

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**PAPEL DEL RECEPTOR DE DOPAMINA D3 EXPRESADO EN LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup>  
EN RESPUESTA ANTITUMORAL**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

**CATALINA ALEJANDRA VALERIA GUTIERREZ**

TEMUCO – CHILE  
2013

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**PAPEL DEL RECEPTOR DE DOPAMINA D3 EXPRESADO EN LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup>  
EN RESPUESTA ANTITUMORAL**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

**CATALINA ALEJANDRA VALERIA GUTIERREZ**

**PROFESOR GUIA: DR. RODRIGO ANDRES PACHECO RIVERA**

TEMUCO – CHILE  
2013

**PAPEL DEL RECEPTOR DE DOPAMINA D3 EXPRESADO EN LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup>  
EN RESPUESTA ANTITUMORAL**

PROFESOR GUIA : \_\_\_\_\_  
Dr. Rodrigo Pacheco Rivera  
Jefe del Laboratorio de Neuroinmunología  
Fundación Ciencia & Vida

PROFESOR CONSEJERO : \_\_\_\_\_  
Mg. Favián Treulén Seguel  
Centro de Biotecnología en Reproducción  
(CEBIOR)  
Universidad de La Frontera

CALIFICACION PROMEDIO TESIS : \_\_\_\_\_

## DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a mi familia, pero en especial a mis papas Alicia y Miguel por confiar siempre en mí, por apoyarme en todas las decisiones académicas que he tomado, y por darme fuerzas para aguantar estos 5 años fuera de mi casa. Sus palabras cada día, me hicieron comprender lo importante que es terminar algo que empezaste. Gracias por escuchar mis quejas sobre la "U" y mis “papá mándame plata para los pasajes”, porque siempre decían bueno, pero con un: ¿otra vez vas a viajar?. Siempre han estado ahí para mí, para comprenderme, para amarme y enseñarme de la vida. Muchas gracias por ser mis padres.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis hermanas por la confianza depositada en mí durante todos estos años, por sus consejos. A mi hermana Nicole por recibirme en su hogar mientras desarrollaba mi tesis, por hacerme la estadía en Santiago más familiar. También quiero agradecer a mi tía Carmen por acompañarme durante los cuatro años de mi estadía en Temuco, por su alegría y su forma de vivir, y por compartir conmigo alegrías y penas.

Agradecer además a los amigos que hice en la universidad, ya que la permanencia en Temuco fue mucho más amena gracias a su compañía, sus risas, sus historias, todos los días era algo diferente, gracias por escucharme y también por aconsejarme, siempre serán parte de mi vida. En forma especial, quiero agradecer a mi pololo Rodrigo, quien durante 3 años de mi estadía universitaria ha estado ahí para apoyarme y escucharme a la distancia, agradecerle por amarme, por darme alegrías, y por hacerme parte de sus logros académicos y profesionales.

Agradecer mis compañeros de laboratorio, y a las personas que estuvieron cerca para enseñarme, Francisco Contreras y Claudio Figueroa gracias por ser mi guías este año. También agradezco al Doctor Rodrigo Pacheco, por darme la oportunidad de hacer la tesis en su laboratorio y poner a mi disposición todo lo requerido para hacer esta investigación.

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.1 Células T: principales orquestadoras de la respuesta inmune adaptativa. ....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 ESPECIALIZACIÓN DE LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup> EN EL DESARROLLO DE RESPUESTAS CITOTÓXICAS. ....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.1 Perfil molecular de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos o Tc1. ....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Células dendríticas en la inmunidad antitumoral.....</b>	<b>25</b>
<b>2.4 REGULACIÓN DE LA INMUNIDAD MEDIADA POR EL SISTEMA NERVIOSO. ....</b>	<b>28</b>
<b>2.4.1 El sistema dopaminérgico.....</b>	<b>30</b>
<b>2.4.2 Regulación de linfocitos T y DCs por expresión de DARs. ....</b>	<b>31</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 HIPÓTESIS.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>35</b>
<b>3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>35</b>
<b>4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 ANIMALES.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2 PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup>.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3 POLARIZACIÓN DE LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup> HACIA EL FENOTIPO Tc1. ....</b>	<b>37</b>
<b>4.4 EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO MEDIANTE TRANSCRIPCIÓN REVERSA. ....</b>	<b>38</b>
<b>4.5 RT-PCR EN TIEMPO REAL.....</b>	<b>38</b>
<b>4.6 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS Y MOLÉCULAS CITOTÓXICAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO. ....</b>	<b>39</b>
<b>4.7 MODELO DE CRECIMIENTO TUMORAL DE MELANOMA B16.....</b>	<b>39</b>

4.8	CO-CULTIVO DE EXTRACTO CELULAR B16 EN PRESENCIA DE LINFOCITOS TOTALES PROVENIENTES DE RATONES DESAFIADOS CON TUMOR B16.	40
4.9	ENSAYO DE CITOTOXICIDAD <i>IN VITRO</i> .	41
4.10	GENERACIÓN DE DCs DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA	42
4.11	INMUNIZACIÓN CON DCs CARGADAS CON OVA Y EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE CÉLULAS T CD8+ <i>IN VIVO</i> .	42
4.12	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	43
5.	RESULTADOS	44
5.1	LA AUSENCIA DEL D3R EN LINFOCITOS T CD8+ TOTALES ESTIMULADOS A DIFERENCIAR HACIA EL FENOTIPO Tc1 NO AFECTA LA PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$ <i>IN VITRO</i> .	44
5.2	LA EXPRESIÓN DEL D3R NO AFECTA LA PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$ POR PARTE DE LINFOCITOS T CD8+ DE MEMORIA Y EFECTORES.	46
5.3	LA EXPRESIÓN DEL D3R EN LINFOCITOS T CD8+ VÍRGENES FAVORECE LA POLARIZACIÓN HACIA FENOTIPO Tc1 <i>IN VITRO</i> .	48
5.4	RATONES DEFICIENTES EN EL D3R PRESENTAN UN RETRASO EN EL CRECIMIENTO TUMORAL EN EL MODELO DE MELANOMA MURINO B16.	55
5.5	RATONES DEFICIENTES EN EL D3R INDUCEN UNA RESPUESTA CITOTÓXICA NORMAL FRENTE AL DESAFÍO TUMORAL CON MELANOMA B16.	58
5.6	LA INMUNIZACIÓN CON DCs DEFICIENTES EN EL D3R INCREMENTA LA PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$ POR LINFOCITOS T CD8+.	60
6.	DISCUSIÓN	63
7.	CONCLUSIONES	69
8.	REFERENCIAS	70

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Interacción neuroinmune.....	<b>29</b>
<b>Figura 2.</b> La expresión de D3R favorece la función efectora basal del fenotipo Tc1 en linfocitos T CD8 <sup>+</sup> totales aislados de bazo.....	<b>45</b>
<b>Figura 3.</b> La expresión del D3R no afecta la producción de IFN- $\gamma$ por parte de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> de memoria y efectores .....	<b>47</b>
<b>Figura 4.</b> Linfocitos T CD8 <sup>+</sup> vírgenes deficientes en el D3R tienden a tener una menor capacidad de diferenciar hacia el fenotipo Tc1 <i>in vitro</i> .....	<b>50</b>
<b>Figura 5.</b> La expresión del D3R en linfocitos T CD8 <sup>+</sup> vírgenes favorece la adquisición del fenotipo Tc1 <i>in vitro</i> .....	<b>53</b>
<b>Figura 6.</b> Ratones deficientes en el D3R presentan un retraso en el crecimiento tumoral en un modelo de melanoma .....	<b>57</b>
<b>Figura 7.</b> Ratones deficientes en el D3R inducen una respuesta citotóxica normal frente al desafío tumoral con melanoma B16 .....	<b>60</b>
<b>Figura 8.</b> La inmunización con DCs deficientes en el D3R incrementa la producción de IFN- $\gamma$ por linfocitos T CD8 <sup>+</sup> <i>in vivo</i> .....	<b>62</b>



**ABREVIACIONES**

5-HT= Serotonina  
5-HTR= Receptor de serotonina  
AADC= Descarboxilasa de Aminoácidos Aromáticos  
ACh= Acetilcolina  
AChRs= Receptor de acetilcolina  
Ag= Antígeno  
APC= Célula presentadora de antígeno  
cAMP= Adenosin monofosfato cíclico  
CFA= Adyuvante completo de Freund  
CFSE= Carboxifluoresceína Ester Succinimidil  
COMT= Catel-o- metil transferasa  
D3KO= Ratones carentes en el D3KO  
D3R= Receptor de dopamina D3  
DA= Dopamina  
DARs= Receptores de dopamina  
DAT= transportador de DA  
DC= célula dendrítica  
DCs= Células dendríticas  
DβH= Dopamina β hidroxilasa  
Eomes= Eomesodermin  
ERKs= Extracellular Regulated Kinase  
Fas L= Fas ligando  
FASL= Fas Ligando  
FBS= Suero fetal bovino  
Gas= Subunidad Gα estimuladora  
Gai= Subunidad Gα inhibitoria  
Glu= Glutamato  
GluR= Receptor de glutamato

IFN- $\gamma$ = Interferón  $\gamma$   
IL-10= interleuquina 10  
IL-12= interleuquina 12  
IL-23= interleuquina 23  
IL-4= interleuquina 4  
JNKs= c-Jun Kinase  
LAMP-1= proteína de membrana asociada al lisosoma  
LPS= lipopolisacárido bacteriano  
MAO= Monoamina oxidasa  
MAPKs= Mitogen-activated protein kinase  
MFI= Intensidad de fluorescencia media  
MHC= Complejo mayor de histocompatibilidad  
NE/ER= Receptor de norepinefrina/epinefrina  
NE= Norepinefrina  
NK= célula asesina natural  
OVA= ovoalbúmina  
pMHC= Complejo péptido-MHC  
RE= retículo endoplásmico  
SNC= Sistema Nervioso Central  
T regs= linfocitos T reguladores  
TAA= antígenos asociados a tumor  
TAP=P procesamiento antigénico  
Tbet= T cell specific T-box transcription factor  
Tc1= linfocito T citotóxico tipo 1  
Tc1= Linfocito T citotóxico tipo 1  
Tc17= Linfocito T citotóxico tipo 17  
Tc2= Linfocito T citotóxico tipo 2  
TCR= Receptor de células T  
Th= linfocito T colaborador tipo 1  
TNF- $\alpha$ = factor de necrosis tumoral- $\alpha$

WT= Normal

$\beta$ 2m=  $\beta$  2 microglobulina

## RESUMEN

El sistema inmune constituye el principal sistema de vigilancia y protección frente a patógenos y células malignas y para llevar a cabo esta importante tarea utiliza tanto un componente innato como uno adaptativo. Este último, se compone de linfocitos T y B e incluye numerosos elementos de reconocimiento antígeno-específicos y mecanismos eficaces tanto para eliminar patógenos y células tumorales, como para tolerar componentes propios. La activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en respuesta a patógenos intracelulares y células malignas conduce a la diferenciación de estas células hacia el fenotipo efector Tc1. Las células Tc1 se caracterizan por la secreción de IFN- $\gamma$  y moléculas citotóxicas, permitiendo a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores atacar directamente células tumorales o infectadas expresando antígenos extraños.

En el último tiempo, se ha demostrado que receptores para neurotransmisores clásicamente expresados en el sistema nervioso, también son expresados en las superficies de células inmunes, los cuales pueden jugar un rol fisiológico en la regulación de la respuesta inmune. Así, el neurotransmisor dopamina (DA) representa un potencial modulador de la respuesta inmune, ya que existen receptores de DA (DARs) expresados en células del sistema inmune. De manera importante, los niveles plasmáticos de DA se encuentran alterados en patologías inmunes y, por otra parte, existe un desbalance en la expresión de los DARs en linfocitos T de pacientes con patologías inmunes y neurológicas, lo cual sugiere que la regulación dopaminérgica de la respuesta inmune juega un papel relevante en estas patologías. Entre los cinco DARs descritos, este trabajo se centra en el DAR D3 (D3R), debido a que este presenta la mayor afinidad por su ligando y a que evidencias farmacológicas sugieren que es capaz de modular tanto la producción de IFN- $\gamma$  como la migración de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

El propósito de esta tesis ha sido establecer si la expresión del D3R en linfocitos T CD8<sup>+</sup> contribuye en el proceso de diferenciación hacia el fenotipo efector Tc1, beneficiando así la capacidad antitumoral de estas células. Los resultados obtenidos, indican una disminución de la

capacidad de adquirir el fenotipo Tc1 en células carentes del D3R *in vitro*. De manera interesante, el estudio de la respuesta inmune anti-tumoral en un modelo de melanoma *in vivo* mostró que ratones carentes en el D3R (D3KO) presentan un retraso en el crecimiento tumoral. Sin embargo, al estudiar la relevancia del D3R expresado específicamente en linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el modelo de melanoma, los resultados indicaron que este receptor parece no ser relevante. Así, es posible concluir que a pesar de que la expresión y/o estimulación del D3R regula funciones clave de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, su expresión en esta población celular no es la encargada de potenciar la respuesta antitumoral. Finalmente, fue posible identificar que la falta del D3R en células dendríticas induce mayor frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) *in vivo*, sugiriendo un potencial mecanismo para la mayor protección frente al desafío tumoral observada en ratones D3KO.

## SUMMARY

The immune system constitutes the major surveillance and protection system against pathogens and malignant cells, and to accomplish this task it uses both an innate as well as an adaptive arm. The latter is composed of T and B lymphocytes which involve many elements of antigen-specific recognition and effective mechanisms both to eradicate pathogens and tumor cells, as well as to tolerate self-components. Activation of CD8<sup>+</sup> T cells in response to intracellular pathogens and malignant cells drives the T-cell differentiation towards Tc1 effector phenotype. The Tc1 phenotype is characterized by the secretion of IFN- $\gamma$  and cytotoxic molecules, which allow effector CD8<sup>+</sup> T-cells to directly attack infected or tumor cells expressing extraneous antigens.

During last two decades, it has been shown that neurotransmitter receptors classically expressed in the nervous system are also expressed on the surface of immune cells, which may have a physiological role in the regulation of the immune response. Since dopamine (DA) receptors (DARs) have been found to be expressed in several immune cells, the neurotransmitter DA represents a potential modulator of the immune response. In this regard, DA plasma levels are altered in immune pathologies. Moreover, there is an imbalance in the expression of DARs in T lymphocytes from patients with immune and neurological pathologies, suggesting that dopaminergic regulation of the immune response plays an important role in these pathologies. Among the five DARs described, this work focuses on DAR D3 (D3R), because this has the highest affinity for DA and as pharmacological evidence suggests that it is able to modulate both the production of IFN- $\gamma$  and the migration of T CD8<sup>+</sup> lymphocytes.

The aim of this thesis was to establish whether the expression of D3R in CD8<sup>+</sup> T lymphocytes contributes in the differentiation process towards a Tc1 effector phenotype, thus favoring the antitumor capacity of these cells. The results show a decreased ability to acquire the Tc1 phenotype in CD8<sup>+</sup> T cells lacking the D3R *in vitro*. Interestingly, the study of anti-tumor immune response *in vivo* in a model of melanoma showed a delay on tumor growth in D3R-deficient (D3KO) mice. However, when the role of D3R expressed specifically in CD8<sup>+</sup> cells

was analyzed in the antitumor immune response in the melanoma model, results indicated that D3R expressed in CD8<sup>+</sup> T-cells seems to be irrelevant. Thus, it is possible to conclude that, although D3R expression and stimulation regulate key steps for CD8<sup>+</sup> T cell function, its expression in this cell population is not responsible for enhancing the antitumor immune response. Finally, it was possible to identify that dendritic cells lacking D3R expression induce a higher frequency of IFN- $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cells *in vivo*, suggesting a potential mechanism for the increased protection against tumor challenge seen on D3KO mice.

## 1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune vigila y protege al organismo ante el ataque de patógenos y el crecimiento de focos neoplásicos. Está compuesto por un componente innato y otro adaptativo, siendo el sistema inmune innato el que actúa como primera barrera de defensa, caracterizándose por montar una respuesta muy rápida pero con un bajo nivel de diversidad y especificidad en cuanto al reconocimiento de antígenos. En contraste, la rama adaptativa se activa de manera más lenta pero altamente eficaz y específica en la eliminación de amenazas, posee una alta diversidad en la respuesta y mantiene la tolerancia hacia componentes propios. Las células de la rama adaptativa son los linfocitos T y B. Los linfocitos B, reconocen antígenos de manera soluble y responden mediante la liberación de anticuerpos, mientras que los linfocitos T, reconocen antígenos o partes de ellos como péptidos cargados en moléculas del complejo mayor histocompatibilidad (pMHC) presente en las células presentadoras de antígenos (*Antigen presenting cells*, APCs). Estos complejos pueden ser de clase I, reconocidos por las células T CD8<sup>+</sup>, o de clase II, reconocidos por células T CD4<sup>+</sup>. Las células T CD8<sup>+</sup> tienen la capacidad de reconocer y eliminar células tumorales o células infectadas por patógenos intracelulares mediante la inducción del fenotipo citotóxico Tc1, el cual es promovido por la producción de interleuquina 12 (IL-12) por parte de células presentadoras de antígeno. El fenotipo Tc1 es caracterizado por la expresión de los factores de transcripción Tbet (*T cell specific T-box transcription factor*) y Eomes (*Eomesodermin*), los que a su vez inducen la expresión y liberación de citoquinas y moléculas efectoras como IFN- $\gamma$ , perforinas y granzimas. En conjunto todas estas señales, permiten la eficiente eliminación de células infectadas o malignas.

Mientras la atención se ha centrado principalmente en la activación del sistema inmune adaptativo, poca atención se ha prestado a los primeros eventos de la respuesta antitumoral. Con respecto a esto, resulta interesante caracterizar cómo influyen estos eventos iniciales en las células dendríticas (*dendritic cells*, DCs), quienes representan un atractivo vector para inmunoterapias anti-tumorales. Las DCs poseen propiedades claves para la inducción potente de respuestas antitumorales las que incluyen una alta capacidad de captura y presentación de



antígenos, lo que resulta en una eficiente inducción y mantenimiento de la respuesta inmune adaptativa y por lo tanto el ataque sostenido contra células tumorales.

Creciente evidencia ha demostrado que células del sistema inmune innato y adaptativo, especialmente las células T, establecen diversos nexos con el sistema nervioso, ya que muchos neurotransmisores pueden regular la diferenciación y función de los linfocitos T y otras células del sistema inmune. Más aún, diversas evidencias sugieren al neurotransmisor DA como un potencial regulador inmune, ya que diversas células inmunes expresan DARs. De manera importante, se han descrito alteraciones de los niveles plasmáticos de DA en patologías inmunes, encontrándose estos disminuidos en autoinmunidades y aumentados en cáncer (Pacheco et al., 2009, 2010)). Además, se ha demostrado la existencia de un desbalance en la expresión de DARs en linfocitos T de pacientes con patologías inmunes y neurológicas (Pacheco et al., 2009), lo cual sugiere que la regulación dopaminérgica de la respuesta inmune juega un papel relevante en este tipo de desórdenes. De los cinco receptores descritos hasta la fecha (D1R – D5R), el D3R es el que presenta mayor afinidad por DA y pocos estudios han documentado su relevancia en la función de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. En el estudio realizado por Watanabe (2006) se reportó que el D3R es expresado en linfocitos T CD8<sup>+</sup> obtenidos de humano y de ratón. Desde la perspectiva funcional, los estudios realizados por Ilani (2004) y Watanabe (2006) han demostrado que la estimulación farmacológica del D3R en células T CD8<sup>+</sup> favorece tanto la secreción de IFN- $\gamma$ , como la capacidad de migrar hacia nódulos linfáticos, respectivamente. Considerando estos antecedentes y tomando en cuenta que estas células están implicadas en el reconocimiento y la eliminación de células tumorales, principalmente por la secreción de IFN- $\gamma$ , el objetivo de este trabajo es evaluar si la expresión del D3R está implicada en la adquisición del fenotipo efector Tc1 de células T CD8<sup>+</sup> y si favorece la respuesta antitumoral, en un modelo de melanoma murino.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Respuesta inmune adaptativa

El sistema inmune ha desarrollado múltiples funciones que le permiten constituir una barrera que entrega protección al organismo frente al ataque de agentes patógenos y el desarrollo de cáncer. Tiene la capacidad de generar una enorme variedad de células y moléculas que de forma muy eficaz y específica reconocen y eliminan una diversidad casi infinita de antígenos extraños.

