyte development from immature progenitors. *Curr Opin Immunol*, 1996. 8(2): p. 215-24.
5. Godfrey, D.I., et al., A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol*, 1993. 150(10): p. 4244-52.
6. Prockop, S.E., et al., Stromal cells provide the matrix for migration of early lymphoid progenitors through the thymic cortex. *J Immunol*, 2002. 169(8): p. 4354-61.
7. Germain, R.N., T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(5): p. 309-22.
8. Love P.E., Bhandoola A., Signal integration and crosstalk during thymocytes migration and emigration. *Nat Rev Immunol*, 2011. 11(7):469-77.
9. Takahama, Y., Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(2): p. 127-35.
10. Liu, C., et al., Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. *Blood*, 2006. 108(8): p. 2531-9.
11. Denucci CC, Mitchell JS, Shimizu Y., Integrin function in T-cell homing to lymphoid and nonlymphoid sites: getting there and stay there. *Crit Rev Immunol*. 2009. 29(2):87-109.
12. Vicente-Manzanares M, Sanchez-Madrid F. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nature reviews Immunol*. 2004. 4:110-22.
13. Girald JP, Moussion C, Forster R. HEVs, lymphatic and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nature reviews Immunol*. 2012. 12: 762-773.
14. Kinashi T (2005) Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature reviews Immunology* 5: 546–559.
15. Jinhua Wu, Na Xie, Xia Zhao, Edouard C. Nice, and Canhua Huang Review: Dissection of Aberrant GPCR Signaling in Tumorigenesis – A Systems Biology Approach *Cancer Genomics Proteomics*. 2012. 9 (1) 37-50
16. Katritch V, Cherezov V, Stevens RC. Diversity and modularity of G protein-coupled receptors structure. *Trends Pharmacol Sci* . 2012. 33(1): 17–27
17. Wong MM, Fish EN. Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Seminars in immunology*. 2003. 15: 5–14.

18. Mantovani A, Bonecchi R, Locati M. Tuning inflammation and immunity by chemokines sequestration: decoys and more. *Nature Reviews Immunology*. 2006. 6:907-918
19. Lata S, Raghava G. Prediction and classification of chemokines and their receptors. *Protein Engineering, Design & Selection*. 2009. 22:7 441–444.
20. Rostène W, Kitabgi P, Parsadaniantz SM. Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nature Reviews Neuroscience*. 2007. 8, 895-903.
21. Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*. 2012. 36:705–716.
22. Soriano SF, Hons M, Schumann K, Kumar V, Dennier TJ, et al. In vivo analysis of uropod function during physiological T cell trafficking. *Journal of immunology*. 2011.187: 2356–2364.
23. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003. 112: 453–465.
24. Disanza A, Steffen A, Hertzog M, Frittoli E, Rottner K, et al. Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell Mol Life Sci*. 2005. 62: 955–970.
25. Chung K.Y. Structural aspects of GPCR-G protein coupling. *Toxicol. Res*. 2013. 29:3 149-155.
26. Hamm HE. The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem*. 1998. 273:669-672.
27. Sprang SR, Chen Z, Du X. Structural basis of effector regulation and signal termination in heterotrimeric Galpha proteins. *Adv. Protein. Chem*. 2007. 74:1-65.
28. Stephens L, Ellson C, Hawkins P. Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2002. 14(2):203-13.
29. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell*. 2007. 129(7): 1261–1274.
30. Laine J, Kunstle G, Obata T. Differential regulation of Akt kinase isoforms by the members of the TCL1 oncogene family. *J. Biol. Chem*. 2002. 277:3743-3751.
31. Hall A (1998) G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. *Science* 280: 2074–2075.
32. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C, Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*. 1997. 11: 2295–2322.
33. Pullikunth AK, Catling AD. Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeleton dynamics: A perspective. *Cellular Signaling*. 2007. 9, 1621-1632.
34. Watari K, Nakaya M, Kurose H. Multiple functions of G protein-coupled receptors kinases. *Journal of Molecular Signaling* 2014, 9:1
35. Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptors signals. *Journal of Cell Science*. 2002. 115, 455-465.
36. Carolina Otero, Marcus Groettrup, and Daniel F. Legler, Cellular Immunology and Immune regulation: Opposite Fate of Endocytosed CCR7 and Its Ligands: Recycling versus Degradation, *J Immunol* 2006 177:2314-2323;
37. Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 2010. 463:485-492.