En el estudio de la respuesta inmune normalmente se reconocen dos tipos de componentes, por un lado está la respuesta inmune innata, la cual aporta la primera línea de defensa frente a amenazas exteriores e incluso está preparada antes de contraerse una infección. Cuando esta primera barrera se ve superada por los agentes patógenos, se desarrolla la respuesta inmune adaptativa, que se caracteriza por exhibir una enorme diversidad y especificidad de respuestas, las cuales además presentan una mayor eficiencia ante re-exposiciones frente antígenos extraños, estableciendo la memoria inmunológica. En conjunto, los linfocitos T y B son los responsables de las propiedades antígeno-específicas que posee el sistema inmune, ya que ambos producen receptores de superficie celular a los cuales se une el antígeno extraño. Los linfocitos B son células que reconocen antígenos extracelulares circulantes y se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos, los cuales actúan como las principales moléculas efectoras de la inmunidad humoral. La inmunidad celular es comandada por los linfocitos T, los cuales orquestan la respuesta inmune indicando las funciones que deben adquirir diferentes tipos celulares. Así, estas células definen el tipo de anticuerpos secretados por las células plasmáticas y la actividad microbicida de los macrófagos, por nombrar solo algunos ejemplos. Para que los linfocitos T puedan reconocer al antígeno capturado, este debe ser procesado en pequeños péptidos que serán cargados en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) (Banchereau et al., 2000), De este modo, se genera el complejo pMHC, el cual es reconocido como ligando por el receptor de antígenos en las células T (TCR) (Pacheco et al., 2012). La activación de las células T se producirá entonces, por la unión

del pMHC con el TCR, lo que conduce a la proliferación y diferenciación de células T en diversos tipos de células efectoras, principales mediadoras de respuesta inmune contra el patógeno.

### **2.1.1 Células T: principales orquestadoras de la respuesta inmune adaptativa.**

Los linfocitos T y B presentan receptores para antígenos expresados en la membrana celular, los cuales son generados por mecanismos similares de recombinación somática. A diferencia del receptor unido a la membrana en células B, los TCRs presentes en linfocitos T sólo reconocen antígenos que están unidos a moléculas de MHC. La estimulación del TCR produce la activación de células T vírgenes, la cual puede ser regulada positiva o negativamente por un alto número de interacciones inter-celulares no dependientes de antígeno, mediadas por moléculas solubles y unidas a la superficie celular. De este modo, los linfocitos T que reconocen un pMHC definido sufren un proceso de expansión y diferenciación que las conduce a la adquisición de un fenotipo adecuado de célula T efectora, las que pueden adquirir diferentes funciones para promover la eliminación del diferentes tipos de patógenos (Wong y Pamer, 2003), de tumores (Amedei et al., 2011, Park et al., 2011), así como también potenciar la función efectora de otros tipos de células inmunes, como las células B, los macrófagos y las células asesinas naturales (*natural killer cell*, NK).

Clásicamente se han descrito dos tipos de linfocitos T, los que se diferencian por la expresión de las glicoproteínas de membrana CD4 o CD8, y que operan como correceptores para el complejo pMHC en la superficie celular. Por un lado, las células T CD4<sup>+</sup>, reconocen el antígeno cargado en moléculas de MHC clase II, mientras que las células T CD8<sup>+</sup> reconocen antígenos cargados en moléculas de MHC clase I (Nouri-Shirazi et al., 2000). Otro nombre dado a células T CD4<sup>+</sup> es también colaboradores o helper (Th), ya que ayudan en las respuestas de otras células del sistema inmunitario tales como linfocitos T CD8<sup>+</sup>, linfocitos B y neutrófilos, entre otros (Nouri-Shirazi et al., 2000). Adicionalmente se ha descrito una población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, llamados T reguladores (Tregs), los cuales juegan un rol importante en el mantenimiento de la

tolerancia a los constituyentes propios, la homeostasis y la prevención de enfermedades autoinmunes (Sakaguchi, 2005).

## **2.2 Especialización de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el desarrollo de respuestas citotóxicas.**

Las células T CD8<sup>+</sup> tienen la propiedad de reconocer células tumorales o células infectadas expresando antígenos extraños como pMHC en la superficie celular y así inducir la muerte de estas células por la secreción de gránulos citotóxicos y producción de factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Schoenborn y Wilson, 2007). La activación de linfocitos T efectoras o Tc puede potenciar además la función de macrófagos y células NK mediante la producción de IFN- $\gamma$ , por lo tanto son claves en la respuesta inmune contra patógenos intracelulares y tumores.

La maduración de linfocitos T CD8<sup>+</sup> ocurre en el timo, órgano en el cual ocurre el reordenamiento de los genes del TCR que permite reconocer péptidos propios cargados en MHC clase I con baja afinidad. Una vez maduros, estas células entran a circulación por el torrente sanguíneo y la linfa, patrullando órganos linfoides secundarios como bazo y nódulos linfáticos, los cuales representan el sitio de inicio de la respuesta inmune adaptativa. Una vez producido el reconocimiento de un antígeno extraño, el cual generalmente es presentado por las APCs, se desencadena una cascada de señales intracelulares y la activación de diferentes factores de transcripción que inducen la activación del linfocito T y la producción de citoquinas o factores citotóxicos por parte de estas células. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> maduros pueden subdividirse en tres poblaciones generales: células vírgenes, de memoria y efectoras; cada una definida por la expresión de moléculas de superficie como CD62L (L-selectina) y CD44. CD62L es una molécula que permite la migración de linfocitos T hacia órganos linfoides secundarios. Por otro lado, la expresión de CD44, es una glicoproteína de transmembrana que está involucrada en la migración de linfocitos al sitio de infección. De esta manera, linfocitos T vírgenes presentan una alta expresión de CD62L y una baja expresión de CD44, y linfocitos T activados presentan una baja expresión de CD62L, mientras CD44 se ve incrementado (Hamann et al., 2000; Lesley et al., 1993; Sallusto et al., 1999). Es así como estas moléculas son comúnmente utilizadas para

identificar los diferentes tipos de linfocitos T, ya sean células vírgenes, efectoras o de memoria (Mackay, 1993).

Una vez que el linfocito reconoce el pMHC presentado por las APCs se promueven eventos de fosforilación, aumentan los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  y se genera una cascada de señales que estimulan a las células T  $\text{CD8}^+$  vírgenes a proliferar y diferenciarse (Dustin y Shaw, 1999; Grakoui et al., 1999; Monks et al., 1998), con la subsecuente formación de linfocitos T de memoria. Por ejemplo, células T  $\text{CD8}^+$  que adquieren capacidad efectora ante un patógeno alcanzan su número máximo a los 6-8 días posterior al encuentro con el antígeno (Kaech, Wherry, et al., 2002). Una vez que el patógeno es eliminado, la mayoría de las células efectoras muere y solo unas pocas sobreviven para convertirse en células T de memoria, con un periodo de vida más prolongado (Harty y Badovinac, 2002; Kaech, Wherry, et al., 2002) y una capacidad de respuesta más rápida que confiere protección antígeno-específica más potente ante una nueva exposición al patógeno.

La función efectora adquirida por los linfocitos T  $\text{CD8}^+$  para atacar patógenos intracelulares y tumores, se caracteriza por lo producción de dos citoquinas principales,  $\text{IFN-}\gamma$  y  $\text{TNF-}\alpha$  (Glimcher et al., 2004; Williams y Bevan, 2007; Rutishauser y Kaech, 2010).  $\text{IFN-}\gamma$  es crítico para la respuesta inmune adaptativa ya que actúa contra infecciones intracelulares (virus o bacterias) y células tumorales, a través de la coordinación de programas celulares que llevan a la transcripción de genes inmunológicamente relevantes, especialmente los relacionados con la respuesta de macrófagos a la infección, procesamiento y presentación de antígenos, respuesta antiviral, respuesta antiproliferativa con acciones sobre la apoptosis, activación de efectores antimicrobianos, inmunomodulación y tráfico de leucocitos (Ikeda et al., 2002; Rosenzweig y Holland, 2005; Schroder et al., 2004). Además, esta citoquina contribuye a la activación de macrófagos, incrementando la capacidad fagocítica y la producción de citoquinas y péptidos antimicrobianos (Boehm et al., 1997). De manera muy importante,  $\text{IFN-}\gamma$  es capaz de regular la diferenciación de linfocitos T  $\text{CD4}^+$  hacia el fenotipo Th1 (Billiau, 1996), otro tipo de linfocitos T clave en la respuesta antitumoral y contra las infecciones por patógenos intracelulares. Por otra parte,  $\text{TNF-}\alpha$  es una citoquina proinflamatoria producida por varios tipos celulares incluyendo macrófagos, linfocitos y monocitos, que inhibe la expresión y replicación de genes virales,

pudiendo también iniciar la vía de apoptosis en células infectadas (Wallach et al., 1999; Baud y Karin, 2001). Adicionalmente, en base a las citoquinas liberadas por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y su capacidad citotóxica, se pueden dividir en tres subtipos denominados: Tc1, Tc2 y Tc17. Los linfocitos Tc1, producen IFN- $\gamma$  y poseen gran capacidad citotóxica (Fong y Mosmann, 1990; Croft et al., 1994; Sad et al., 1995; Kemp y Ronchese, 2001; Dobrzanski et al., 2006; Ye et al., 2007). Los linfocitos Tc2 poseen baja capacidad citotóxica y producen IL-4 e IL-10 (Croft et al., 1994; Helmich y Dutton, 2001; Dobrzanski et al., 2004), mientras que el fenotipo Tc17 produce IL-17 y también presenta bajo potencial citotóxico (Hamada et al., 2009; Kondo et al., 2009; Garcia-Hernandez et al., 2010). La transición de células T CD8<sup>+</sup> vírgenes hacia células efectoras Tc1, requiere de cambios en la expresión de genes específicos, (Kaech et al., 2002), mediado por la expresión de factores de transcripción maestros, tales como Tbet (Sullivan et al., 2003; Joshi et al., 2007) y Eomes (Pearce, 2003) quienes son los reguladores de mayor relevancia descritos en la inducción de una respuesta Tc1 (Pearce, 2003; A. M. Intlekofer et al., 2007). Por su parte, los fenotipos Tc2 y Tc17, son regulados por la expresión de los factores de transcripción maestros GATA3 y ROR $\gamma$ t, respectivamente (Garcia-Hernandez et al., 2010).

### **2.2.1 Perfil molecular de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos o Tc1.**

La diferenciación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> hacia el fenotipo Tc1 es regulada a nivel transcripcional por dos miembros de la familia de la caja T de factores de transcripción, Tbet y Eomes (Sullivan et al., 2003; A. M. Intlekofer et al., 2007), los cuales además inhiben la adquisición de fenotipos alternativos como Tc2 y Tc17 (Zhu et al., 2010). Ambos actúan de forma cooperativa, y en parte redundante, para inducir el fenotipo Tc1, mediante la inducción de IFN- $\gamma$ , perforina y granzimas (A. M. Intlekofer et al., 2005; Joshi et al., 2007; A. Banerjee et al., 2010).

El factor de transcripción Tbet se encuentra altamente expresado en células T CD4<sup>+</sup> de fenotipo Th1, células NK y linfocitos T CD8<sup>+</sup> Tc1, siendo crítico en la función efectora de las dos primeras y parcialmente requerido en la última (Zhu et al., 2010). Es así como en las células T CD8<sup>+</sup> la expresión de Tbet no es esencial (Sullivan et al., 2003) debido a la fuerte expresión de

Eomes, el cual puede programar la expresión de IFN- $\gamma$  ya sea de manera independiente, o bien, en cooperación con Tbet (Pearce, 2003).

Como se ha mencionado, una de las características principales de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> es la expresión de la citoquina inflamatoria IFN- $\gamma$ . Esta es una citoquina que originalmente fue descubierta como un agente que detiene la replicación viral (Isaacs y Lindenmann, 1957). La activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> por el reconocimiento del complejo pMHC en presencia de citoquinas como IL-12, induce la polarización hacia el fenotipo Tc1. Una vez activadas, estas células comienzan a producir grandes cantidades de IFN- $\gamma$ . Esta citoquina presenta una amplia gama de actividades proinflamatorias, contribuyendo fuertemente al desarrollo de la respuesta inmune contra patógenos intracelulares y células tumorales. En este sentido, IFN- $\gamma$  también controla la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes hacia el fenotipo efector Th1 (O'Garra y Arai, 2000; Szabo et al., 2003; Schulz et al., 2009) e inhibe la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th2 y Th17. Además, amplifica la función de las APCs mediante la estimulación de la fagocitosis, ya que estimula la expresión de moléculas de MHC clase I y clase II (Boehm et al., 1997), por lo que las células infectadas son más fáciles de reconocer. Otra función biológica de IFN- $\gamma$  es la activación de macrófagos para que destruyan a los microorganismos fagocitados. Experimentos desarrollados con ratones que carecen de IFN- $\gamma$  o el receptor para este, muestran la gran importancia de esta citoquina en la inmunidad protectora contra tumores y patógenos intracelulares. Dichos ratones muestran una susceptibilidad exacerbada a sufrir infecciones por diversos patógenos, como el virus de la coriomeningitis linfocítica (Russell y Ley, 2002), virus vaccinia y también a bacterias intracelulares como *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium tuberculosis* (Cooper et al., 1993; Mogue et al., 2001; Shtrichman y Samuel, 2001). Otros experimentos muestran que la carencia de IFN- $\gamma$  o de su receptor, resultan en un crecimiento tumoral acelerado y en el aumento de la mortalidad en modelos murinos de tumor ocular (Coursey et al., 2011), cáncer de mama (Pulaski et al., 2002), leucemia (Yang et al., 2011), pulmón y colon (Qin et al., 2003), entre otros. Así, queda en evidencia el importante papel de IFN- $\gamma$  y su receptor en la respuesta inmune contra células infectadas con patógenos y en la respuesta inmune antitumoral.

Ante el reconocimiento de una célula blanco por parte de linfocitos efectores Tc1, ocurre la polarización de gránulos citotóxicos que contienen perforinas y granzimas hacia el sitio de contacto y la posterior secreción del contenido lítico sobre dicha célula. Las granzimas son proteínas que residen en vesículas citotóxicas en el interior de las células T citotóxicas y células NK, cuya función es inducir la apoptosis de células infectadas o células tumorales y así destruirlas. Las perforinas son proteínas que permiten el paso de granzimas a través de la superficie de la células infectada, causando apoptosis por diversas vías (Catalfamo y Henkart, 2003; Smyth y Trapani, 1995). La vía de exocitosis granular activa poderosamente vías de muerte celular que operan a través de la activación de caspasas, aunque también lo hacen de manera independiente de la activación de estas enzimas (J A Trapani et al., 1998; Sarin et al., 1997). Este proceso requiere la fusión de compartimientos endosomales con la membrana celular, con el fin de liberar moléculas citotóxicas de manera altamente localizada hacia el sitio de contacto con la célula blanco. Lo anterior resulta en la exposición de la proteína de membrana asociada al lisosoma (LAMP-1) en la superficie de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (de Saint Basile et al., 2010), Así, la exposición de LAMP-1, una proteína que normalmente es intracelular, en la superficie celular es un fenómeno que se utiliza para evaluar la capacidad citotóxica de las células.

La molécula perforina se considera crucial en el proceso citotóxico ya que permeabiliza la membrana plasmática de la célula blanco mediante la formación de poros (Kam et al., 2000), lo que resulta en la muerte celular por lisis osmótica y por la entrada de granzimas. Su importancia ha sido demostrada en la inmunidad contra cáncer mediante la utilización de ratones deficientes en perforina (Bolitho et al., 2009). En humanos, se ha demostrado que individuos con mutaciones en el gen que codifica para perforina tienen una mayor frecuencia de linfomas que los individuos control (Chia et al., 2009).

Por otro lado, se ha descrito que la exocitosis de granzimas, pertenecientes a la familia de las serin-proteasas, puede ser modificada por la interacción de células cancerosas con linfocitos T citotóxicos. En este sentido, estudios han determinado que la entrada de granzimas a la célula diana implica la unión a receptores específicos de membrana, siendo algunos tumores capaces de



sintetizar inhibidores de las serin-proteasas que pueden neutralizar a las granzimas, potenciando la sobrevivencia del tumor y al escape del ataque inmune.

Además de los mecanismos nombrados anteriormente, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> pueden inducir la lisis de la célula blanco utilizando otra vía involucrada donde la molécula FAS ligando (FASL) expresada en la superficie de células T CD8<sup>+</sup> se une con la molécula FAS en la célula blanco (Joseph A. Trapani y Smyth, 2002). Esto resulta en la inducción de apoptosis dependiente de caspasas (Nagata y Golstein, 1995; van Parijs y Abbas, 1996) y puede ocurrir no solo ante el reconocimiento de células tumorales o infectadas, sino también para la eliminación de células autorreactivas.

### **2.3 Células dendríticas en la inmunidad antitumoral.**

Las DCs tienen su origen en las células madres hematopoyéticas generadas en la médula ósea para luego convertirse en las células presentadoras de antígenos más potentes y especializadas en la iniciación de la respuesta inmune adaptativa, ya que tienen la capacidad única de activar células T vírgenes (Lanzavecchia y Sallusto, 2001). Una vez capturados por las DCs, los antígenos proteicos son degradados a péptidos que se unen a las moléculas de MHC clase I o MHC clase II y son transportados a la superficie celular para el posterior reconocimiento por linfocitos T antígeno-específicos. Los antígenos proteicos endógenos son inicialmente ubiquitinados y degradados por el proteosoma en el citoplasma. Posteriormente, son transportados al retículo endoplásmico (RE) por moléculas transportadoras asociadas con el procesamiento antigénico (TAP), donde son cargados en las moléculas de MHC clase I. Los complejos pMHC I son llevados desde el RE a la membrana celular a través de la red trans-Golgi para la presentación a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Los antígenos proteicos exógenos son procesados en endosomas que se fusionan con lisosomas que contienen proteasas, responsables de la degradación de las proteínas en péptidos que se unirán a moléculas de MHC clase II. Los complejos pMHC II son transportados a la superficie celular, donde se presentarán a linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Las proteínas exógenas también pueden ser procesadas y presentadas por las DCs a través

del MHC I, en un fenómeno conocido como “presentación cruzada”. Esto permite la activación de una respuesta inmune tanto de linfocitos CD4<sup>+</sup> como de linfocitos T CD8<sup>+</sup> ante antígenos exógenos. Este proceso es particularmente importante en el ambiente tumoral, ya que los antígenos asociados a tumor (*tumor associated antigens*, TAA) son generalmente muy difíciles de reconocer por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos, ya que uno de los mecanismos de evasión utilizados por los tumores es la disminución de moléculas de MHC I. De este modo, los TAA son capturados por las DCs y generalmente son procesados en fragmentos peptídicos y presentados en moléculas de MHC clase II que pueden estimular a células T CD4<sup>+</sup>, pero no células T CD8<sup>+</sup> citotóxicos restringidos por MHC clase I (Takahashi, 2003). Así, es posible indicar que las DCs desempeñan un papel clave en el reconocimiento de antígenos tumorales por los linfocitos T y así en la iniciación de la respuesta inmune anti-tumoral (Bevan, 1976, Moriya et al., 2010).

Una vez que el antígeno es capturado y presentado por DCs en los órganos linfoides secundarios, se desencadena la activación de las células T, la polarización hacia un fenotipo efector adecuado y la inducción de tolerancia (Friedl et al., 2005). Estos eventos requieren de la entrega de señales de parte de las DCs hacia los linfocitos T. La primera señal y la más importante tiene que ver con la interacción del complejo pMHC con el TCR, la cual determina la especificidad de la activación de las células T. La segunda es la unión de moléculas de membrana co-estimuladoras CD80 y CD86 presentes en la DCs con CD28 presente en la célula T, las cuales colaboran en la eficiente activación de linfocitos T. Por último, existe un sistema de proteínas solubles o citoquinas secretada por las DCs y que estimula receptores de membrana en la célula T, modulando la adquisición de los diferentes fenotipos funcionales CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

Tras su activación, los linfocitos T vírgenes sufren un proceso de expansión clonal y de diferenciación a células efectoras secretoras de citoquinas y células memoria. El tipo de respuesta consiguiente está determinado por varios factores de la interacción DC-célula T, tales como la concentración antigénica en las DCs, la afinidad del TCR por el pMHC, la duración de la interacción de las DCs con el linfocito T, el estado de maduración de las DCs, y el tipo de estímulo inductor de dicha maduración (Gett et al., 2003).

Debido a las propiedades únicas que presentan las DCs, entre las que se cuentan una alta capacidad de captura y presentación de antígenos y la eficiente inducción y mantenimiento de las respuestas inmunes, es que estas células representan un atractivo vector para las inmunoterapias destinadas a la eliminación de células tumorales (Zhang et al., 2002, Kuhn y Ronchese, 2013) (Nouri-Shirazi et al., 2000). La mayoría de los ensayos documentados implican el aislamiento de la DCs, seguido de la carga con péptidos derivados de proteínas tumorales que incluyen epítomos definidos para la estimulación de linfocitos T, principalmente  $CD8^+$ . La inducción de una respuesta anti-tumoral exitosa requiere el uso de DCs maduras inmunoestimuladoras por dos motivos: (1) por su capacidad para inducir una respuesta T antígeno-específica y (2) porque las DCs inmaduras pueden inducir tolerancia inmune. Se ha comprobado que las DCs inmaduras inducen la expansión de linfocitos T reguladores, aunque también se ha descrito que las DCs maduras también pueden inducir esta expansión tras ciertos estímulos (D.K. Banerjee et al., 2006; de Vries et al., 2003; McIlroy y Gregoire, 2003). Además, se ha comprobado que las DCs maduras son resistentes a ciertos factores inmunosupresores producidos por las células tumorales, y son fenotípica y funcionalmente estables en ausencia de citoquinas.

Una serie de reportes han demostrado la utilidad terapéutica de estas células en el tratamiento del cáncer, ya sea generando DCs *in vitro* desde la médula ósea de ratones que presentan tumores, las cuales fueron inyectadas a los mismos, o bien, en ensayos clínicos en que se han utilizado DCs cargadas *ex vivo* con TAA como vacunas en cáncer humano. Como resultado, se ve restaurada la habilidad para inducir una efectiva respuesta contra el tumor (Gabrilovich et al., 1996). Por ejemplo, en el estudio realizado por Gervais et al., 2007, eligieron 4 métodos de carga del péptido en DCs mediante la imitación de los mecanismos de inmunidad innata y el uso de células tumorales enteras con el fin de estimular a los linfocitos T. Los resultados obtenidos muestran que las DCs fueron capaces de aumentar la proliferación de linfocitos T y que cuando estimularon la población citotóxica, aumenta la citotoxicidad específica contra células tumorales.

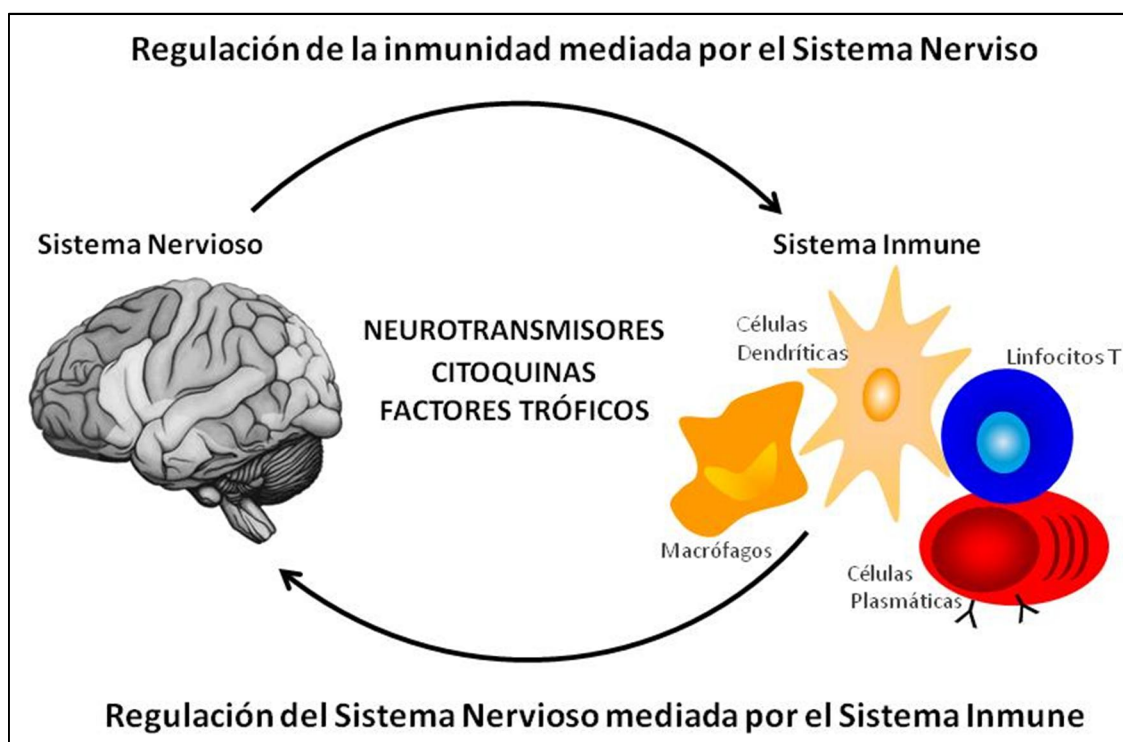
## 2.4 Regulación de la inmunidad mediada por el sistema nervioso.

Tradicionalmente se ha descrito que la función de células del sistema inmune como las células T o DCs es regulada por mediadores inmunes como citoquinas y por una serie de interacciones intercelulares entre distintas células inmunes. Sin embargo, en las últimas dos décadas se ha demostrado que las células del sistema inmune pueden ser reguladas por neurotransmisores (Franco et al., 2007). Respecto a lo anterior, se ha descrito que una serie de receptores para neurotransmisores, clásicamente expresados en el sistema nervioso, tales como receptores de glutamato (GluRs), acetilcolina (AChRs), serotonina (5-HTRs) y DARs entre otros, son expresados en células del sistema inmune. Por ejemplo, las células T expresan GluRs (Pacheco et al., 2004, 2007), DARs (Saha et al., 2001; Besser et al., 2005; Sarkar et al., 2006; Watanabe et al., 2006), 5-HTRs (León-Ponte et al., 2007), AChRs (Kawashima y Fujii, 2003), norepinefrina/epinefrina (NE/ERs) (Elenkov et al., 2000), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (Tian et al., 2004), entre otros; mientras las células B por su parte expresan DARs (McKenna et al., 2002), 5-HTRs (Iken et al., 1995), AChRs (Kawashima y Fujii, 2003), y NE/ERs (Kohm et al., 2002), entre otros.

La identificación de estos receptores en estas y otras células del sistema inmune, sugiere que los neurotransmisores juegan un rol fisiológico en la regulación de la respuesta inmune y que la desregulación de la activación de estos receptores puede contribuir al desarrollo de autoinmunidades o cáncer. Asimismo, este hecho implica que diferentes estados fisiológicos o patológicos del sistema nervioso probablemente puedan tener repercusión en la funcionalidad del sistema inmune. Se ha detectado la existencia de receptores para citoquinas en células del sistema nervioso (Wrona, 2006), que junto con estos receptores en leucocitos, abre la posibilidad de que existan redes de comunicación bidireccional entre células del sistema inmune y el sistema nervioso (Figura 1).

Recientes estudios han revelado que no sólo las neuronas pueden liberar neurotransmisores, sino que también células de sistema inmune innato y adaptativo son capaces de sintetizar y/o capturar neurotransmisores para eventualmente liberar este tipo de moléculas y así establecer

mecanismos autocrinos, paracrinos, yuxtacrinos y, probablemente endocrinos entre diferentes tipos de leucocitos (Franco et al., 2007). Por ejemplo, las células T liberan 5-HT (O'Connell et al., 2006), NE/E (Nishibori et al., 2003), DA (Beck et al., 2004) y ACh (Kawashima y Fujii, 2003). Por su parte las células B, son capaces de liberar DA (Beck et al., 2004), y NE/E (M Cosentino et al., 2000); mientras que las DCs, pueden liberar Glu (Nakano et al., 2008, 2009; Prado et al., 2012), 5-HT y también se ha sugerido que producen DA. Este hecho no solo implica la existencia de vías de comunicación entre células del sistema inmune a través de neurotransmisores, sino que también implica que este tipo de moléculas podría estar involucrado en la comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el sistema nervioso.



**Figura 1. Interacción Neuroinmune.** Una comunicación bidireccional tiene lugar entre el sistema nervioso y el sistema inmune tanto en estado normal como durante el desarrollo de patologías. Las mismas moléculas, incluyendo citoquinas, neurotransmisores y factores tróficos, participan como mediadores en ambas direcciones (Pacheco et al., 2012).

### 2.4.1 El sistema dopaminérgico.

Dentro del Sistema Nervioso Central (SNC), la DA es un neurotransmisor y neuromodulador esencial implicado en diversas funciones clave, tales como el movimiento (Cenci, 2007), la percepción del dolor (Potvin et al., 2009), la secreción hormonal (Ben-Jonathan y Hnasko, 2001), la motivación y el placer (Wise, 2008), así como también participa en procesos de adicción a drogas (Dayan, 2009). Consistente con el importante papel que juega en el CNS, se ha visto que la desregulación de vías que involucran DA pueden desencadenar o potenciar el desarrollo de diferentes enfermedades neurológicas y psiquiátricas (Hoenicka et al., 2007). La DA pertenece al grupo de las aminas biogénicas y de manera más específica, a la familia de las catecolaminas, compuesto por DA, norepinefrina y epinefrina (Mia Levite, 2012).

La síntesis de DA se realiza principalmente en tejidos nerviosos y en la médula de la glándula suprarrenal a partir de L-tirosina. Este aminoácido es convertido a L-DOPA por la Tirosina Hidroxilasa (TH) en el paso limitante de la síntesis de catecolaminas. Posteriormente, la L-DOPA es metabolizada por la Descarboxilasa de Aminoácidos Aromáticos (AADC) para generar DA (Weihe et al., 2006). En algunas neuronas la DA puede ser convertida en NE por la Dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (D $\beta$ H) (Alaniz et al., 1999). Alternativamente, la DA citoplasmática puede ser almacenada en compartimentos vesiculares por medio del transportador vesicular de monoaminas (VMAT-1/2) (F Mignini et al., 2006) o también puede ser degradada por enzimas citoplasmáticas como la Monoamina Oxidasa (MAO-A y MAO-B) (Fiorenzo Mignini et al., 2009) o por la Catecol-*O*-metil transferasa (COMT). Una vez liberada al medio extracelular, la DA puede ser recapturada por el transportador de DA (DAT) (Torres et al., 2003), para ser realmacenada en vesículas o degradada en el citoplasma. De esta manera se controla la vida media de acción de este neurotransmisor.

Los efectos fisiológicos inducidos por DA son mediados por la señalización a través de DARs, entre los cuales se han descrito cinco receptores (D1R-D5R), todos ellos pertenecientes a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G (Strange, 1993). En base a la homología de secuencia aminoacídica, propiedades farmacológicas y las vías

de señalización a las que se acoplan, los DARs han sido clasificados en dos grupos: los DARs de tipo I (D1R y D5R) generalmente se acoplan a la subunidad  $G\alpha$  estimuladora ( $G\alpha_s$ ) de la proteína G estimulando la producción de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), el cual actúa como segundo mensajero, mientras que los DARs de tipo II (D2R, D3R y D4R) se acoplan habitualmente a la subunidad  $G\alpha$  inhibitoria ( $G\alpha_i$ ) de la proteína G, inhibiendo así la generación de cAMP (Sibley et al., 1993). Sin embargo, se ha descrito que los DARs también pueden acoplarse a otras proteínas  $G\alpha$ , activando así diferentes vías de transducción de señales (Sidhu, 1998; Neve et al., 2004). Este acoplamiento diferencial de los diferentes DARs a diferentes vías de transducción de señales permite que la DA promueva diferentes efectos celulares dependiendo de la expresión de DARs en una célula determinada. Debido a esto último y a que existe una expresión diferencial de DARs en las diferentes zonas del SNC, es que la DA puede ejercer roles muy diferentes entre una y otra zona del SNC. Debido al extenso e importante papel que juega la DA y sus receptores en el SNC, la desregulación en la producción o captura de DA o en la expresión de los receptores de DA han sido relacionados con diferentes enfermedades neurológicas y psiquiátricas tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y esquizofrenia (Strange, 1993).

#### **2.4.2 Regulación de linfocitos T y DCs por expresión de DARs.**

Existen diversas vías de activación de los linfocitos T, desencadenadas por el reconocimiento del antígeno, entre las que se cuentan la vía de PKC/ $Ca^{2+}$  y de las MAPKs (*Mitogen-activated protein kinase*), ERKs (*Extracellular Regulated Kinase*), JNKs (*c-Jun Kinase*) y p38, lo que resulta colectivamente en la activación de los factores transcripcionales NF- $\kappa$ B, NF-AT y complejos AP-1. Se ha descrito que el cAMP, por medio de la activación de PKA, puede afectar la activación de linfocitos T por inhibición de la activación de las ERKs (Ramstad et al., 2000) y de las JNKs (Harada et al., 1999), activando la quinasa de Src C-terminal (Vang et al., 2001) y bloqueando la activación de NF- $\kappa$ B (Jimenez et al., 2001; Hershfield, 2005). De este modo, la estimulación de DARs en células T podría regular positiva o negativamente la función de estas células.

Estudios realizados por diferentes grupos han mostrado que las células T expresan cinco DARs, D1R, D2R, D3R, DR4, y D5R (Santambrogio et al., 1993; M Levite et al., 2001; Besser et al., 2005; Watanabe et al., 2006; Marco Cosentino et al., 2007; Nakano et al., 2008). Específicamente, la estimulación del D3R se ha asociado con el acoplamiento a G $\alpha$ i (Watanabe et al., 2006), al aumento en la producción de TNF- $\alpha$  (Besser et al., 2005), la potenciación de la quimiotaxis, la adhesión a fibronectina y a ICAM-1 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Watanabe et al., 2006). Por otro lado, la estimulación del D1R, a través del aumento del cAMP intracelular, inhibe tanto la proliferación como la función citotóxica de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Saha et al., 2001), mientras que la estimulación del D2R induce un aumento en la producción de IL-10, una citoquina que regula negativamente la función de células T (Besser et al., 2005). La estimulación del D4R inhibe la fosforilación de las ERK1/2, lo que se traduce en la inducción de un estado de quiescencia de las células T (Sarkar et al., 2006). La activación del D5R también ha sido relacionada con la inhibición de la función de células T y de hecho, se ha descrito una disminución en la expresión de este receptor en linfocitos T periféricos obtenidos de pacientes con esclerosis múltiple, una patología mediada por linfocitos T autoreactivos contra antígenos del SNC (Giorelli et al., 2005). Los DARs han sido menos estudiados en células T de ratón, en las cuales hasta la fecha solo se ha descrito la expresión y función de los DARs de tipo I (mayoritariamente el D1R) y el D3R. A diferencia de lo descrito en humanos, la estimulación de los receptores D1R y DR3 en células T de ratón favorecen la inmunidad mediada por este tipo de células. La estimulación del D1R inhibe la actividad de las células T regs, las cuales tienen la función de atenuar la actividad de las células T efectoras (Kipnis et al., 2004). Por otro lado, la estimulación del D3R promueve, al igual que en humanos, quimiotaxis y adhesión celular en las células T CD8<sup>+</sup> (Watanabe et al., 2006), mediando en estas mismas células un incremento en la síntesis de IFN- $\gamma$  e inhibiendo la síntesis de IL-4 e IL-10 (Ilani et al., 2004). Recientemente en nuestro laboratorio publicamos un estudio realizado por González et al., 2013 donde se demostró que el D3R expresado en linfocitos T CD4<sup>+</sup> juega un rol fundamental en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson, en la cual este receptor favorece la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> hacia el fenotipo Th1, promoviendo el desarrollo de la enfermedad.



Un estudio realizado por Nakano et al., 2008 ha mostrado que las DCs derivadas de monocitos humanos expresan todos los subtipos de DARs, pero en niveles de expresión desiguales. Los de más alta expresión corresponden a los DARs de tipo I, D1R y D5R. Recientemente en nuestro grupo de investigación hemos demostrado que las DCs derivadas de médula ósea de ratón expresan mayoritariamente los DARs de tipo I, aunque también se expresan D2R y D3R pero en menor nivel (Prado et al., 2012). Además en dicho estudio se demostró que el D5R expresado en DCs favorece la producción de IL-23, así favoreciendo la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> hacia un fenotipo patogénico Th17 y consecuentemente potenciando el desarrollo de autoinmunidad. Como se describió anteriormente, no sólo en las células T se ha descrito la presencia de DARs, sino que también en DCs, células B, monocitos, neutrófilos y en eosinófilos de humano (McKenna et al., 2002; Prado et al., 2012), lo que pone en evidencia la importancia que debe tener la regulación dopaminérgica del sistema inmune.

### 3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Un creciente número de trabajos ha mostrado que algunas células del sistema inmune, especialmente células T, pueden ser reguladas por neurotransmisores, entre los cuales se encuentra la DA. Consistente con esto, se ha demostrado la expresión de diferentes DARs tanto en DCs como en linfocitos T, dos células clave para el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. De manera importante, numerosos estudios han evidenciado un desequilibrio de los niveles plasmáticos de DA y una expresión alterada de diferentes DARs en células T en asociación con enfermedades que tienen un importante componente fisiopatológico mediado por respuesta inmune, tales como la enfermedad de Parkinson, Esclerosis Múltiple y Cáncer. Estas evidencias sugieren un importante papel de la regulación dopaminérgica de las células T en la salud y la enfermedad.

Resultados previos de nuestro grupo de investigación sugieren que el D3R expresado en células T CD8<sup>+</sup> vírgenes facilita la activación y diferenciación de estas células a un fenotipo citotóxico *in vitro*. Sin embargo, el papel del D3R expresado en linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la respuesta antitumoral *in vivo* aún no ha sido explorado. En este trabajo se plantea que el D3R expresado en células T CD8<sup>+</sup> favorece la potencia citotóxica de estas células y así la respuesta antitumoral *in vivo*. Por una parte se estudiará cómo el D3R expresado en células T CD8<sup>+</sup> regula los mecanismos de la respuesta citotóxica y, de este modo, la respuesta antitumoral en un modelo de melanoma murino. Además se analizará brevemente el papel del D3R expresado en las DCs en la activación de la respuesta citotóxica de células T CD8<sup>+</sup>.

Esta investigación pretende dilucidar el rol del D3R expresado en células T CD8<sup>+</sup> en la activación y el desarrollo de la respuesta citotóxica y antitumoral. Los resultados de este trabajo podrían identificar un nuevo blanco molecular a ser considerado para la generación de inmunoterapias, a ser probadas en modelos animales y, posteriormente en el tratamiento de cáncer en humanos.

### 3.1 HIPÓTESIS

La expresión del receptor de dopamina D3 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> contribuye a la adquisición del fenotipo citotóxico Tc1, favoreciendo la capacidad antitumoral de estas células.

### 3.2 OBJETIVO GENERAL

Establecer si la expresión del receptor de dopamina D3 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> es relevante en el proceso de diferenciación de estas células hacia el fenotipo efector Tc1, favoreciendo así su capacidad citotóxica y potencial antitumoral.

### 3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la adquisición de función efectora Tc1 de linfocitos T CD8<sup>+</sup> normales o carentes en el receptor de dopamina D3 *in vitro*.
2. Comparar el crecimiento tumoral en ratones normales o deficientes del receptor de dopamina D3 *in vivo* en un modelo de melanoma murino.
3. Evaluar la contribución de receptor de dopamina D3 expresado en linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la respuesta antitumoral *in vivo* en un modelo de melanoma murino.
4. Comparar la capacidad citotóxica de linfocitos T CD8<sup>+</sup> normales o carentes del receptor de dopamina D3 *in vivo* e *in vitro*.
5. Evaluar la inducción de una respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos por células dendríticas normales o carentes del receptor de dopamina D3 *in vivo*.

## 4. METODOLOGÍA

Todos los experimentos realizados en esta tesis fueron realizados en el laboratorio de Neuroinmunología de la Fundación Ciencia & Vida, en Santiago, Chile.

### 4.1 Animales.

Ratones de la cepa C57BL/6 de entre 8 y 12 semanas de edad fueron usados en todos los experimentos. Los ratones normales (*wild-type*, WT) C57BL/6 fueron obtenidos de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA), mientras que los ratones D3R knock-out (D3KO) fueron gentilmente donados por el Dr. Marc Caron de la Universidad de Duke (Durham, NC, USA). Todos los animales fueron mantenidos y manipulados de acuerdo a las normas institucionales de bioética y bioseguridad, en un ambiente con aire estéril y con disponibilidad de agua y alimento *ad libitum*, en el bioterio de la Fundación Ciencia & Vida.

### 4.2 Purificación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

En primer lugar se obtuvo una suspensión celular a partir de bazo y nodos linfáticos (inguinales y mesentéricos). Para esto, se perfundió el bazo con PBS (8,1  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,47  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,8 % NaCl; 0,02% KCl) utilizando una jeringa para tuberculina con aguja 25G (Becton Dickinson, Curitiba, Brasil). Los nodos linfáticos fueron disgregados en PBS utilizando portaobjetos esmerilados. Luego, la suspensión celular fue centrifugada a 1800 RPM por 5 minutos y resuspendida en solución de lisis ACK (150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 1 mM  $\text{KHCO}_3$ ; 0,1 mM EDTA disódico; pH 7.2), con el fin de eliminar los glóbulos rojos. Las suspensiones celulares provenientes de nodos linfáticos y de bazo depletado de eritrocitos fueron utilizadas como fuentes de células T CD8<sup>+</sup>. La obtención de linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales se realizó mediante selección negativa utilizando un kit de purificación basado en la utilización de esferas magnéticas unidas a

anticuerpos, obteniendo rutinariamente una pureza superior al 85% (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania). La purificación de las diferentes poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> presentes en el bazo se realizó mediante la incubación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales, obtenidos en el paso anterior, con los siguientes anticuerpos conjugados a fluoróforos: anti-CD8 PerCP (clon 53-6.7, BD Pharmigen), anti-CD62L APC-Cy7 (clon MEL-14, BD Pharmigen) y anti-CD44 PE (clon IM7, BD Pharmigen). Las poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes (CD62L<sup>alto</sup> CD44<sup>bajo</sup>), efectores y de memoria efectora (CD62L<sup>bajo</sup> CD44<sup>alto</sup>), y de memoria central (CD62L<sup>alto</sup> CD44<sup>alto</sup>) fueron separadas mediante un *cell sorter* FACS Aria II (Becton Dickinson, San José, CA, USA), obteniéndose de manera rutinaria una pureza superior al 97% para cada población.