38. Janmey PA. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiological Reviews*. 1998. 78:3, 763-781.
39. Chhabra ES, Higgs HN. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol*. 2007. 9:10, 1110-1121.
40. Nurnberg A, Kitzing T, Grosse R. Nucleating actin for invasion. *Nature Reviews*. 2011. 11, 117-187.
41. Carlsson AE. Actin Dynamics: From nanoscale to microscale *Annual Review of Biophysics*. 2010. 39: 91-110.
42. Dos Remedios C.G., Chhabra D., Kekic M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., Nosworthy, N. J. Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. *Physiol. Rev*. 2003. 83, 433-473.
43. Pollard, T. D., Blanchoin, L. and Mullins, R. D. Biophysics of actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Struct*. 2000. 29, 545-576.
44. Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. Actin dynamics. *J Cell Sci*. 2001. 114(1): 3-4.
45. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 1998. 279: 509–514.
46. Tybulewicz VL, Henderson RB. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nature reviews Immunology*. 2009. 9: 630–644.
47. Michael S. Samuel and Michael F. Olson. Rho-GTPases in Embryonic Stem Cells, *Embryonic Stem Cells - Basic Biology to Bioengineering*, Prof. Michael Kallos (Ed.), ISBN: 978-953-307-278-4, InTech. 2011.
48. Blumer KJ, Cooper JA. Go ahead, break my symmetry! *Nat. Cell Biol*. 2003. 5:12, 1048-1049.
49. Kast DJ, Yang C, Disanza A, Boczkowska M, Madasu Y, Scita G, Svitkina T, Dominguez R. Mechanism of IRSp53 inhibition and combinatorial activation by Cdc42 and downstream effectors. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2014. 21, 413-422.
50. Pestonjamas KN, Forster C, Sun C, Gardiner EM, Bohl B, et al. Rac1 links leading edge and uropod events through Rho and myosin activation Turing chemotaxis. *Blood*. 2006. 108: 2814–2820.
51. Nimnual AS, Taylor LJ, Bar-Sagi D, Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nature cell biology* . 2003. 5: 236–241.
52. Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *The EMBO journal*. 1999. 18:3, 578-585.
53. Kawano TK, Takasu F, Kaoki H, Sakumura Y, Ishii S, Ueba T, Eiyama A, Okada A, Kawano Y, Suzuki K. Dynamic regulation of myosin light chain phosphorylation by rho-kinase. *Plos One*. 2012. 7:6.
54. Heasman SJ, Ridley AJ. Multiple roles for RhoA during T cell transendothelial migration. *Small GTPases*. 2010. 1:3, 174-179.
55. Chardin P. GTPase regulation: getting aRnd Rock and Rho inhibition. *Current Biology*. 2003. 13, 702-704.
56. Bardi G, Niggli V, Loetscher P. Rho kinase is required for CCR7- mediated polarization and chemotaxis of T lymphocytes. *FEBS letters*. 2003. 542: 79–83.
57. Dráber P, Sulimenko V, Dráberová E. Cytoskeleton in mast cell signaling. *Frontiers in immunology*. 2012. 3, 130.

58. Sumi, T., Matsumoto, K., Takai, Y., Nakamura, T. Cofilin Phosphorylation and Actin Cytoskeletal Dynamics Regulated by Rho- and Cdc42-Activated LIM-Kinase 2 *J. Cell Biol.* 1999. 147,1519–1532
59. Sumi T, Matsumoto K, Nakamura T. Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry.* 2001. 276: 670–676.
60. Nishita M, Aizawa H, Mizuno K. Stromal cell-derived factor 1 α activates LIM Kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T-cell chemotaxis. *Molecular and Cellular Biology.* 2002. 22:3, 774-783.
61. Bamburg JR. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annual review of cell and developmental biology.* 1999. 15: 185–230.
62. Berstein BW, Bamburg JR. ADF/Cofilin: a functional node in cell biology. *Trends in Cell Biology.* 2010. 20:4, 187-195.
63. Bamburg JR. Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. *Biology Reports.* 2010. 2:62.
64. Mizuno K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cellular signalling.* 2013. 25: 457–469.
65. Samstag Y, John I, Wabnitz GH. Cofilin: a redox sensitive mediator of actin dynamics during T-cell activation and migration. *Immunological Reviews.* 2013. 256: 30-47.
66. Samstag Y, Nebl G. Interaction of cofilin with the serine phosphatases PP1 and PP2A in normal and neoplastic human T lymphocytes. *Advan. Enzyme Regul.* 2003. 43: 197-211.
67. Wang Y, Shibasaki F, Mizuno K. Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin. *The Journal of biological chemistry.* 2005. 280: 12683–12689.
68. Nishita M, Tomizawa C, Yamamoto M, Horita Y, Ohashi K, et al. Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot is critical for directional cell migration. *The Journal of cell biology.* 2005. 171: 349–359.
69. Kurita S, Watanabe Y, Gunji E, Ohashi K, Mizuno K. Molecular dissection of the mechanisms of substrate recognition and F-actin-mediated activation of cofilin-phosphatase Slingshot-1. *The Journal of biological chemistry.* 2008. 283: 32542–32552.
70. Gohla A, Birkenfeld J, Bokoch GM. Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nature cell biology.* 2005. 7: 21–29.
71. Yoo Y, Ho HJ, Wang C, Guan JL. Tyrosine phosphorylation of cofilin at Y68 by v-Src leads to its degradation through ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene.* 2010. 29: 263–272.
72. Theriot JA, Mitchison TJ. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature.* 1991. 352, 126-131.
73. Jovceva E, Larsen MR, Waterfield MD, Baum B, Timms JF. Dynamic cofilin phosphorylation in the control of lamellipodial actin homeostasis. *Journal of cell science.* 2007. 120: 1888–1897.
74. Rane SG, Reddy EP. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene.* 2000. 19, 5662-5679.

75. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt V ET, Silvennoinen O, O'Shea JJ. The janus kinases (Jaks). *Genome Biology*. 2004. 5:253.
76. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*. 2009. 228(1): 273-287.
77. Imada K, Leonard WJ. The jak-STAT pathway. *Molecular Immunol*. 2000. 1-11.
78. Thomis DC, Berg LJ. Peripheral Expression of Jak3 Is Required to Maintain T Lymphocyte Function. *The Journal of Experimental Medicine*. 1997. 185(2):197-206.
79. Thomis DC, Aramburu J, Berg LJ. The jak family tyrosine kinase Jak3 is required for IL-2 synthesis by naïve/resting CD4 T cells. *The Journal of Immunol*. 1999. 163: 5411-5417.
80. Wong M, Uddin S, Majchrzak B, Huynh T, Proudfoot AE, Plataniias LC, Fish EN. Rantes activates Jak2 and Jak3 to regulate engagement of multiple signaling pathways in T cells. *J Biol Chem*. 2001. 276(14):11427-31.
81. Soriano SF, Hernanz-Falcón P, Rodríguez-Frade JM, de Ana NM, Garzón R, Pinto C, Vila-coro AJ, Zabalos A, Balomeros D, Martínez-A C, Mellado M. Functional inactivation of CXC Chemokine receptor 4-mediated responses through SOCS3 up-regulation. *J. Exp. Med*. 2002. 196:3, 311-321.
82. Soldevila G, Licona I, Salgado A, Ramirez M, Chavez R, et al. Impaired chemokine-induced migration during T-cell development in the absence of Jak3. *Immunology*. 2004. 112: 190–200.
83. Garcia-Zepeda EA, Licona-Limon I, Jimenez-Solomon MF, Soldevila G. Janus kinase 3-deficient T lymphocytes have an intrinsic defect in CCR7-mediated homing to peripheral lymphoid organs. *Immunology*. 2007. 122: 247–260.
84. Vila-Coro AJ, Rodriguez-Frade JM, Martin De Ana A, Moreno-Ortiz MC, Martinez AC, Mellado M. The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J*. 1999. 13:1699–710.
85. Perez-Rivero G, Cascio G, Soriano SF, Sanz AG, de Guinoa JS, et al. Janus kinases 1 and 2 regulate chemokine-mediated integrin activation and naive T-cell homing. *Eur. J. Immunol*. 2013. 43: 1745–1757.
86. Zhang XF, Wang JF, Matczak E, Proper JA, Groopman JE. Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1alpha-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2001. 97: 3342–3348.
87. Montresor A, Bolomini-Vittori M, Toffali L., Rossi B., Constantin G., and Laudanna C. JAK tyrosine kinases promote hierarchical activation of Rho and Rap modules of integrin activation. *J Cell Biol*. 2013. 203:1003-1019.
88. Biswas SK, Sodhi A. Tyrosine phosphorylation-mediated signal transduction in MCP-1-induced macrophage activation: role for receptor dimerization, focal adhesion protein complex and JAK/STAT pathway. *International immunopharmacology*. 2002. 2: 1095–1107.
89. Steindler C, Li Z, Algarte M, Alcover A, Libri V, et al. Jamip1 (marlin-1) defines a family of proteins interacting with janus kinases and microtubules. *The Journal of biological chemistry*. 2004. 279: 43168–43177.