#### **4.3 Polarización de linfocitos T CD8<sup>+</sup> hacia el fenotipo Tc1.**

Luego de la obtención de las diferentes poblaciones T CD8<sup>+</sup> mediante *cell sorting*, se indujo la diferenciación de células T CD8<sup>+</sup> vírgenes hacia el fenotipo Tc1. Para esto, las células fueron estimuladas en placas de 96 pocillos de fondo plano a una concentración de  $2 \times 10^5$  células por pocillo con anticuerpo anti-CD3 $\epsilon$  adherido a placa (100 ng/pocillo) (Biolegend, San Diego, CA, USA), en presencia de anticuerpo anti-CD28 (2  $\mu$ g/mL) soluble (Biolegend, San Diego, CA, USA), IL-2 (10 ng/mL, Biolegend) e IL-12 (5 ng/mL, Biolegend) en medio RPMI 1640 completo (Gibco, Nueva York, USA). El medio completo corresponde al medio base RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) 10%, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 1 U/mL /estreptomicina 1 $\mu$ g/mL, gentamicina 50  $\mu$ g/mL, anti-fúngico/anti-biótico 1mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 50  $\mu$ M, L-glutamina 2.05 mM (Todos de Gibco, Nueva York, USA), durante 3 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.4 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario mediante transcripción reversa.**

La extracción de ARN total se realizó mediante el kit EZNA total RNA (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA). A continuación se trató con DNasa usando el kit TURBO DNA-free (Ambion Inc., Austin, TX, USA) para luego evaluar la concentración de ARN total mediante la determinación de absorbancia en un espectrofotómetro Nanodrop a 260 nm (Thermo Scientific, Wilmington, USA). La pureza se comprobó mediante la determinación de la relación de absorbancias a 260/280 nm. Las muestras obtenidas se conservaron a -80°C. A partir de 1 µg de ARN total se sintetizó ADN complementario (ADNc) en un volumen final de 20 µL, conteniendo 1 µL de oligo-dT (10 µM), 1 µL de dNTPs (10 mM cada uno), 4 µL de Buffer 5X, 2 µL DTT, 1 µL de agua ultra pura y 1 µL de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). Las reacciones fueron incubadas durante 60 minutos a 42°C y a 70°C durante 5 minutos. Los ADNc generados se almacenaron a -20°C.

#### **4.5 RT-PCR en tiempo real.**

Las reacciones de RT-PCR en tiempo real se realizaron con 1 µL de ADNc, 10 µL Brilliant SYBR Green QRT-PCR Master Mix II 2X (Stratagene, Santa Clara, California, USA), 1 µL de cada partidador (sentido y antisentido, a una concentración 10 µM cada uno) y 7 µL de agua ultra pura, para un volumen final de 20 µL. La reacción de PCR fue llevada a cabo con el siguiente perfil térmico: 40 ciclos con 95°C disociación (30 s), 60°C hibridación (45 s) y 72°C extensión (30 s). Las secuencias de los partidores utilizados se muestran a continuación: β2-microglobulina (β2m) sentido: 5'-CAC CGG AGA ATG GGA AGC CGA A-3'; β2m antisentido: 5'-TCC ACA CAG ATG GAG CGT CCA G-3, Tbet sentido: 5'-CCT GTT GTG GTC CAA GTT CAA C-3', Tbet antisentido 5'- CAC AAA CAT CCT GTA ATG GCT TGT-3'; Eomes sentido: 5'- TAT AAC GGT GAG AGA ACC GTG CCA-3', Eomes antisentido 5'- ACC ATA TGG GAG CAA GGT ACT GGA-3'; IFN-γ sentido: 5'- GAG CCA GAT TAT CTC TTT CTA CC-3', IFN-γ antisentido 5'- GTT GTT GAC CTC AAA CTT GG-3'; Perforina 1 sentido: 5'- GAG AAG ACC TAT CAG GAC CA-3', Perforina 1 antisentido 5'- AGC CTG TGG TAA GCA TG-3'; Granzima

B sentido: 5'- ATC AAG GAT CAG CAG CCT GA-3', Granzima B antisentido 5'- TGA TGT CAT TGG AGA ATG TCT-3'. Para la normalización de todos los genes, se usó como gen control la expresión de  $\beta$ 2-microglobulina. Los valores relativos de expresión de los diferentes genes de interés para cada muestra de ARNm fueron calculados con la siguiente fórmula:  $2^{-(\text{Ct de gen de interés} - \text{Ct de } \beta 2\text{m})} \times 10^3$ .

#### **4.6 Análisis de la producción de citoquinas y moléculas citotóxicas mediante citometría de flujo.**

Para evaluar la expresión de citoquinas y moléculas asociadas a citotoxicidad tanto en linfocitos T CD8<sup>+</sup> recién aislados o diferenciados hacia el fenotipo Tc1, las células fueron re-estimuladas con ionomicina 1  $\mu$ g/ml (Sigma, San Luis, Missouri, USA) y PMA 50 ng/ml (Sigma, San Luis, Missouri, USA) en presencia de Brefeldina A 5  $\mu$ g/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 4 horas. Posteriormente, las células fueron incubadas por 20 minutos con los siguientes anticuerpos conjugados a fluoróforos: anti-CD8 PerCP y anti-Lamp-1 PE (CD107a, clon 1D4B, BD Pharmigen). A continuación las células fueron fijadas con paraformaldehído 1% en PBS toda la noche a 4°C o 15 minutos a temperatura ambiente y luego tratadas con tampón de permeabilización (Saponina 0,5%, BSA 3% en PBS 1X). Las células permeabilizadas fueron incubadas con anti-IFN- $\gamma$  APC (clon XMG1.2, BD Pharmigen) y anti-Granzima B FITC (clon 16G6, eBiosciences), por 20 minutos a 4°C. La adquisición de datos se realizó mediante un citómetro de flujo FACSCanto II y los datos fueron analizados sobre la población CD8<sup>+</sup> con el programa FACSDiva (ambos de BD Biosciences).

#### **4.7 Modelo de crecimiento tumoral de melanoma B16**

Para evaluar el crecimiento tumoral entre ratones WT y D3KO se utilizó un modelo de meloma murino inducido por la inyección de células B16-OVA (donadas gentilmente por el Dr. Sergio Quezada del University College of London, UK), las cuales serán llamadas de aquí en

adelante simplemente B16. Esta línea celular fue obtenida de melanoma de ratones C57BL/6. Estas células fueron cultivadas durante 3 días en botellas de cultivo celular de 75cm<sup>2</sup> conteniendo medio RPMI completo (ver punto 4.3). Una vez alcanzado un 90% de confluencia, las células fueron desprendidas con Tripsina - EDTA 0,05% (Gibco, Nueva York, USA) y dejadas a una concentración de  $3 \times 10^5$  en 200  $\mu$ l de PBS. La inyección intradérmica (i.d.) de la suspensión celular (200  $\mu$ l/ratón) se realizó mediante una jeringa ultra fina de 1 ml (BD ultra fine) y la medición del aumento del tamaño tumoral fue realizada con caliper.

Para evaluar el papel del D3R expresado en células T CD8<sup>+</sup> en la respuesta antitumoral, se realizó la purificación de células T CD8<sup>+</sup> D3KO como se mencionó previamente (ver punto 4.2), para luego transferir  $2 \times 10^6$  linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales por ratón en 300  $\mu$ l de PBS por la vena de la cola. 24 horas más tarde, los animales recibieron la inyección de células tumorales tal como se describió en el párrafo anterior.

#### **4.8 Co-cultivo de extracto celular B16 en presencia de linfocitos totales provenientes de ratones desafiados con tumor B16.**

El extracto de meloma B16 fue preparado a partir de un cultivo celular de acuerdo al protocolo descrito en el punto 4.7. Las células fueron lavadas dos veces en PBS, para luego ser resuspendidas a una concentración de  $1 \times 10^7$  en 1 ml de medio RPMI sin suplementar. Las células fueron tratadas con 4 ciclos de frío / calor. Posteriormente el sobrenadante fue centrifugado por 30 minutos a 13000g, para obtener el sobrenadante. Este extracto se utilizó para estimular esplenocitos provenientes de ratones desafiados con tumor B16. Así, los esplenocitos se dejaron a una concentración de  $1 \times 10^8$  en 5 ml de medio RPMI completo, suplementado con IL-2 (10 ng/mL, Biolegend) y 100  $\mu$ l del extracto de células B16, para luego sembrar en placa de 6 pocillos. Este cultivo se mantuvo durante 3 días a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>, para luego reestimar como se indicó previamente (ver punto 4.6) y teñir las células con 1 $\mu$ l de zombie aqua (Biolegend) por 10 minutos. A continuación las células fueron incubadas por 20 minutos con anti-CD8 PerCP (Biolegend). Posteriormente las células fueron fijadas con paraformaldehído 1%



en PBS toda la noche a 4°C y luego tratadas con tampón de permeabilización (PBS 1X, Saponina 0,5%, BSA 3%). Las células permeabilizadas fueron incubadas con anti-IFN- $\gamma$  APC (clon XMG1.2, BD Pharmigen), por 20 minutos a 4°C. La adquisición de datos se realizó mediante un citómetro de flujo FACSCanto II y los datos fueron analizados sobre la población CD8<sup>+</sup> con el programa FACSDiva (ambos de BD Biosciences).

#### 4.9 Ensayo de citotoxicidad *in vitro*.

Dos poblaciones de células B16 OVA fueron teñidas con CFSE (Invitrogen), ya sea a concentración 0,5 $\mu$ M (CFSE<sup>bajo</sup>), o bien 5 $\mu$ M (CFSE<sup>alto</sup>). La población teñida con CFSE<sup>bajo</sup> fue incubada con esplenocitos provenientes de ratones desafiados con células B16 en relaciones 1:2 (25.000 esplenocitos cultivados con 50.000 células B16) y 2:1 (100.000 esplenocitos cultivados con 50.000 células B16) durante 4 horas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, el cultivo anterior fue mezclado en proporción 1:1 con las células teñidas con CFSE<sup>alto</sup> y fijado con paraformaldehido 1% en PBS toda la noche a 4°C.

La citotoxicidad fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Citotoxicidad\ específica = \left( 1 - \left( \frac{\left( \frac{alto}{bajo} \right)_{control}}{\left( \frac{alto}{bajo} \right)_{experimental}} \right) \right) * 100$$

Donde “alto” corresponde al porcentaje de células CFSE<sup>alto</sup> (que no fueron cultivadas con esplenocitos) respecto al total de células CFSE<sup>+</sup>, “bajo” corresponde al porcentaje de células CFSE<sup>bajo</sup> (que fueron cultivadas con esplenocitos) respecto al total de células CFSE<sup>+</sup>. El control corresponde a los ratones que no recibieron el desafío tumoral con células B16 y los ratones experimentales corresponden a aquellos que si recibieron el desafío tumoral con células B16.

#### 4.10 Generación de DCs derivadas de médula ósea

Las DCs fueron diferenciadas a partir de células precursoras de la médula ósea de ratones C57BL/6 WT y C57BL/6 D3KO. Para esto, los extremos de los fémures y de las tibias de los ratones antes mencionados, fueron perforados y la médula ósea fue perfundida con medio RPMI inyectado con una jeringa de tuberculina. Los precursores mieloides obtenidos fueron tratados con ACK (150 mM NH<sub>4</sub>Cl; 1 mM KHCO<sub>3</sub>; 0,1 mM EDTA disódico; pH 7.2) para eliminar los glóbulos rojos contaminantes. Posteriormente, las células precursoras fueron lavadas dos veces con tampón fosfato salino (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,405 μM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,073 μM, NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM) (PBS), y resuspendidas a 1 x 10<sup>6</sup> células/mL. Las células fueron diferenciadas a DCs con medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (FBS) 5% (Gibco), L-Glutamina 2 mM (Gibco), piruvato de sodio 1 mM (Gibco), aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Gibco), penicilina-estreptomina 1 U/mL; 1 μg/mL (Gibco), gentamicina 0,1 mg/mL (Gibco) y GM-CSF 10 ng/mL (Preprotech) e incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 6 días como se ha descrito previamente (Prado et al., 2012).

#### 4.11 Inmunización con DCs cargadas con OVA y evaluación de la respuesta de células T CD8+ *in vivo*.

Células dendríticas provenientes de ratones WT o D3KO fueron pulsadas con OVA 50 μg/ml durante 24 horas y además tratadas con LPS 400 ng/ml durante 4 horas, a 37°C. A continuación estas fueron inyectadas (1 x 10<sup>6</sup> células/ratón) vía intraperitoneal (i.p.) en ratones WT. 7 días más tarde, los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron las células del bazo, las cuales fueron pulsadas con péptido OVA<sub>257-264</sub> (correspondiente a la secuencia aminoacídica SIINFEKL) a una concentración de 10 μM. Luegp de 4 días, los esplenocitos fueron re-estimulados con PMA y ionomicina en presencia de brefeldina A, de la misma manera mencionada previamente (ver punto 4.6). Las células fueron posteriormente teñidas con anticuerpos contra CD8 conjugado a fluoróforo, fijados con paraformaldehído 1%, permeabilizados, e incubados con anticuerpo contra IFN-γ conjugado a fluoróforo. Posteriormente se evaluó la producción de IFN-γ directamente por

citometría de flujo para evaluar el porcentaje de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> presentes en la muestra.

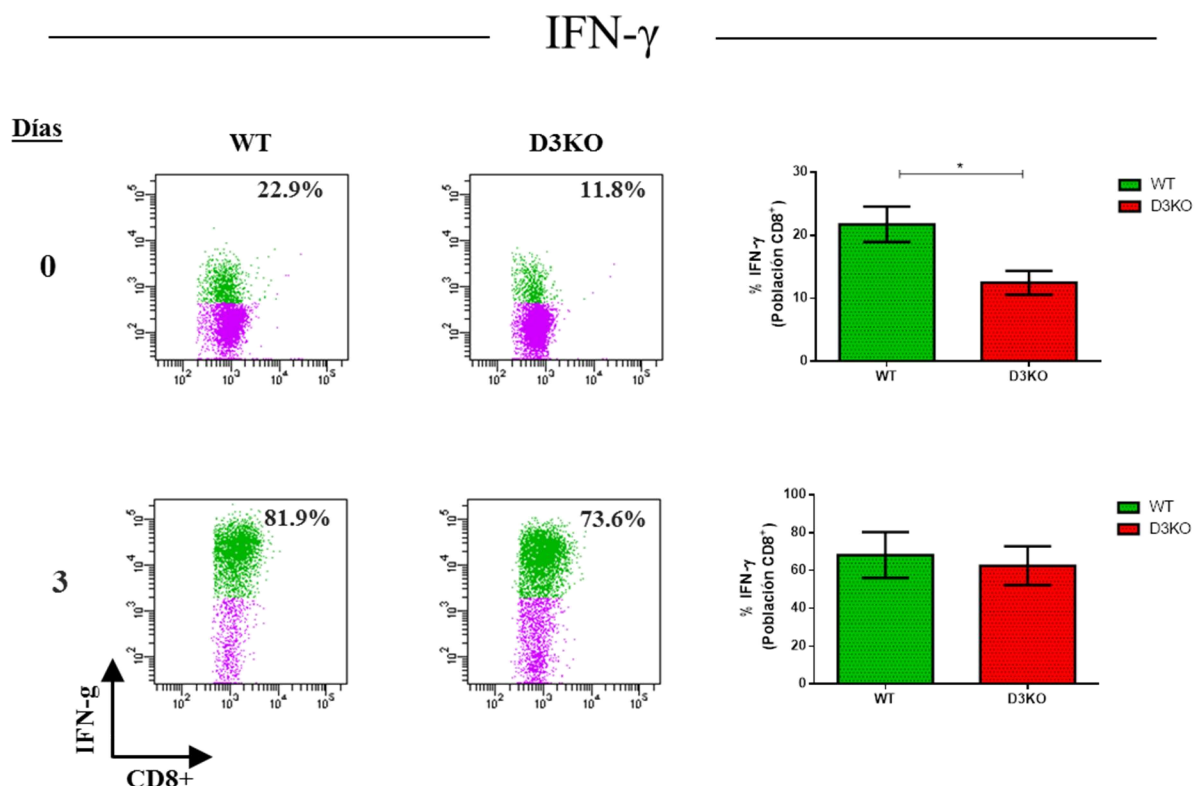
#### **4.12 Análisis estadístico.**

Los datos fueron analizados utilizando el software Prisma 6.0. Para el análisis de la significancia estadística de las diferencias observadas de todos los resultados con excepción de aquellos de crecimiento tumoral, se utilizó el test t de Student para comparar entre dos condiciones. Los datos de todas las réplicas fueron representados como la media  $\pm$  la desviación estándar. El test de Mantel-Cox (LogRank) fue utilizado para comparar las curvas de crecimiento tumoral, las cuales fueron representadas en gráficos de sobrevida. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 La ausencia del D3R en linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales estimulados a diferenciar hacia el fenotipo Tc1 no afecta la producción de IFN- $\gamma$ *in vitro*.

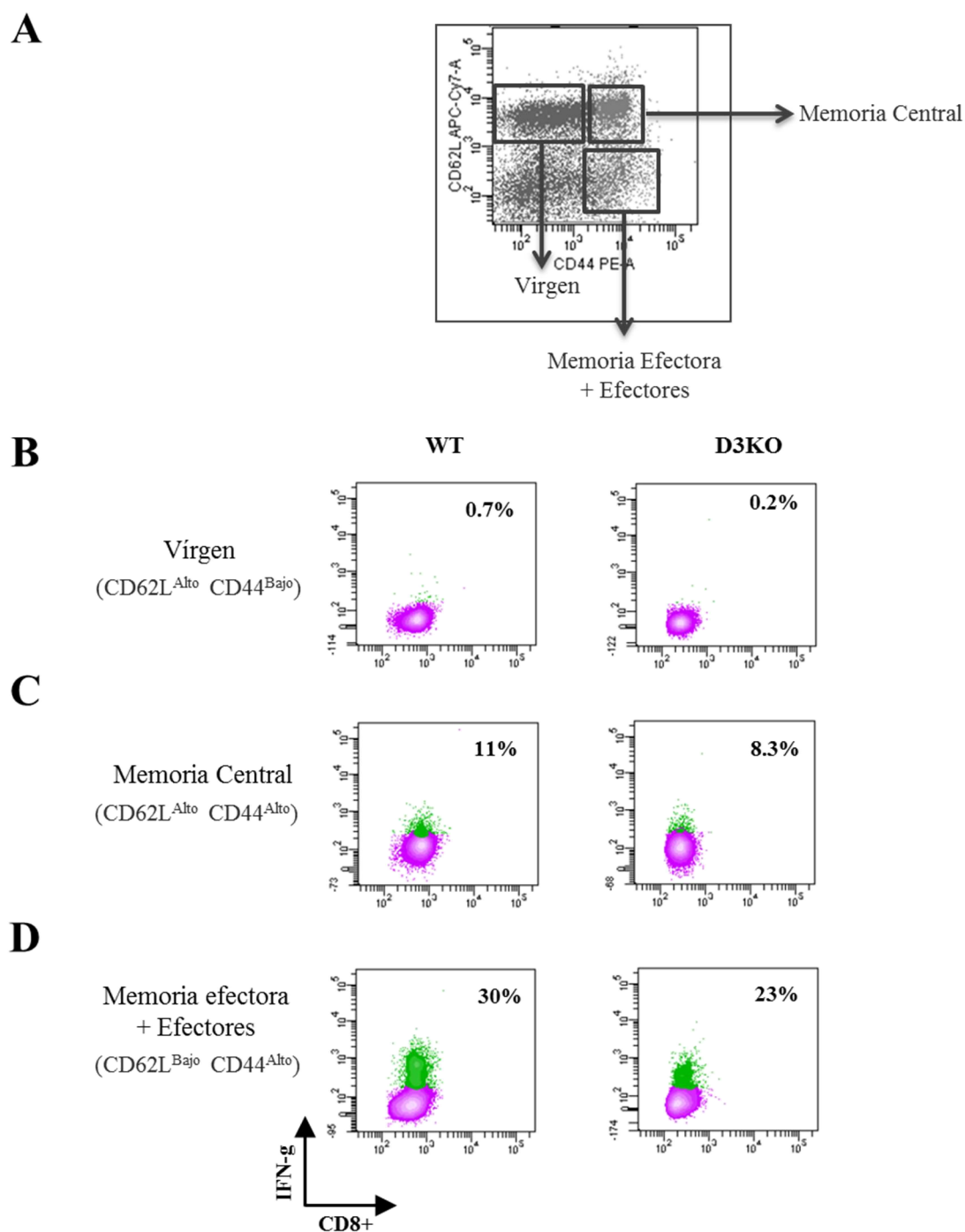
Para evaluar la relevancia del D3R en el proceso de diferenciación hacia el fenotipo citotóxico Tc1, se analizó la producción de IFN- $\gamma$ , una citoquina característica de este fenotipo. Para esto, se purificaron células T CD8<sup>+</sup> totales del bazo de ratones normales (wild-type, WT) o deficientes en el D3R (D3KO), para ser inmediatamente estimuladas o incubadas en condiciones que conducen a la adquisición del fenotipo Tc1. En la Figura 2 se muestra que al inicio del cultivo, las células T CD8<sup>+</sup> totales obtenidas de ratones D3KO presentan una frecuencia de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> significativamente menor comparada con las células T CD8<sup>+</sup> totales WT. En contraste, esta diferencia ya no se observa después de tres días en condiciones de diferenciación hacia el fenotipo Tc1 (Figura 2). Los resultados indican que la ausencia del D3R en los animales D3KO afecta la producción de IFN- $\gamma$  por linfocitos T y, por lo tanto, puede modular la capacidad citotóxica basal. Sin embargo, la ausencia del D3R en la población de células T CD8<sup>+</sup> totales no afecta el potencial efector *in vitro* después de inducir la diferenciación hacia el fenotipo Tc1. Estos resultados sugieren que la expresión del D3R en linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales no contribuye de manera intrínseca en el proceso de diferenciación hacia el fenotipo Tc1.



**Figura 2** La expresión de D3R favorece la función efectora basal del fenotipo Tc1 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales aislados de bazo. Linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales obtenidos de ratones WT y D3KO fueron inmediatamente estimulados con PMA y ionomicina en presencia de brefeldina A o cultivados en condiciones de diferenciación hacia el fenotipo Tc1 por 3 días y luego re-estimulados con PMA, ionomicina y brefeldina A. Se evaluó la producción de IFN- $\gamma$  en la población CD8<sup>+</sup> mediante citometría de flujo. A la izquierda, gráfico de puntos representativo de la producción de IFN- $\gamma$  por linfocitos T CD8<sup>+</sup> WT y D3KO. Los números al interior de cada gráfico indican el porcentaje de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> dentro de la población CD8<sup>+</sup>. Los gráficos de barras de la derecha muestran los datos de al menos tres experimentos independientes, donde los valores representan el promedio  $\pm$  desviación estándar. \*,  $p < 0.05$  según el test  $t$  de Student no pareado de dos colas.

## **5.2 La expresión del D3R no afecta la producción de IFN- $\gamma$ por parte de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria y efectores.**

Considerando que los datos obtenidos anteriormente (punto 5.1) muestran una diferencia en la expresión de IFN- $\gamma$  entre linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales obtenidos de ratones WT y D3KO estimulados inmediatamente después de aislar desde el bazo y que las células utilizadas en estos experimentos corresponden a una mezcla de las diferentes poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, se decidió purificar la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes, efectores y de memoria de acuerdo a la expresión diferencial de las moléculas de superficie CD62L y CD44, mediante *cell sorting* (Figura 3A). De este modo, las diferentes poblaciones fueron purificadas a partir de ratones WT y D3KO y re-estimuladas para luego evaluar la producción de IFN- $\gamma$  mediante citometría de flujo. Al analizar las tres poblaciones obtenidas de ratones WT fue posible determinar que, mientras las células T CD8<sup>+</sup> vírgenes no producen IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación (Figura 3B), tanto las células T CD8<sup>+</sup> efectoras como las de memoria central y memoria efectora producen IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación (Figura 3C y D), y por lo tanto contribuyen a la producción de esta citoquina en la mezcla de linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales. Sorprendentemente, la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las poblaciones T CD8<sup>+</sup> efectoras y de memoria obtenidas de ratones deficientes en el D3R fue similar a la observada en células obtenidas de ratones WT (Figura 3C y D). De este modo, estos resultados sugieren que la diferencia en la producción de IFN- $\gamma$  observada entre linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales WT y D3KO no puede ser explicada por la producción de esta citoquina en las poblaciones aisladas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores o de memoria.



**Figura 3. La expresión del D3R no afecta la producción de IFN- $\gamma$  por parte de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria y efectores.** Linfocitos T CD8<sup>+</sup> purificados de bazo de ratones WT y D3KO fueron separados mediante *cell sorting* en base a la expresión de las moléculas de superficie

CD62L y CD44, tal como se representa en el gráfico de puntos (A). Las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> fueron inmediatamente estimulados con PMA y ionomicina en presencia de brefeldina A y luego se evaluó la producción de IFN- $\gamma$  en la población vírgen (B), memoria central (C) y memoria efectora y efectora (D) mediante citometría de flujo. Los números al interior de los gráficos indican el porcentaje de células productoras de IFN- $\gamma$  dentro de la población CD8<sup>+</sup> y son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

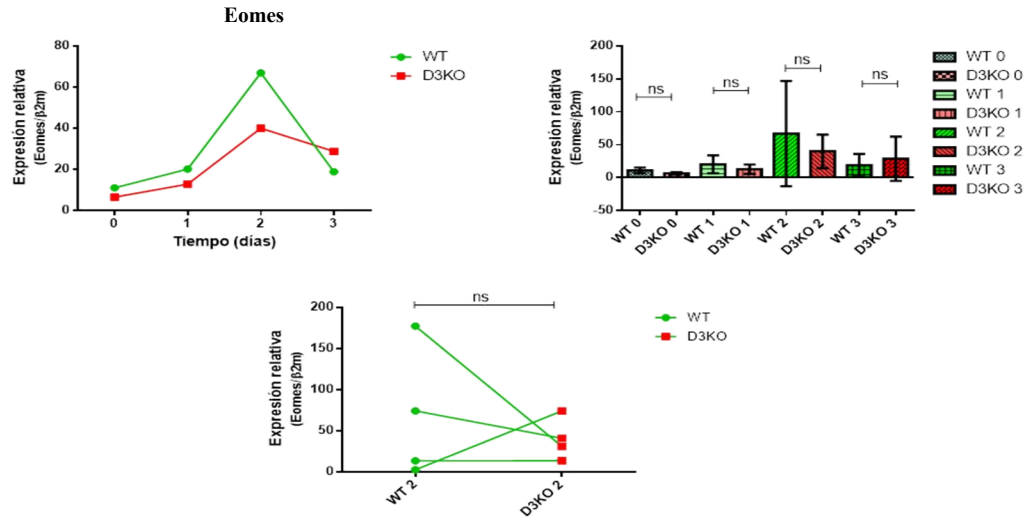
### **5.3 La expresión del D3R en linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes favorece la polarización hacia fenotipo Tc1 *in vitro*.**

Dado que no se observaron diferencias significativas entre linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales WT y D3KO después del período de diferenciación hacia el fenotipo Tc1, se decidió evaluar la contribución del D3R en la diferenciación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes purificados mediante *cell sorting* hacia el fenotipo Tc1. Las células vírgenes se incubaron bajo condiciones de polarización al fenotipo Tc1 y para caracterizar de manera detallada el proceso de diferenciación, se evaluó tanto la expresión de factores de transcripción inductores de este fenotipo, como Tbet y Eomes, así como también la expresión de moléculas efectoras características, como IFN- $\gamma$  y las proteínas citotóxicas granzima B y perforina 1. De este modo, se pudo observar que la expresión tanto de Tbet como de Eomes aumenta en linfocitos T CD8<sup>+</sup> normales durante el cultivo, lo que también ocurre en linfocitos T CD8<sup>+</sup> D3KO pero con una magnitud consistentemente menor durante los dos primeros días de cultivo, mientras que los niveles tienden a igualarse al tercer día de cultivo (Figura 4A y B). A pesar de que hay una tendencia a una menor expresión de Tbet y Eomes en células T CD8<sup>+</sup> vírgenes D3KO, no se detectan diferencias en la expresión del ARN mensajero de IFN- $\gamma$  al comparar con linfocitos T CD8<sup>+</sup> WT (Figura 4C). Por otra parte, la expresión de perforina 1 y de granzima B exhiben una cinética diferente, presentándose un máximo de granzima B al segundo día de cultivo, mientras que el máximo de perforina ocurre al tercer día de cultivo en linfocitos T CD8<sup>+</sup> normales. En ausencia del D3R, si bien la expresión del transcrito de ambos genes va en aumento durante el cultivo, en ambos casos la expresión se ve consistentemente reducida al comparar con células T CD8<sup>+</sup> normales (Figura 4D y E). Así, estos

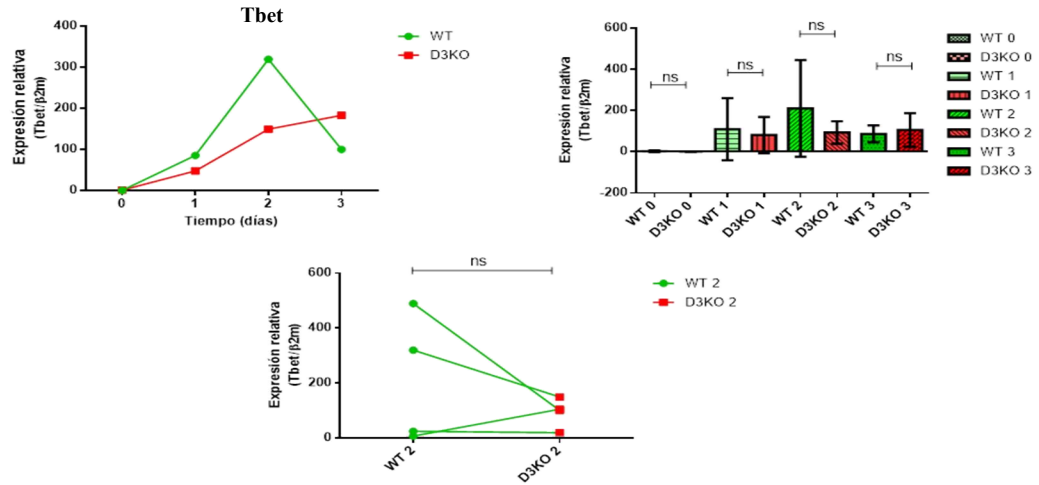


datos sugieren que la expresión del D3R en linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes permite la expresión de niveles óptimos de los transcritos tanto de factores de transcripción como de moléculas efectoras características del fenotipo Tc1. Sin embargo, con el número de repeticiones realizadas para cada experimento no se logran observar diferencias significativas.

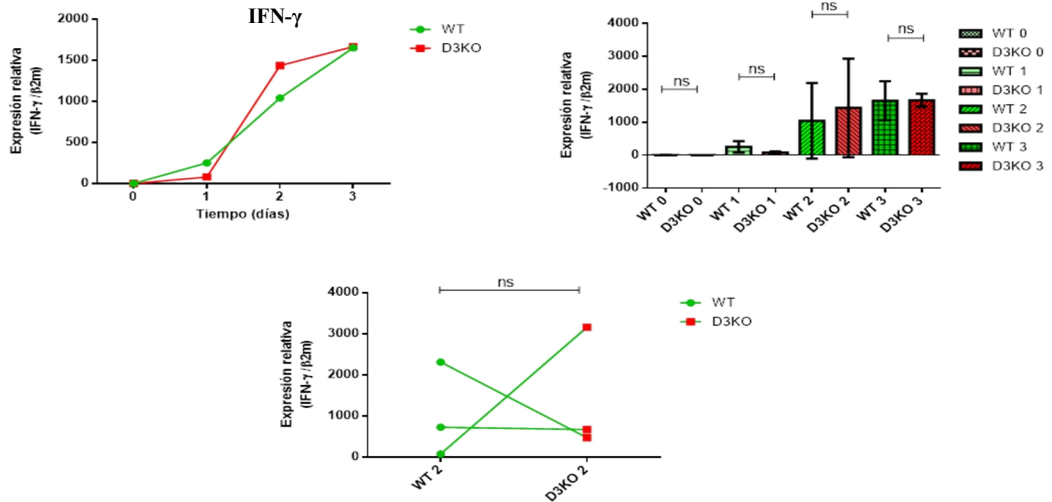
**A**

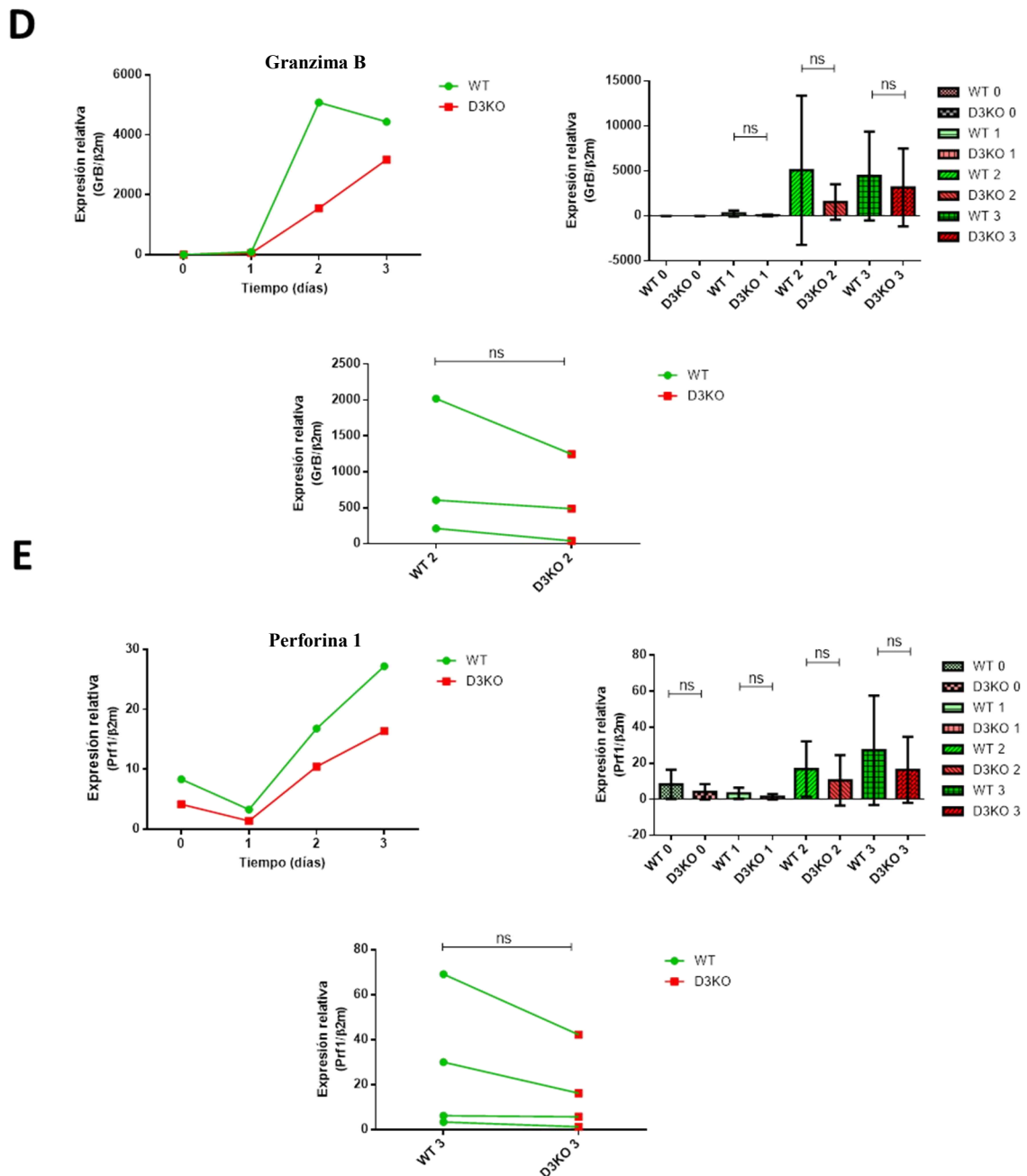


**B**



**C**



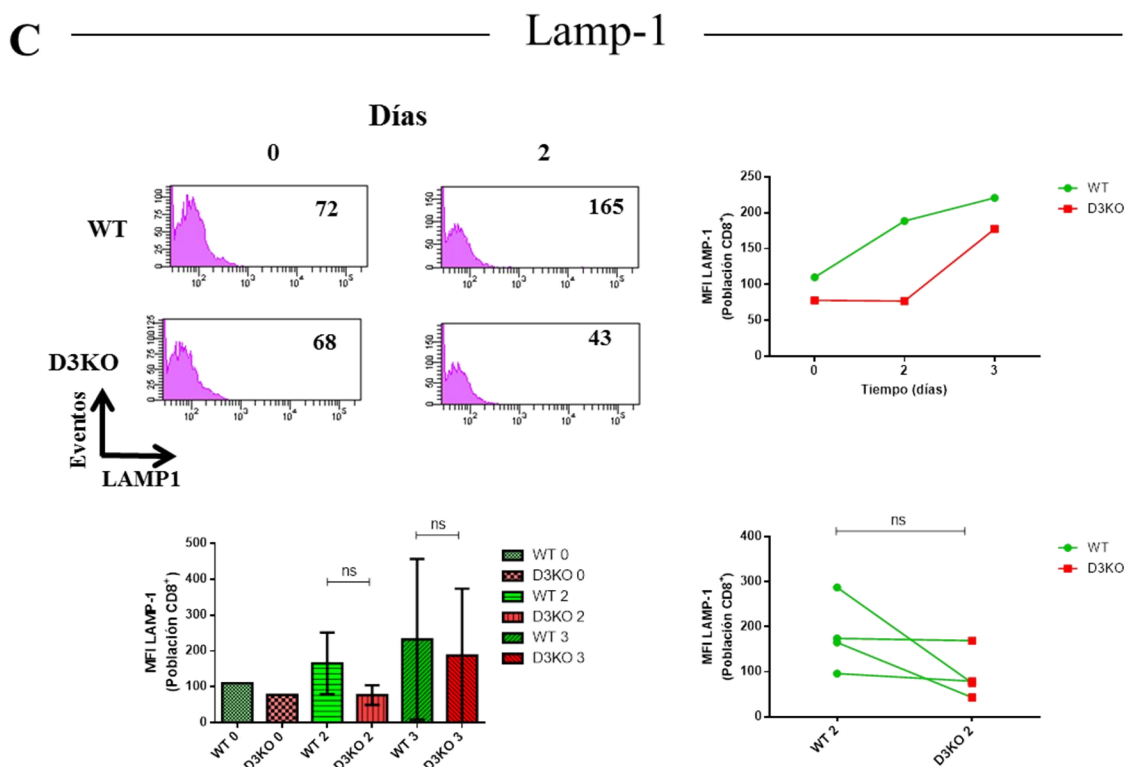


**Figura 4. Linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes deficientes en el D3R tienden a tener una menor capacidad de diferenciar hacia el fenotipo Tc1 *in vitro*.** Linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes (CD62L<sup>alto</sup> CD44<sup>bajo</sup>) de ratones WT y D3KO fueron purificados mediante *cell-sorting* y cultivados en condiciones que favorecen la diferenciación hacia el fenotipo Tc1 por tres días. Posteriormente se extrajo ARN total a diferentes tiempos para luego evaluar la expresión de ARNm de los factores

de transcripción Tbet (A) y Eomes (B), de la citoquina IFN- $\gamma$  (C) y de las moléculas citotóxicas granzima B (D) y perforina 1 (E) mediante PCR en tiempo real. Los gráficos de la derecha, izquierda e inferior (A – E) representan la expresión de cada gen relativo a la expresión del gen de referencia  $\beta$ -2 microglobulina en cada uno de los tiempos analizados (derecha e izquierda) y en el día de cultivo donde se produjo la mayor diferencia (inferior). En todos, se muestran los resultados de 4 experimentos independientes. Los gráficos inferiores de puntos unidos por líneas (A – E), representan las diferencias producidas por experimento y el día de cultivo donde produjo la mayor diferencia entre genotipos. Los gráficos de barras de la derecha y los gráficos de puntos inferiores (A-E) muestran los valores promedio  $\pm$  desviación estándar. Mientras las diferencias observadas en los gráficos de barras fueron analizadas por test t de Student no pareado, las diferencias de los gráficos de símbolos unidos por líneas de los fueron analizadas por test t de Student pareado. ns, no significativo.

Para evaluar si las diferencias en expresión a nivel de ARNm descritas en el punto anterior redundan en diferencias en la expresión de citoquinas y moléculas citotóxicas a nivel de proteína, se analizó la acumulación intracelular tanto de IFN- $\gamma$  como de granzima B y la expresión de LAMP-1 en la superficie celular mediante citometría de flujo. A pesar de no haber observado diferencias en los niveles de ARNm de IFN- $\gamma$ , los linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes D3KO presentan una frecuencia significativamente menor de células productoras de IFN- $\gamma$  al forzar la diferenciación a fenotipo Tc1, en comparación a linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes WT (Figura 5A). Si bien en el caso de granzima B y LAMP-1 no se observaron diferencias significativas debido a la alta variación entre experimentos, es posible observar una tendencia de menor expresión de LAMP-1 y de granzima B con el paso de los días de cultivo, donde en los días 2 y 3 de cultivo se ven las mayores diferencias, respectivamente (Figura 5B y C). A pesar de no haber significancia estadística para granzima B y LAMP-1, se ve una tendencia de menor producción de estas moléculas citotóxicas, al igual que para IFN- $\gamma$ , en linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes D3KO sugiriendo que la expresión del D3R en linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes favorecería la adquisición del fenotipo Tc1 *in vitro*. Sin embargo, los datos de expresión a nivel de ARNm para IFN- $\gamma$  y granzima B, anteriormente vistos (Figura 4C y D) no son totalmente concordantes con los datos obtenidos para expresión a nivel de proteína de ambas moléculas (Figura 5A y B).