90. Kumar N, Mishra J, Narang VS, Waters CM. Janus kinase 3 regulates interleukin 2-induced mucosal wound repair through tyrosine phosphorylation of villin. *The Journal of biological chemistry*. 2007. 282: 30341–30345.
91. Mishra J, Karanki SS, Kumar N. Identification of molecular switch regulating interactions of Janus kinase 3 with cytoskeletal proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2012. 287: 41386–41391.
92. Mahankali M, Henkels KM, Alter G, Gomez-Cambronero J. Identification of the catalytic site of phospholipase D2 (PLD2) newly described guanine nucleotide exchange factor activity. *The Journal of biological chemistry*. 2012. 287: 41417–41431.
93. Stein JV, Soriano SF, M'rini C, Nombela C, González G, Rodríguez JM, Mellado M, Girard JP, Carlos Martínez C. CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway. 2003. *Blood* 101: 38-44.
94. Bengtsson T, Stendahl O, Andersson T. The role of the cytosolic free Ca²⁺ transient for fMet-Leu-Phe induced actin polymerization in human neutrophils. *European journal of cell biology*. 1986. 42: 338–343.
95. Hirayama A, Adachi R, Otani S, Kasahara T, Suzuki K. Cofilin plays a critical role in IL-8-dependent chemotaxis of neutrophilic HL-60 cells through changes in phosphorylation. *Journal of leukocyte biology*. 2007. 81: 720–728.
96. Tybulewicz VL, Henderson RB. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nature reviews Immunology*. 2009. 9: 630–644.
97. Filippi MD, Szczur K, Harris CE, Berclaz PY. Rho GTPase Rac1 is critical for neutrophil migration into the lung. *Blood*. 2007. 109: 1257–1264.
98. Faroudi M, Hons M, Zachacz A, Dumont C, Lyck R, et al. Critical roles for Rac GTPases in T-cell migration to and within lymph nodes. *Blood*. 2010. 116: 5536–5547.
99. Barreiro O, de la Fuente H, Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F. Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunological reviews*. 2007. 218: 147–164.
100. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*. 1999. 99: 23–33.
101. Soriano SF, Serrano A, Hernanz-Falcon P, Martin de Ana A, Monterrubio M, et al. Chemokines integrate JAK/STAT and G-protein pathways Turing chemotaxis and calcium flux responses. *European journal of immunology*. 2003. 33: 1328–1333.
102. Wang LH, Kirken RA, Erwin RA, Yu CR, Farrar WL. JAJ3, STAT, and MAPK signaling pathways as a novel molecular targets for the tyrphostin AG-490 regulation of IL-2-mediated t cell response. *J Immunol*. 1999. 162: 3897-3904.
103. Kirken RA, Erwin RA, Taub D, Murphy WJ, Behbod F, Wang L, Pericle F, Farrar WL. Tyrphostin AG-490 inhibits cytokine-mediated JAK3/STAT5a/b signal transduction and cellular proliferation of antigen-activated human T cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 1999. 65, 981-999.
104. Changelian PS, Moshinsky D, Kuhn CF, Flanagan ME, Munchhof MJ, Harris

- TM, et al. The specificity of JAK3 kinase inhibitors. *Blood*. 2008;111:2155-7.
105. Freeman SA, Lei V, Dang-Lawson M, Mizuno K, Roskelley CD, et al. Cofilin-mediated F-actin severing is regulated by the Rap GTPase and controls the cytoskeletal dynamics that drive lymphocyte spreading and BCR microcluster formation. *Journal of immunology*. 2011. 187: 5887–5900.
 106. Nagata-Ohashi K, Ohta Y, Goto K, Chiba S, Mori R, Nishita K, Kousaka K, Iwamatsu A, Niwa R, Uemura T, Mizuno K. *Jour. Cell Biol.* 2004. 165:4, 456-471.
 107. Soosairajah J, Maiti S, Wiggan O, Sarmiere P, Moussi N, et al. Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *The EMBO journal*. 2005. 24: 473–486.
 108. Arcaro A. The small GTP-binding protein Rac promotes the dissociation of gelsolin from actin filaments in neutrophils. *The Journal of biological chemistry*. 1998. 273: 805–813.
 109. Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell*. 2004. 116: 167–179.
 110. Iden S, Collard JG. Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008. 9: 846–859.
 111. Gutjahr MC, Rossy J, Niggli V. Role of Rho, Rac, and Rho-kinase in phosphorylation of myosin light chain, development of polarity, and spontaneous migration of Walker 256 carcinosarcoma cells. *Experimental cell research*. 2005. 308: 422–438.
 112. Mueller A, Strange PG. CCL3, acting via the chemokine receptor CCR5, leads to independent activation of Janus kinase 2 (JAK2) and Gi proteins. *FEBS letters*. 2004. 570: 126–132.

13. PUBLICACIONES

Esta tesis doctoral, dio lugar a la siguiente publicación:

Jak3 Enables Chemokine-Dependent Actin Cytoskeleton Reorganization by Regulating Cofilin and Rac/Rhoa GTPases Activation. Ambriz-Peña X, García-Zepeda EA, Meza I, Soldevila G (2014) Jak3 Enables Chemokine-Dependent Actin Cytoskeleton Reorganization by Regulating Cofilin and Rac/Rhoa GTPases Activation. PLoS ONE 9(2): e88014. doi: 10.1371/journal.pone.0088014