**Figura 5. La expresión del D3R en linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes favorece la adquisición del fenotipo Tc1 *in vitro*.** Linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes (CD62L<sup>alto</sup> CD44<sup>bajo</sup>) de ratones WT y D3KO fueron purificados mediante *cell-sorting* y cultivados en condiciones que promueven la diferenciación hacia fenotipo Tc1 por tres días. Los linfocitos se re-estimularon con PMA/ionomicina en presencia de brefeldina A en los tiempos indicados y se evaluó la expresión de citoquina intracelular y moléculas efectoras por citometría de flujo. **(A)** Los gráficos de puntos (panel superior izquierdo) muestran la producción de IFN- $\gamma$  en la población CD8<sup>+</sup> WT o D3KO. Los números adentro de los gráficos de puntos indican el porcentaje de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> dentro de la población CD8<sup>+</sup>. En **(B)** y en **(C)** se muestran histogramas representativos de la expresión de granzima B y LAMP-1 en la población CD8<sup>+</sup>, respectivamente (panel superior izquierdo). Los números adentro de los histogramas indican la intensidad media de fluorescencia (MFI) de cada parámetro en la población CD8<sup>+</sup>. Los gráficos de la derecha **(A-C, panel superior)** representan la media de seis experimentos independientes para IFN- $\gamma$  y cinco experimentos independientes para granzima B y LAMP-1. Los valores graficados en los paneles superiores de la derecha corresponden al porcentaje de células positivas en la población CD8<sup>+</sup> **(A)**, o la MFI asociada al

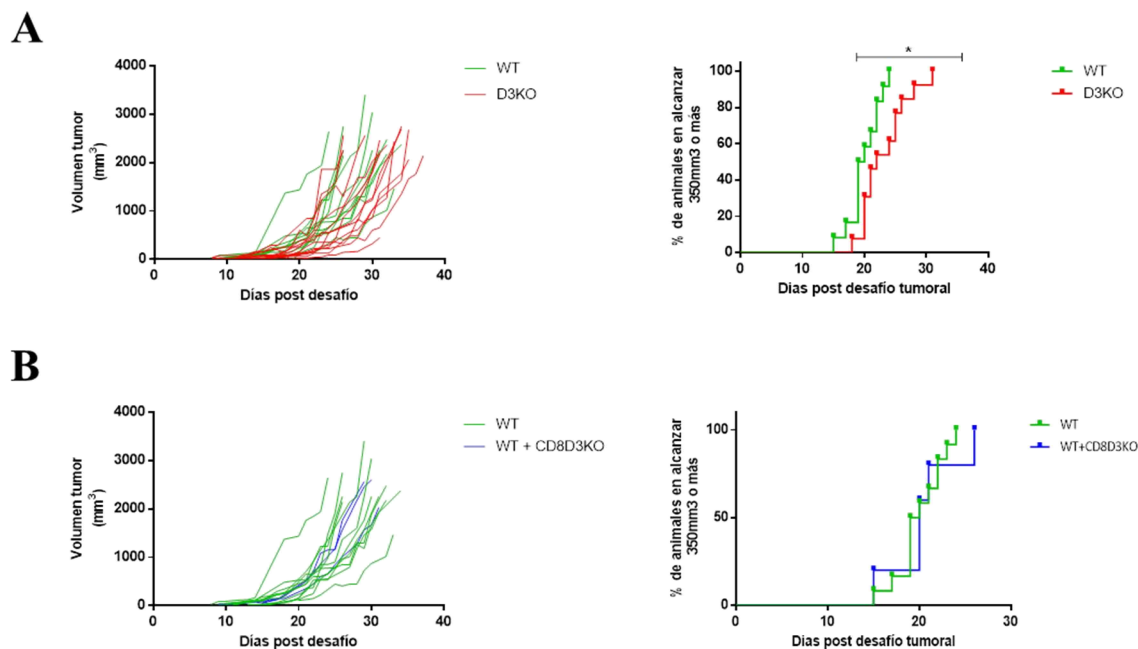
parámetro medido en la población CD8<sup>+</sup> (**B y C**). Los gráficos de barra (panel inferior izquierdo) representan la media  $\pm$  el error estándar de seis experimentos independientes para IFN- $\gamma$  y de cinco experimentos independientes para granzima B y LAMP-1. Los valores graficados (paneles inferiores izquierdos), corresponden al porcentaje de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en la población CD8<sup>+</sup> (**A**), o la MFI asociada a granzima B y LAMP-1 respectivamente (**B y C**). Los gráficos del panel derecho inferior representan los experimentos individuales del día de polarización donde se produjo la mayor diferencia (día 3, y 2 respectivamente) en la producción de IFN- $\gamma$ , granzima B, y LAMP-1. Los valores graficados en los paneles inferiores de la derecha corresponden al porcentaje de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en la población CD8<sup>+</sup> (**A**), o la MFI asociada al parámetro medido en la población CD8<sup>+</sup> (**B y C**). Los gráficos de barras (panel de la izquierda inferior) y los gráficos de puntos (panel de la derecha inferior) (**A–C**) muestran los valores promedio  $\pm$  desviación estándar. Mientras las diferencias observadas en los gráficos de barras fueron analizadas por test t de Student no pareado, las diferencias de los gráficos de símbolos unidos por líneas de los fueron analizadas por test t de Student pareado. ns, no significativo. \*\*p<0,05

#### **5.4 Ratones deficientes en el D3R presentan un retraso en el crecimiento tumoral en el modelo de melanoma murino B16.**

Resultados anteriores de nuestro grupo de investigación y de esta tesis, demuestran que el D3R expresado en células T CD8<sup>+</sup> vírgenes favorece la activación y diferenciación de estas células hacia un fenotipo efector citotóxico. Sin embargo, el papel del D3R expresado en linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la respuesta antitumoral aún no ha sido explorado. Con este objetivo, se evaluó el crecimiento del melanoma murino B16 inyectado de manera intradérmica entre ratones normales y carentes del D3R. En ambos grupos las mediciones comenzaron aproximadamente el día 8 después del desafío tumoral y al comparar el crecimiento que presentan los tumores entre ambas cepas de ratones, es posible observar una tendencia en la que los ratones D3KO presentan un retraso en el crecimiento tumoral, tendencia más notoria si se observan las mediciones realizadas hasta aproximadamente el día 22, donde el crecimiento tumoral es notoriamente menor en ratones D3KO que en ratones WT (Figura 6A, panel izquierdo). Si se considera el

tiempo que toma a cada grupo en alcanzar un crecimiento tumoral de 350 mm<sup>3</sup>, es posible observar que los ratones D3KO demoran significativamente más tiempo en alcanzar este volumen en comparación con los ratones WT, ya que al día 25 el 100% de los animales WT alcanzan el volumen tumoral definido en comparación los animales D3KO que alcanzan los 350 mm<sup>3</sup> al día 31 (Figura 6A, panel derecho). Tomando en cuenta que la deficiencia del D3R es global en los ratones utilizados en este estudio, a continuación se evaluó si la expresión del D3R específicamente en linfocitos T CD8<sup>+</sup> modula la capacidad antitumoral. Para esto, se transfirieron por vía intravenosa linfocitos T CD8<sup>+</sup> D3KO a ratones WT, para luego de un día desafiar con melanoma B16 de la manera antes descrita. Tanto al evaluar la curva de crecimiento tumoral como el porcentaje de animales que alcanzan los 350 mm<sup>3</sup>, es posible observar que el desarrollo de los tumores es similar entre ratones WT no transferidos y transferidos con linfocitos T CD8<sup>+</sup> D3KO (Figura 6B). Estos resultados indican que la ausencia del D3R en una o más poblaciones celulares en el ratón D3KO resulta en un retraso del crecimiento tumoral en el modelo de melanoma B16. Adicionalmente, es posible concluir que el D3R expresado en la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> no contribuye en la respuesta antitumoral estudiada. Así, estos resultados sugieren que la expresión del D3R en otra población celular, ya sea del compartimiento inmune o no, modulan la respuesta antitumoral en el modelo de melanoma B16.



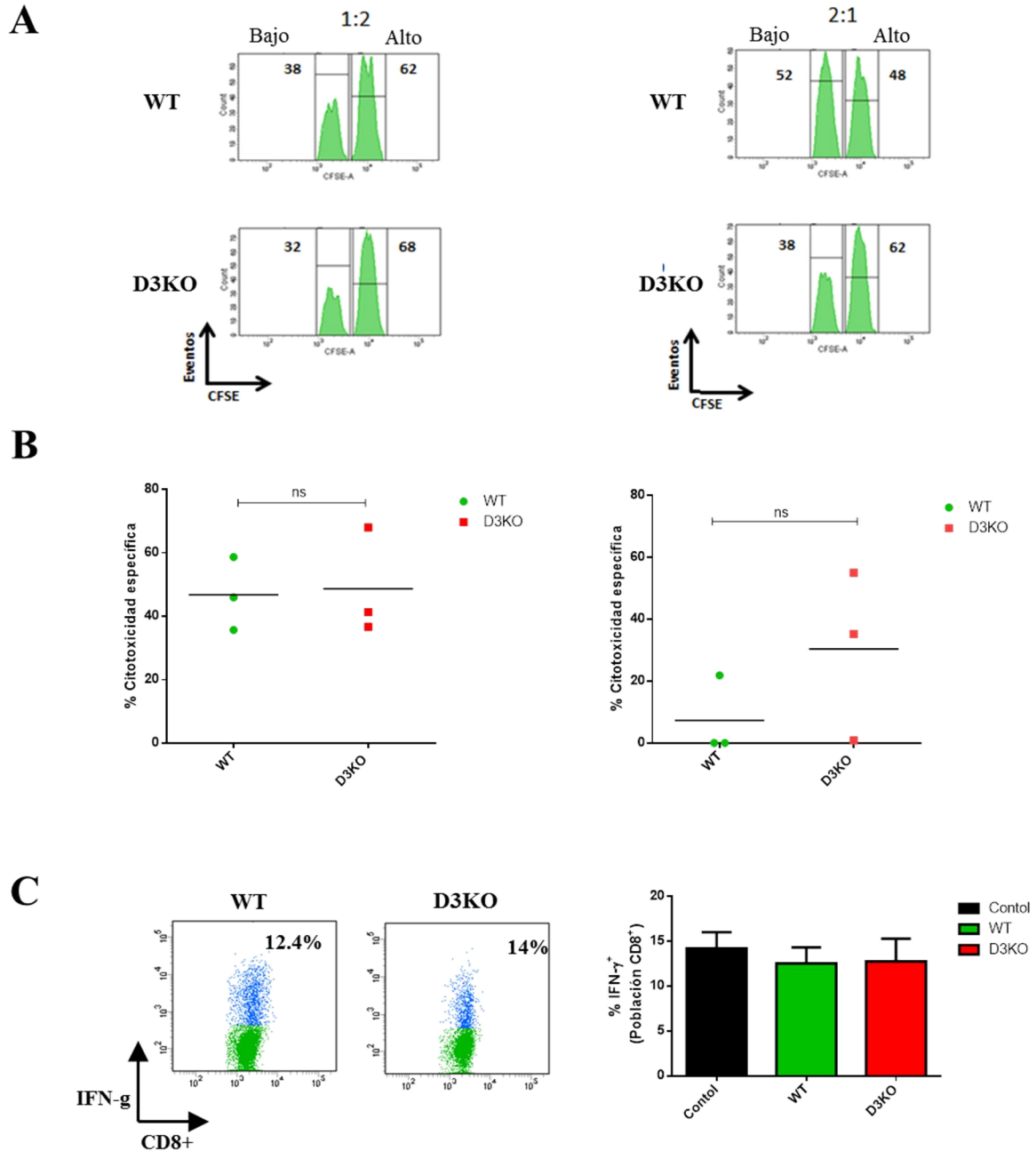


**Figura 6. Ratones deficientes en el D3R presentan un retraso en el crecimiento tumoral en un modelo de melanoma.** Se inyectaron  $3 \times 10^5$  células de melanoma murino B16 por vía intradérmica a animales normales y carentes en el receptor de dopamina D3. Los gráficos de la izquierda (**A** y **B**) indican la cinética de crecimiento tumoral por individuo hasta conseguir un volumen aproximado de  $2000 \text{ mm}^3$ . El panel izquierdo de (**A**) muestra la cinética de crecimiento tumoral obtenida en 12 ratones WT y 13 ratones D3KO. En (**B**) se realizan los mismos análisis que en (**A**) pero comparando un grupo de 5 ratones WT con un grupo de 5 ratones WT transferidos con  $2 \times 10^6$  de linfocitos T CD8<sup>+</sup> D3KO por inyección intravenosa **24 horas previas** a la inoculación de las células tumorales. En los paneles izquierdo y derecho (**B**) se observa que no hay diferencias en el desarrollo de los tumores al comparar entre estos dos grupos. Los datos presentados fueron obtenidos en 3 experimentos independientes, a excepción de los datos mostrados en azul (Figura 6B), los que sólo fueron obtenidos en un experimento. \*,  $p < 0.05$  según el test Long-rank (Mantel-Cox).

### **5.5 Ratones deficientes en el D3R inducen una respuesta citotóxica normal frente al desafío tumoral con melanoma B16.**

Debido a que los resultados obtenidos al analizar las curvas de crecimiento tumoral sugieren que la ausencia total del D3R retrasa el crecimiento tumoral, pero que la población T CD8<sup>+</sup> D3KO no es la responsable de este retraso, se evaluó si la respuesta citotóxica en células totales del bazo de los ratones D3KO desafiados con melanoma se encuentra elevada. Para esto, se utilizó un ensayo de citotoxicidad *in vitro*, en el cual se utilizaron células de melanoma B16 como célula blanco. Para evaluar la citotoxicidad, una parte de las células de melanoma fue teñida con CFSE<sup>bajo</sup>, para luego ser cocultivadas, en distintas proporciones, con esplenocitos provenientes de animales WT o D3KO desafiados con células tumorales B16. La otra fracción de células B16 fue teñida con CFSE<sup>alto</sup> para así tener un control interno (estas células no se exponen a los esplenocitos). Luego de 4 horas a 37°C, las células fueron recuperadas y analizadas directamente mediante citometría de flujo para evaluar las poblaciones CFSE<sup>alto</sup> y CFSE<sup>bajo</sup> y así determinar la citotoxicidad específica. Como se muestra en la figura 7(A), este sistema permite evaluar la citotoxicidad *in vitro*, ya que al cultivar células B16 en presencia de esplenocitos WT o D3KO provenientes de animales con desafío tumoral (proporción 1:2), se observa una disminución en la población B16 debida a citotoxicidad específica (cerca al 50%) por parte de los esplenocitos de ambos ratones (Figura 7A, panel izquierdo). Por otra parte, al cultivar células B16 en presencia de esplenocitos de ratones WT o D3KO desafiados con B16, pero en una proporción 2:1 se produce un citotoxicidad específica cercana al 10% y al 50%, respectivamente (Figura 7B, panel derecho). Al utilizar una proporción más baja de esplenocitos se observa una tendencia de mayor capacidad citotóxica por parte de esplenocitos de ratones D3KO, lo cual podría explicar la diferencia en el crecimiento tumoral observado en estos ratones. Esta observación sugiere que otras poblaciones con capacidad citotóxica presentes en el bazo, tales como las células NK, podrían tener aumentada su función antitumoral en ausencia del D3R. Por otro lado, considerando que previamente se demostró que los ratones D3KO presentan menor frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$ , se evaluó la expresión de esta citoquina por parte de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratones WT o D3KO desafiados con melanoma B16. Para esto se realizó un cultivo de esplenocitos en presencia de un extracto tumoral obtenido de células B16. Los

resultados muestran que la frecuencia de células productoras de IFN- $\gamma$  es muy similar entre linfocitos T CD8<sup>+</sup> provenientes de ratones WT y D3KO (Figura 7C). En conjunto, estos resultados indican que la expresión del D3R en células T CD8<sup>+</sup> no contribuye de manera relevante en la respuesta citotóxica en el modelo de melanoma B16.

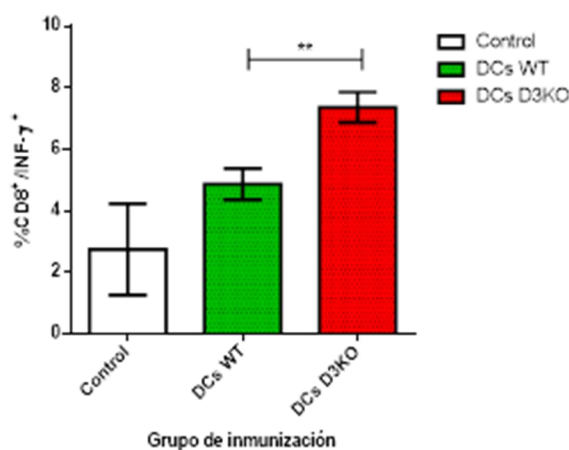


**Figura 7. Ratones deficientes en el D3R inducen una respuesta citotóxica normal frente al desafío tumoral con melanoma B16.** Células B16 fueron teñidas con CFSE<sup>bajo</sup> (0,5 $\mu$ M) para luego ser cultivadas con esplenocitos de ratones WT o D3KO desafiados 22 días antes con células de melanoma B16. Otra población de células B16 fue teñida con CFSE<sup>alto</sup> (5 $\mu$ M), para ser utilizada como control interno. Después de 4 horas de cultivo, se evaluó la citotoxicidad específica en la población CFSE<sup>+</sup> (A-B). Adicionalmente, se evaluó la producción de IFN- $\gamma$  en la población CD8<sup>+</sup> de esplenocitos derivados de ratones WT o D3KO (desafiados previamente con células de melanoma B16) cultivados durante 3 días en presencia de un extracto tumoral obtenido a partir de  $1 \times 10^7$  células B16 (C). En (A) se muestran histogramas representativos de las poblaciones B16 cultivadas o no en presencia de esplenocitos WT o D3KO. El número al interior de cada histograma indica el porcentaje de cada población con respecto a las células CFSE<sup>+</sup> totales. El porcentaje de citotoxicidad en (B) se calculó como se indica en la fórmula descrita en materiales y métodos. Ambos gráficos muestran todos los datos obtenidos junto a la citotoxicidad específica promedio (representada como una raya horizontal). En (C) se muestran gráficos de puntos representativos (panel izquierdo) de la producción de IFN- $\gamma$  en la población CD8<sup>+</sup>. Los números al interior de los gráficos indican el porcentaje de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> dentro de la población CD8<sup>+</sup>. El gráfico de barras (panel derecho) representa la media en la producción de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. En (B), (A) y (C) se muestran datos representativos obtenidos de un experimento. Las diferencias observadas en los gráficos de puntos (B) fueron analizadas por test t de Student no pareado. ns, no significativo.

### **5.6 La inmunización con DCs deficientes en el D3R incrementa la producción de IFN- $\gamma$ por linfocitos T CD8<sup>+</sup>.**

Considerando que los datos obtenidos indican que los animales D3KO presentan un retardo en el crecimiento de una línea tumoral *in vivo*, pero que la expresión del receptor D3R en linfocitos T CD8<sup>+</sup> no contribuye en este fenómeno, se decidió evaluar de qué manera la expresión de este receptor en otras poblaciones inmunes contribuye en la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Un tipo celular de la inmunidad innata que juega un papel clave en la

activación y diferenciación de la inmunidad adaptativa es el de las DCs. Por este motivo, en este trabajo se evaluó de qué manera contribuye la expresión del D3R en DCs en la producción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Para esto, DCs provenientes de ratones WT o D3KO fueron pulsadas con proteína OVA, maduras con lipopolisacárido bacteriano (LPS) y luego inyectadas intraperitonealmente a ratones WT para estimular una respuesta inmune específica contra OVA. Después de siete días, se obtuvieron las células de bazo de estos ratones para ser cultivadas durante cuatro días en presencia del péptido OVA<sub>257-264</sub> para luego analizar la producción de IFN- $\gamma$  en las células T CD8<sup>+</sup> en respuesta al antígeno específico. Como se muestra en la figura 8, la transferencia de DCs D3KO a ratones WT produce un aumento en la frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  cuando se compara con la respuesta inducida en animales transferidos con DCs WT. Este resultado sugiere que las DCs deficientes en el D3R activan de manera más eficiente una respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  *in vivo*, promoviendo así una mejor respuesta antitumoral.



**Figura 8. La inmunización con DCs deficientes en el D3R incrementa la producción de IFN- $\gamma$  por linfocitos T CD8<sup>+</sup> *in vivo*.** DCs obtenidas de ratones D3KO o WT fueron pulsadas con OVA (10  $\mu$ g/ml) por 24 horas y luego fueron maduras con LPS (400 ng/ml) por 4 horas. Posteriormente, estas DCs fueron inyectadas intraperitonealmente (10<sup>6</sup> células/ ratón) en ratones WT. 7 días más tarde, se removieron los bazos de estos ratones y los esplenocitos fueron cultivados con 10 nM OVA<sub>257-264</sub> durante 4 días y luego fueron reestimulados con PMA y ionomicina durante 4 horas en presencia de brefeldina A. La expresión de IFN- $\gamma$  fue analizada

por citometría de flujo en la población de células T CD8<sup>+</sup>. La figura muestra un gráfico de barras que representa la producción de IFN- $\gamma$  en la población CD8<sup>+</sup>. Los números indican el porcentaje de eventos IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en la población CD8<sup>+</sup>. Se muestran los datos obtenidos en 3 experimentos independientes, donde los valores representan el promedio  $\pm$  desviación estándar. \*\*,  $p < 0.05$  según el test  $t$  de Student no pareado.

## 6. DISCUSIÓN

En esta investigación se ha propuesto que la expresión de DARs en células T y DCs puede modificar la polarización de células T CD8<sup>+</sup> hacia el fenotipo Tc1, modulando de esta manera la respuesta antitumoral. Los resultados aportados sugieren que la expresión del D3R en linfocitos T CD8<sup>+</sup> favorece el desarrollo de respuestas citotóxicas *in vitro*, ya que su ausencia reduce la polarización *in vitro* de células T CD8<sup>+</sup> vírgenes hacia el fenotipo citotóxico Tc1. Sin embargo, los datos sugieren que la expresión del D3R en linfocitos T CD8<sup>+</sup> no sería importante *in vivo* en la respuesta inmune antitumoral. Al analizar el papel del D3R de manera global, fue posible observar que la expresión de este en una o más poblaciones celulares favorece el desarrollo tumoral, ya que ratones deficientes en este receptor exhiben un crecimiento tumoral retardado. En línea con lo anterior, las DCs deficientes en D3R inducen con mayor eficiencia la diferenciación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  *in vivo*. De este modo, este trabajo permite sugerir que la estimulación del D3R expresado en células dendríticas reduce la capacidad de estas células de inducir linfocitos T CD8<sup>+</sup> de fenotipo citotóxico, disminuyendo de esta manera su potencial antitumoral. Es posible que este sea un mecanismo de control utilizado por la interacción neuroinmune, mediante el cual se evita la activación excesiva de respuestas citotóxicas y, por lo tanto, evita potenciales ataques contra tejidos propios. Es interesante mencionar que el efecto que tiene la estimulación del D3R sobre las DCs se opone al efecto que tiene sobre los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, siendo el efecto sobre la función de las DCs el que domina en el fenotipo global. Esto va en línea con el papel clave que tienen las DCs como iniciadoras de la respuesta inmune adaptativa.

Un largo número de estudios han entregado evidencias de la expresión de DARs en linfocitos (Pacheco et al., 2009). De acuerdo a esto, los linfocitos T expresan todos los DARs conocidos (D1-D5), y ellos podrían modular la activación y función efectora de las células T. Por su parte, el receptor de mayor afinidad para DA es el D3R. Análisis previos de nuestro grupo indican que células T CD8<sup>+</sup> totales de ratones D3KO presentan un defecto en la expresión y producción de citoquinas y moléculas citotóxicas típicas del fenotipo Tc1. Estos resultados concuerdan con los

resultados obtenidos por Ilani, 2004, estudio que muestra que la estimulación mediante agonistas del D3R induce la expresión de IFN- $\gamma$  en linfocitos T CD8<sup>+</sup> de humanos in vitro. Sin embargo, en estas observaciones queda pendiente determinar cuál población, dentro de las que componen el compartimiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, presenta el defecto en la producción de IFN- $\gamma$ . De este modo, al analizar la producción de esta citoquina por parte de las diferentes poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes, memoria y efectores obtenidas de ratones WT o D3KO, no fue posible detectar diferencias importantes en la producción de IFN- $\gamma$  (Figura 3), como se vió previamente en la mezcla total de células T CD8<sup>+</sup> (Figura 2). Estos resultados sugieren fuertemente que la subpoblación deficitaria en la expresión de IFN- $\gamma$  que se encontró en linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales probablemente se defina fenotípicamente por la baja expresión tanto de CD62L como de CD44. Esta población incluye a linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria central y memoria efectores, que también pueden producir IFN- $\gamma$  en respuesta a re-estimulación y que por lo tanto podrían ser evaluados más adelante. En base a estos resultados, es posible especular que alguna población celular, tanto del compartimiento inmune como no-inmune, capaz de mantener o diferenciar linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$ , se pueda encontrar alterada en ratones D3KO.

Considerando estos resultados, a continuación se analizó la relevancia del D3R expresado en linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes en la activación y adquisición del fenotipo efector Tc1. En este sistema fue posible observar una tendencia a expresar menores niveles de Tbet y Eomes en células T CD8<sup>+</sup> deficientes del D3R (Figura 4 A y B), lo que podría reflejarse en que moléculas efectoras y citoquinas también estuvieran afectadas en su expresión. Esto fue lo que se observó en el caso de perforina (Figura 4 E) y granzima B (Figura 4 D), las cuales tienen una tendencia a expresarse menos en linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes deficientes en el D3R. En cuanto a IFN- $\gamma$  (Figura 4 C), los niveles de esta citoquina a nivel de ARNm no fueron diferentes entre células del genotipo WT o D3KO, lo que puede ser explicado por la función redundante que tienen los factores de transcripción Tbet y Eomes en la inducción de IFN- $\gamma$  en linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Sullivan et al., 2003) (Pearce, 2003). De este modo, la expresión parcial de ambos factores de transcripción en linfocitos T CD8<sup>+</sup> D3KO sería suficiente para la inducción de niveles normales del transcrito de IFN- $\gamma$ . Por el contrario, los bajos niveles de expresión del ARNm de perforina y



granzima B detectados en linfocitos T CD8<sup>+</sup> D3KO se pueden explicar por el hecho de que la regulación de estos genes depende mayoritariamente de la expresión de Eomes y no podría ser compensada por la expresión parcial de Tbet.

Al evaluar la expresión a nivel de proteína de moléculas asociadas con la función citotóxica, se observó que linfocitos T CD8<sup>+</sup> D3KO polarizados hacia el fenotipo Tc1 tienden a expresar menores niveles de granzima B y LAMP-1 (Figura 5 B y C), lo cual es consistente con la menor expresión de granzima B y perforina detectada en estos linfocitos mediante PCR cuantitativo. Sin embargo, debido a la variabilidad observada entre experimentos, no fue posible detectar diferencias significativas con el número de repeticiones realizadas en estos experimentos. De manera interesante, también se observó menor frecuencia de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en el caso de linfocitos T CD8<sup>+</sup> D3KO polarizados hacia el fenotipo Tc1, lo que difiere de la determinación de los niveles de ARNm (Figura 5 A). En este caso, es posible sugerir que la estimulación del D3R expresado en linfocitos T CD8<sup>+</sup> regularía de manera post-transcripcional la expresión de IFN- $\gamma$ . De este modo, a pesar de no detectarse diferencias a nivel de transcrito, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> deficientes en D3R presentan una reducción significativa en la proporción de células que expresan IFN- $\gamma$  a nivel de proteína. A modo general, estos datos sugieren que la expresión de este receptor en linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes facilita la adquisición del fenotipo citotóxico *in vitro*. Una posible proyección de este trabajo sería el análisis de otros factores de transcripción involucrados en la expresión de moléculas efectoras, en particular Bcl-6 ha sido descrito que juega un rol importante en la diferenciación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y su expresión suprime la expresión de granzima B (Yoshida et al., 2006), los cuales al igual que Tbet y Eomes podrían ser regulados por el D3R.

Con el objetivo de evaluar si las diferencias observadas en la diferenciación hacia fenotipo citotóxico entre linfocitos T CD8<sup>+</sup> WT y D3KO tienen relevancia en una respuesta inmune *in vivo*, se evaluó el crecimiento de células de melanoma murino B16 en ratones WT y D3KO. De manera inesperada de acuerdo a los resultados obtenidos *in vitro* con linfocitos T CD8<sup>+</sup>, se observó un retraso significativo del crecimiento tumoral en ratones que carecen del D3R (Figura 6 A). A continuación, y con el fin de determinar si la carencia en la población de linfocitos T

CD8<sup>+</sup> confiere protección frente al desafío tumoral, se realizó la transferencia adoptiva de células T CD8<sup>+</sup> D3KO a ratones WT y posteriormente el desafío tumoral. En este caso, no se apreciaron diferencias al comparar con el desarrollo de tumores en ratones sin transferir (Figura 6B). Estos resultados indican que la deficiencia del D3R en otra población celular, y no en los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, estaría siendo la responsable del retraso del crecimiento de tumores B16 en animales D3KO. Una consideración importante al momento de interpretar estos datos es que en estos experimentos se transfirió solamente  $2 \times 10^6$  de linfocitos T CD8<sup>+</sup> D3KO a cada ratón WT para luego desafiar con las células de melanoma B16. Es posible que el número de células transferido sea tan bajo que no permita ver un efecto protector bajo las condiciones utilizadas en los experimentos mostrados en esta tesis. En este sentido, es importante considerar lo demostrado por Watanabe et al., 2006, quienes demostraron que la estimulación del D3R expresado por linfocitos T CD8<sup>+</sup> favorece la migración de estas células hacia los órganos linfoides. De este modo, es posible que además de transferir una cantidad relativamente baja de linfocitos T CD8<sup>+</sup> D3KO, es posible que una proporción aún menor de estas células hayan migrado hacia los linfonodos. Considerando que este es el sitio de iniciación de las respuestas inmunes. Este punto definitivamente se debe considerar a la hora de evaluar los resultados obtenidos en este tipo de experimentos. Una posible solución para esta limitación en el diseño experimental, corresponde a la transferencia de mayores cantidades de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, o a la utilización de ratones recipientes carentes de linfocitos T con el objetivo de analizar exclusivamente la contribución de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> transferidos. Otra alternativa para solucionar este problema es la utilización de linfocitos T CD8<sup>+</sup> obtenidos a partir de ratones transgénicos cuyo TCR reconoce de manera específica péptidos derivados de ovoalbúmina (OT-I) (Hogquist et al., 1994; Clarke et al., 2000). Este sistema permitiría reducir el número de células transferidas, ya que la mayoría respondería al antígeno modelo expresado por la línea de melanoma murino B16-OVA (células B16 expresando establemente ovoalbúmina) disponible en nuestro laboratorio. Otro enfoque es analizar otras poblaciones relevantes en el desarrollo de neoplasias directamente en ratones D3KO, tales como células T reguladoras o mieloides supresoras (Liu et al., 2013), tanto a nivel del infiltrado tumoral como en órganos linfoides. Estas poblaciones tienen la capacidad de suprimir la respuesta antitumoral conducida tanto por linfocitos T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. En este sentido, sería importante también determinar la modulación de las recientemente descritas células T CD8<sup>+</sup> reguladoras, las

cuales han sido descritas como relevantes en un modelo de cáncer de próstata en Kiniwa et al., 2007.

En línea con los resultados expuestos previamente, no se observaron diferencias en la capacidad citotóxica de esplenocitos obtenidos de ratones WT y D3KO que fueron desafiados con células B16 (Figura 7 A y B). De manera similar, tampoco se vieron diferencias en la producción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> contenidos en los esplenocitos de estos ratones al ser cultivados con un extracto de células B16 (Figura 7 C). Estos resultados están en línea con aquellos resultados de transferencia adoptiva de células T CD8<sup>+</sup> D3KO en recipientes WT donde se concluye que el D3R expresado en células T CD8<sup>+</sup> no tiene relevancia en su función citotóxica *in vivo*. Por otro lado, estos resultados junto a la observación de que los ratones D3KO muestran un retraso en el crecimiento tumoral respecto a los WT, avalan nuevamente de que la expresión del D3R en una población celular diferente a las células T CD8<sup>+</sup> estaría inhibiendo la potencia de la respuesta antitumoral.

Por último, con el objetivo de intentar dilucidar alguna población celular donde el D3R expresado podría explicar el retraso del crecimiento tumoral observado en los ratones D3KO, se realizó una ronda de experimentos apostando por las DCs. Para este último análisis se escogieron estas células debido al papel clave que las DCs juegan en la activación de células T CD8<sup>+</sup>. Con este propósito, se analizó el efecto de la expresión del D3R en DCs sobre la inducción de una respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> *in vivo*. Al inmunizar animales con DCs D3KO se observó un incremento en la frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas productoras de IFN- $\gamma$ . Con respecto al importante papel de las DCs en la inmunidad anti-tumoral, existen estudios que indican que al potenciar la actividad de las DCs, estas podrían aumentar la activación de la respuesta inmune mediada por células T, a través de la mejora de la presentación antigénica (Gett et al., 2003). Por lo tanto, estos resultados indican que unos de los tipos celulares involucrados en la respuesta antitumoral de los animales D3KO, serían las DCs, ya que podrían promover una mayor respuesta citotóxica. Uno de los posibles mecanismos que podrían explicar la mayor potencia de DCs carentes D3R en la inducción de función Tc1 es la presentación cruzada. Con respecto a esto, resultados preliminares de nuestro laboratorio han mostrado que la inhibición

farmacológica del D3R en DCs WT favorece fuertemente la presentación cruzada de antígenos (datos no publicados). Es decir que, la estimulación del D3R estaría atenuando que la OVA administrada exógenamente a las DCs sea procesada y presentada posteriormente sobre moléculas de MHC de clase I a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Además, se ha descrito que las DCs pueden producir DA, liberarla y actuar de manera autocrina sobre sus DARs (Prado et al., 2012). Así estos resultados sugieren que el D3R expresado en DCs tendría un papel atenuante de la respuesta inmune antitumoral, lo que podría explicar, al menos en parte, los resultados de retraso del desarrollo de melanoma en ratones D3KO. Por último, estos resultados sugieren que el D3R expresado en DCs podría un posible blanco terapéutico a ser considerado en el diseño de terapias celulares para el tratamiento de tumores.

## 7. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis se concluye que la expresión del D3R en linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes al ser polarizados hacia el fenotipo Tc1 *in vitro*, potencia significativamente la producción de la citoquina efectora IFN- $\gamma$ . Además, la expresión del D3R en estas células también muestra una tendencia a favorecer los niveles de expresión tanto de los factores de transcripción Tbet y Eomes, como de las moléculas efectoras granzima B y perforina 1, así como tiende también a aumentar la liberación de vesículas citotóxica, según la expresión de LAMP-1 en la superficie celular. Además, los ratones D3KO exhiben un crecimiento tumoral retardado en comparación a ratones WT, lo que indica que el D3R expresado en alguna o algunas poblaciones celulares disminuye la potencia de la respuesta antitumoral. Los análisis de la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> *in vivo* en un contexto de respuesta inmune antitumoral en ratones D3KO y WT mostraron que la respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ambos genotipos es similar. Experimentos de transferencia adoptiva de células T CD8<sup>+</sup> D3KO en ratones recipientes WT desafiados con implantes tumorales corroboraron que la expresión del D3R en la población de células T CD8<sup>+</sup> es irrelevante para la potencia de la respuesta inmune antitumoral en el modelo de melanoma B16. De acuerdo a los datos de este estudio, se puede concluir que las células responsables de que los animales D3KO presenten un retraso en el crecimiento tumoral no corresponden a la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Con respecto a esto, experimento de transferencia de DCs tratadas *ex vivo* en ratones recipientes WT mostraron que la deficiencia del D3R en estas células promueve una respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> más potentes *in vivo*. Así, es posible proponer que alterar la expresión del D3R en DCs podría potenciar la respuesta inmune antitumoral.

## 8. REFERENCIAS

- Alaniz, R.C., Thomas, S.A., Perez-Melgosa, M., Mueller, K., Farr, A.G., Palmiter, R.D. & Wilson, C.B.** 1999. Dopamine beta-hydroxylase deficiency impairs cellular immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 96(5): 2274-2278.
- Amedei, A., Nicolai, E. & D'Elis, M.M.** 2011. T Cells and Adoptive Immunotherapy: Recent Developments and Future Prospects in Gastrointestinal Oncology. *Clinical and Developmental Immunology.* 2011: 1-17.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., ... Palucka, K.** 2000. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology.* 18(1): 767-811.
- Banerjee, A., Gordon, S.M., Intlekofer, A.M., Paley, M.A., Mooney, E.C., Lindsten, T., ... Reiner, S.L.** 2010. Cutting Edge: The Transcription Factor Eomesodermin Enables CD8+ T Cells To Compete for the Memory Cell Niche. *The Journal of Immunology.* 185(9): 4988-4992.
- Banerjee, D.K., Dhodapkar, M.V., Matayeva, E., Steinman, R.M. & Dhodapkar, K.M.** 2006. Expansion of FOXP3high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood.* 108(8): 2655-2661.
- Baud, V. & Karin, M.** 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology.* 11(9): 372-377.
- Beck, G.C., Brinkkoetter, P., Hanusch, C., Schulte, J., van Ackern, K., van der Woude, F.J. & Yard, B.A.** 2004. Clinical review: immunomodulatory effects of dopamine in general inflammation. *Critical care (London, England).* 8(6): 485-491.
- Ben-Jonathan, N. & Hnasko, R.** 2001. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine reviews.* 22(6): 724-763.
- Besser, M.J., Ganor, Y. & Levite, M.** 2005. Dopamine by itself activates either D2, D3 or D1/D5 dopaminergic receptors in normal human T-cells and triggers the selective secretion of either IL-10, TNFalpha or both. *Journal of neuroimmunology.* 169(1-2): 161-171.
- Bevan, M.J.** 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *Journal of Experimental Medicine.* 143(5): 1283-1288.

- Billiau, A.** 1996. Interferon- $\gamma$ : Biology and Role in Pathogenesis. En *Advances in Immunology*. (Vol. 62). Elsevier. Recuperado a partir de <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065277608604289>
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. & Howard, J.C.** 1997. CELLULAR RESPONSES TO INTERFERON- $\gamma$ . *Annual Review of Immunology*. 15(1): 749-795.
- Bolitho, P., Street, S.E.A., Westwood, J.A., Edelmann, W., Macgregor, D., Waring, P., ... Smyth, M.J.** 2009. Perforin-mediated suppression of B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(8): 2723-2728.
- Catalfamo, M. & Henkart, P.A.** 2003. Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Current opinion in immunology*. 15(5): 522-527.
- Cenci, M.A.** 2007. Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia. *Trends in neurosciences*. 30(5): 236-243.
- Chia, J., Yeo, K.P., Whisstock, J.C., Dunstone, M.A., Trapani, J.A. & Voskoboinik, I.** 2009. Temperature sensitivity of human perforin mutants unmasks subtotal loss of cytotoxicity, delayed FHL, and a predisposition to cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(24): 9809-9814.
- Clarke, S.R., Barnden, M., Kurts, C., Carbone, F.R., Miller, J.F. & Heath, W.R.** 2000. Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunology and cell biology*. 78(2): 110-117.
- Cooper, A.M., Dalton, D.K., Stewart, T.A., Griffin, J.P., Russell, D.G. & Orme, I.M.** 1993. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *The Journal of experimental medicine*. 178(6): 2243-2247.
- Cosentino, M., Bombelli, R., Ferrari, M., Marino, F., Rasini, E., Maestroni, G.J., ... Frigo, G.** 2000. HPLC-ED measurement of endogenous catecholamines in human immune cells and hematopoietic cell lines. *Life sciences*. 68(3): 283-295.
- Cosentino, M., Fietta, A.M., Ferrari, M., Rasini, E., Bombelli, R., Carcano, E., ... Lecchini, S.** 2007. Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. *Blood*. 109(2): 632-642.
- Coursey, T.G., Chen, P.W. & Niederkorn, J.Y.** 2011. IL-17-dependent, IFN-gamma-independent tumor rejection is mediated by cytotoxic T lymphocytes and occurs at extraocular sites, but is excluded from the eye. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 187(8): 4219-4228.
- Croft, M., Carter, L., Swain, S.L. & Dutton, R.W.** 1994. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in

- promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *The Journal of experimental medicine*. 180(5): 1715-1728.
- Dayan, P.** 2009. Dopamine, reinforcement learning, and addiction. *Pharmacopsychiatry*. 42 Suppl 1: S56-65.
- De Saint Basile, G., Ménasché, G. & Fischer, A.** 2010. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nature Reviews Immunology*. 10(8): 568-579.
- De Vries, I.J.M., Lesterhuis, W.J., Scharenborg, N.M., Engelen, L.P.H., Ruiter, D.J., Gerritsen, M.-J.P., ... Punt, C.J.A.** 2003. Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 9(14): 5091-5100.
- Dobrzanski, M.J., Reome, J.B., Hollenbaugh, J.A. & Dutton, R.W.** 2004. Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 172(3): 1380-1390.
- Dobrzanski, M.J., Reome, J.B., Hyland, J.C. & Rewers-Felkins, K.A.** 2006. CD8-mediated type 1 antitumor responses selectively modulate endogenous differentiated and nondifferentiated T cell localization, activation, and function in progressive breast cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 177(11): 8191-8201.
- Dustin, M.L. & Shaw, A.S.** 1999. Costimulation: building an immunological synapse. *Science (New York, N.Y.)*. 283(5402): 649-650.
- Elenkov, I.J., Wilder, R.L., Chrousos, G.P. & Vizi, E.S.** 2000. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacological reviews*. 52(4): 595-638.
- Fong, T.A. & Mosmann, T.R.** 1990. Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 144(5): 1744-1752.
- Franco, R., Pacheco, R., Lluís, C., Ahern, G.P. & O'Connell, P.J.** 2007. The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends in immunology*. 28(9): 400-407.
- Friedl, P., den Boer, A.T. & Gunzer, M.** 2005. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nature Reviews Immunology*. 5(7): 532-545.
- Gabrilovich, D.I., Nadaf, S., Corak, J., Berzofsky, J.A. & Carbone, D.P.** 1996. Dendritic Cells in Antitumor Immune Responses. *Cellular Immunology*. 170(1): 111-119.
- Garcia-Hernandez, M. de la L., Hamada, H., Reome, J.B., Misra, S.K., Tighe, M.P. & Dutton, R.W.** 2010. Adoptive transfer of tumor-specific Tc17 effector T cells controls



the growth of B16 melanoma in mice. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950). 184(8): 4215-4227.

- Gervais, A., Toutirais, O., Bouet-Toussaint, F., De la Pintiere, C.T., Genetet, N. & Catros-Quemener, V.** 2007. In vitro antitumor lymphocyte generation using dendritic cells and innate immunity mechanisms as tumor cell treatments. *Anticancer research*. 27(4B): 2385-2392.
- Gett, A.V., Sallusto, F., Lanzavecchia, A. & Geginat, J.** 2003. T cell fitness determined by signal strength. *Nature Immunology*. 4(4): 355-360.
- Giorelli, M., Livrea, P. & Trojano, M.** 2005. Dopamine fails to regulate activation of peripheral blood lymphocytes from multiple sclerosis patients: effects of IFN-beta. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 25(7): 395-406.
- Glimcher, L.H., Townsend, M.J., Sullivan, B.M. & Lord, G.M.** 2004. Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nature Reviews Immunology*. 4(11): 900-911.
- González, H., Contreras, F., Prado, C., Elgueta, D., Franz, D., Bernales, S. & Pacheco, R.** 2013. Dopamine receptor D3 expressed on CD4+ T cells favors neurodegeneration of dopaminergic neurons during Parkinson's disease. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950). 190(10): 5048-5056.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M. & Dustin, M.L.** 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* (New York, N.Y.). 285(5425): 221-227.
- Hamada, H., Garcia-Hernandez, M. d. I. L., Reome, J.B., Misra, S.K., Strutt, T.M., McKinstry, K.K., ... Dutton, R.W.** 2009. Tc17, a Unique Subset of CD8 T Cells That Can Protect against Lethal Influenza Challenge. *The Journal of Immunology*. 182(6): 3469-3481.
- Hamann, A., Klugewitz, K., Austrup, F. & Jablonski-Westrich, D.** 2000. Activation induces rapid and profound alterations in the trafficking of T cells. *European journal of immunology*. 30(11): 3207-3218.
- Harada, Y., Miyatake, S., Arai, K. & Watanabe, S.** 1999. Cyclic AMP inhibits the activity of c-Jun N-terminal kinase (JNKp46) but not JNKp55 and ERK2 in human helper T lymphocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 266(1): 129-134.
- Harty, J.T. & Badovinac, V.P.** 2002. Influence of effector molecules on the CD8+ T cell response to infection. *Current Opinion in Immunology*. 14(3): 360-365.

- Helmich, B.K. & Dutton, R.W.** 2001. The role of adoptively transferred CD8 T cells and host cells in the control of the growth of the EG7 thymoma: factors that determine the relative effectiveness and homing properties of Tc1 and Tc2 effectors. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950). 166(11): 6500-6508.
- Hershfield, M.S.** 2005. New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency. *European journal of immunology*. 35(1): 25-30.
- Hoenicke, J., Aragüés, M., Ponce, G., Rodríguez-Jiménez, R., Jiménez-Arriero, M.A. & Palomo, T.** 2007. From dopaminergic genes to psychiatric disorders. *Neurotoxicity research*. 11(1): 61-72.
- Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J. & Carbone, F.R.** 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell*. 76(1): 17-27.
- Ikeda, H., Old, L.J. & Schreiber, R.D.** 2002. The roles of IFN $\gamma$  in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 13(2): 95-109.
- Iken, K., Chheng, S., Fargin, A., Goulet, A.C. & Kouassi, E.** 1995. Serotonin upregulates mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation through 5-HT1A receptors. *Cellular immunology*. 163(1): 1-9.
- Ilani, T., Strous, R.D. & Fuchs, S.** 2004. Dopaminergic regulation of immune cells via D3 dopamine receptor: a pathway mediated by activated T cells. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 18(13): 1600-1602.
- Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Kao, C., Banerjee, A., Schambach, F., Northrop, J.K., ... Reiner, S.L.** 2007. Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 204(9): 2015-2021.
- Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., ... Reiner, S.L.** 2005. Effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nature immunology*. 6(12): 1236-1244.
- ISAACS, A. & LINDENMANN, J.** 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character*. Royal Society (Great Britain). 147(927): 258-267.
- Jimenez, J.L., Punzón, C., Navarro, J., Muñoz-Fernández, M.A. & Fresno, M.** 2001. Phosphodiesterase 4 inhibitors prevent cytokine secretion by T lymphocytes by inhibiting nuclear factor-kappaB and nuclear factor of activated T cells activation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 299(2): 753-759.

- Joshi, N.S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H.K., Urso, D.R., Hagman, J., ... Kaech, S.M.** 2007. Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8<sup>+</sup> T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity*. 27(2): 281-295.
- Kaech, S.M., Hemby, S., Kersh, E. & Ahmed, R.** 2002. Molecular and Functional Profiling of Memory CD8 T Cell Differentiation. *Cell*. 111(6): 837-851.
- Kaech, S.M., Wherry, E.J. & Ahmed, R.** 2002. VACCINES: EFFECTOR AND MEMORY T-CELL DIFFERENTIATION: IMPLICATIONS FOR VACCINE DEVELOPMENT. *Nature Reviews Immunology*. 2(4): 251-262.
- Kam, C.M., Hudig, D. & Powers, J.C.** 2000. Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors. *Biochimica et biophysica acta*. 1477(1-2): 307-323.
- Kawashima, K. & Fujii, T.** 2003. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life sciences*. 74(6): 675-696.
- Kemp, R.A. & Ronchese, F.** 2001. Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 167(11): 6497-6502.
- Kiniwa, Y., Miyahara, Y., Wang, H.Y., Peng, W., Peng, G., Wheeler, T.M., ... Wang, R.-F.** 2007. CD8<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells Mediate Immunosuppression in Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 13(23): 6947-6958.
- Kipnis, J., Cardon, M., Avidan, H., Lewitus, G.M., Mordechay, S., Rolls, A., ... Schwartz, M.** 2004. Dopamine, through the extracellular signal-regulated kinase pathway, downregulates CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell activity: implications for neurodegeneration. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 24(27): 6133-6143.
- Kohm, A.P., Mozaffarian, A. & Sanders, V.M.** 2002. B cell receptor- and beta 2-adrenergic receptor-induced regulation of B7-2 (CD86) expression in B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 168(12): 6314-6322.
- Kondo, T., Takata, H., Matsuki, F. & Takiguchi, M.** 2009. Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8<sup>+</sup> T cells producing IL-17. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 182(4): 1794-1798.
- Kuhn, S. & Ronchese, F.** 2013. Monocyte-derived dendritic cells: Emerging players in the antitumor immune response. *OncoImmunology*. 2(11): e26443.
- Lanzavecchia, A. & Sallusto, F.** 2001. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*. 106(3): 263-266.

- León-Ponte, M., Ahern, G.P. & O'Connell, P.J.** 2007. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor. *Blood*. 109(8): 3139-3146.
- Lesley, J., Hyman, R. & Kincade, P.W.** 1993. CD44 and Its Interaction with Extracellular Matrix. En *Advances in Immunology*. (Vol. 54). Elsevier. Recuperado a partir de <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065277608605374>
- Levite, M.** 2012. Dopamine in the Immune System: Dopamine Receptors in Immune Cells, Potent Effects, Endogenous Production and Involvement in Immune and Neuropsychiatric Diseases. En M. Levite (ed.), *Nerve-Driven Immunity*. Vienna: Springer Vienna. Recuperado a partir de [http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-7091-0888-8\\_1](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-7091-0888-8_1)
- Levite, M., Chowers, Y., Ganor, Y., Besser, M., HersHKovits, R. & Cahalon, L.** 2001. Dopamine interacts directly with its D3 and D2 receptors on normal human T cells, and activates beta1 integrin function. *European journal of immunology*. 31(12): 3504-3512.
- Liu, Y., Lan, Q., Lu, L., Chen, M., Xia, Z., Ma, J., ... Zheng, S.G.** 2013. Phenotypic and functional characteristic of a newly identified CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> regulatory T cells. *Journal of molecular cell biology*.
- Mackay, C.R.** 1993. Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*. 5(3): 423-427.
- McIlroy, D. & Gregoire, M.** 2003. Optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy: maturation state does have clinical impact. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. 52(10): 583-591.
- McKenna, F., McLaughlin, P.J., Lewis, B.J., Sibbring, G.C., Cummerson, J.A., Bowen-Jones, D. & Moots, R.J.** 2002. Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *Journal of neuroimmunology*. 132(1-2): 34-40.
- Mignini, F., Tomassoni, D., Traini, E. & Amenta, F.** 2009. Dopamine, vesicular transporters and dopamine receptor expression and localization in rat thymus and spleen. *Journal of neuroimmunology*. 206(1-2): 5-13.
- Mignini, F., Traini, E., Tomassoni, D. & Amenta, F.** 2006. Dopamine plasma membrane transporter (DAT) in rat thymus and spleen: an immunochemical and immunohistochemical study. *Autonomic & autacoid pharmacology*. 26(2): 183-189.
- Mogues, T., Goodrich, M.E., Ryan, L., LaCourse, R. & North, R.J.** 2001. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *The Journal of experimental medicine*. 193(3): 271-280.

- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N. & Kupfer, A.** 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. 395(6697): 82-86.
- Moriya, K., Wakabayashi, A., Shimizu, M., Tamura, H., Dan, K. & Takahashi, H.** 2010. Induction of tumor-specific acquired immunity against already established tumors by selective stimulation of innate DEC-205+ dendritic cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 59(7): 1083-1095.
- Nagata, S. & Golstein, P.** 1995. The Fas death factor. *Science*. 267(5203): 1449-1456.
- Nakano, K., Higashi, T., Hashimoto, K., Takagi, R., Tanaka, Y. & Matsushita, S.** 2008. Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochemical and biophysical research communications*. 373(2): 286-291.
- Nakano, K., Higashi, T., Takagi, R., Hashimoto, K., Tanaka, Y. & Matsushita, S.** 2009. Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. *International immunology*. 21(6): 645-654.
- Neve, K.A., Seamans, J.K. & Trantham-Davidson, H.** 2004. Dopamine receptor signaling. *Journal of receptor and signal transduction research*. 24(3): 165-205.
- Nishibori, M., Takahashi, H.K. & Mori, S.** 2003. The regulation of ICAM-1 and LFA-1 interaction by autacoids and statins: a novel strategy for controlling inflammation and immune responses. *Journal of pharmacological sciences*. 92(1): 7-12.
- Nouri-Shirazi, M., Banchereau, J., Fay, J. & Palucka, K.** 2000. Dendritic cell based tumor vaccines. *Immunology Letters*. 74(1): 5-10.
- O'Connell, P.J., Wang, X., Leon-Ponte, M., Griffiths, C., Pingle, S.C. & Ahern, G.P.** 2006. A novel form of immune signaling revealed by transmission of the inflammatory mediator serotonin between dendritic cells and T cells. *Blood*. 107(3): 1010-1017.
- O'Garra, A. & Arai, N.** 2000. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends in Cell Biology*. 10(12): 542-550.
- Pacheco, R., Ciruela, F., Casadó, V., Mallol, J., Gallart, T., Lluís, C. & Franco, R.** 2004. Group I metabotropic glutamate receptors mediate a dual role of glutamate in T cell activation. *The Journal of biological chemistry*. 279(32): 33352-33358.
- Pacheco, R., Contreras, F. & Prado, C.** 2012. Cells, Molecules and Mechanisms Involved in the Neuro-Immune Interaction. En S. Gowder (ed.), *Cell Interaction*. InTech. Recuperado a partir de <http://www.intechopen.com/books/cell-interaction/cells-molecules-and-mechanisms-involved-in-the-neuro-immune-interaction>

- Pacheco, R., Gallart, T., Lluís, C. & Franco, R.** 2007. Role of glutamate on T-cell mediated immunity. *Journal of neuroimmunology*. 185(1-2): 9-19.
- Pacheco, R., Prado, C.E., Barrientos, M.J. & Bernales, S.** 2009. Role of dopamine in the physiology of T-cells and dendritic cells. *Journal of Neuroimmunology*. 216(1-2): 8-19.
- Pacheco, R., Riquelme, E. & Kalergis, A.** 2010. Emerging Evidence for the Role of Neurotransmitters in the Modulation of T Cell Responses to Cognate Ligands. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*. 10(1): 65-83.
- Park, T.S., Rosenberg, S.A. & Morgan, R.A.** 2011. Treating cancer with genetically engineered T cells. *Trends in Biotechnology*. 29(11): 550-557.
- Pearce, E.L.** 2003. Control of Effector CD8+ T Cell Function by the Transcription Factor Eomesodermin. *Science*. 302(5647): 1041-1043.
- Potvin, S., Grignon, S. & Marchand, S.** 2009. Human evidence of a supra-spinal modulating role of dopamine on pain perception. *Synapse (New York, N.Y.)*. 63(5): 390-402.
- Prado, C., Contreras, F., Gonzalez, H., Diaz, P., Elgueta, D., Barrientos, M., ... Pacheco, R.** 2012. Stimulation of Dopamine Receptor D5 Expressed on Dendritic Cells Potentiates Th17-Mediated Immunity. *The Journal of Immunology*. 188(7): 3062-3070.
- Pulaski, B.A., Smyth, M.J. & Ostrand-Rosenberg, S.** 2002. Interferon-gamma-dependent phagocytic cells are a critical component of innate immunity against metastatic mammary carcinoma. *Cancer research*. 62(15): 4406-4412.
- Qin, Z., Schwartzkopff, J., Pradera, F., Kammertoens, T., Seliger, B., Pircher, H. & Blankenstein, T.** 2003. A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer research*. 63(14): 4095-4100.
- Ramstad, C., Sundvold, V., Johansen, H.K. & Lea, T.** 2000. cAMP-dependent protein kinase (PKA) inhibits T cell activation by phosphorylating ser-43 of raf-1 in the MAPK/ERK pathway. *Cellular signalling*. 12(8): 557-563.
- Rosenzweig, S.D. & Holland, S.M.** 2005. Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunological Reviews*. 203(1): 38-47.
- Russell, J.H. & Ley, T.J.** 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology*. 20: 323-370.
- Rutishauser, R.L. & Kaech, S.M.** 2010. Generating diversity: transcriptional regulation of effector and memory CD8 T-cell differentiation. *Immunological reviews*. 235(1): 219-233.

- Sad, S., Marcotte, R. & Mosmann, T.R.** 1995. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8<sup>+</sup> T cells into cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity*. 2(3): 271-279.
- Saha, B., Mondal, A.C., Majumder, J., Basu, S. & Dasgupta, P.S.** 2001. Physiological concentrations of dopamine inhibit the proliferation and cytotoxicity of human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in vitro: a receptor-mediated mechanism. *Neuroimmunomodulation*. 9(1): 23-33.
- Sakaguchi, S.** 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunology*. 6(4): 345-352.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A.** 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 401(6754): 708-712.
- Santambrogio, L., Lipartiti, M., Bruni, A. & Dal Toso, R.** 1993. Dopamine receptors on human T- and B-lymphocytes. *Journal of neuroimmunology*. 45(1-2): 113-119.
- Sarin, A., Williams, M.S., Alexander-Miller, M.A., Berzofsky, J.A., Zacharchuk, C.M. & Henkart, P.A.** 1997. Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases. *Immunity*. 6(2): 209-215.
- Sarkar, C., Das, S., Chakroborty, D., Chowdhury, U.R., Basu, B., Dasgupta, P.S. & Basu, S.** 2006. Cutting Edge: Stimulation of dopamine D4 receptors induce T cell quiescence by up-regulating Kruppel-like factor-2 expression through inhibition of ERK1/ERK2 phosphorylation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 177(11): 7525-7529.
- Schoenborn, J.R. & Wilson, C.B.** 2007. Regulation of Interferon- $\gamma$  During Innate and Adaptive Immune Responses. En *Advances in Immunology*. (Vol. 96). Elsevier. Recuperado a partir de <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065277607960022>
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T. & Hume, D.A.** 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*. 75(2): 163-189.
- Schulz, E.G., Mariani, L., Radbruch, A. & Höfer, T.** 2009. Sequential Polarization and Imprinting of Type 1 T Helper Lymphocytes by Interferon- $\gamma$  and Interleukin-12. *Immunity*. 30(5): 673-683.
- Shtrichman, R. & Samuel, C.E.** 2001. The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Current opinion in microbiology*. 4(3): 251-259.
- Sibley, D.R., Monsma, F.J., Jr & Shen, Y.** 1993. Molecular neurobiology of dopaminergic receptors. *International review of neurobiology*. 35: 391-415.

- Sidhu, A.** 1998. Coupling of D1 and D5 dopamine receptors to multiple G proteins: Implications for understanding the diversity in receptor-G protein coupling. *Molecular neurobiology*. 16(2): 125-134.
- Smyth, M.J. & Trapani, J.A.** 1995. Granzymes: exogenous proteases that induce target cell apoptosis. *Immunology Today*. 16(4): 202-206.
- Strange, P.G.** 1993. New insights into dopamine receptors in the central nervous system. *Neurochemistry international*. 22(3): 223-236.
- Sullivan, B.M., Juedes, A., Szabo, S.J., von Herrath, M. & Glimcher, L.H.** 2003. Antigen-driven effector CD8 T cell function regulated by T-bet. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(26): 15818-15823.
- Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L. & Glimcher, L.H.** 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annual review of immunology*. 21: 713-758.
- Takahashi, H.** 2003. Antigen presentation in vaccine development. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 26(5-6): 309-328.
- Tian, J., Lu, Y., Zhang, H., Chau, C.H., Dang, H.N. & Kaufman, D.L.** 2004. Gamma-aminobutyric acid inhibits T cell autoimmunity and the development of inflammatory responses in a mouse type 1 diabetes model. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 173(8): 5298-5304.
- Torres, G.E., Gainetdinov, R.R. & Caron, M.G.** 2003. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nature reviews. Neuroscience*. 4(1): 13-25.
- Trapani, J.A., Jans, D.A., Jans, P.J., Smyth, M.J., Browne, K.A. & Sutton, V.R.** 1998. Efficient nuclear targeting of granzyme B and the nuclear consequences of apoptosis induced by granzyme B and perforin are caspase-dependent, but cell death is caspase-independent. *The Journal of biological chemistry*. 273(43): 27934-27938.
- Trapani, J.A. & Smyth, M.J.** 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology*. 2(10): 735-747.
- Van Parijs, L. & Abbas, A.K.** 1996. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Current Opinion in Immunology*. 8(3): 355-361.
- Vang, T., Torgersen, K.M., Sundvold, V., Saxena, M., Levy, F.O., Skålhegg, B.S., ... Taskén, K.** 2001. Activation of the COOH-terminal Src kinase (Csk) by cAMP-dependent protein kinase inhibits signaling through the T cell receptor. *The Journal of experimental medicine*. 193(4): 497-507.



- Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V. & Boldin, M.P.** 1999. TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR AND Fas SIGNALING MECHANISMS. *Annual Review of Immunology*. 17(1): 331-367.
- Watanabe, Y., Nakayama, T., Nagakubo, D., Hieshima, K., Jin, Z., Katou, F., ... Yoshie, O.** 2006. Dopamine selectively induces migration and homing of naive CD8<sup>+</sup> T cells via dopamine receptor D3. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 176(2): 848-856.
- Weihe, E., Depboylu, C., Schütz, B., Schäfer, M.K.-H. & Eiden, L.E.** 2006. Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression. *Cellular and molecular neurobiology*. 26(4-6): 659-678.
- Williams, M.A. & Bevan, M.J.** 2007. Effector and Memory CTL Differentiation. *Annual Review of Immunology*. 25(1): 171-192.
- Wise, R.A.** 2008. Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. *Neurotoxicity research*. 14(2-3): 169-183.
- Wong, P. & Pamer, E.G.** 2003. CD8 T CELL RESPONSES TO INFECTIOUS PATHOGENS. *Annual Review of Immunology*. 21(1): 29-70.
- Wrona, D.** 2006. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *Journal of neuroimmunology*. 172(1-2): 38-58.
- Yang, Y., Wang, H., Yu, H., Yeap, B.Y., Liang, T., Wang, G., ... Yang, Y.-G.** 2011. IFN- $\gamma$  promotes graft-versus-leukemia effects without directly interacting with leukemia cells in mice after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 118(13): 3721-3724.
- Ye, Z., Tang, C., Xu, S., Zhang, B., Zhang, X., Moyana, T., ... Xiang, J.** 2007. Type 1 CD8<sup>+</sup> T cells are superior to type 2 CD8<sup>+</sup> T cells in tumor immunotherapy due to their efficient cytotoxicity, prolonged survival and type 1 immune modulation. *Cellular & molecular immunology*. 4(4): 277-285.
- Yoshida, K., Sakamoto, A., Yamashita, K., Arguni, E., Horigome, S., Arima, M., ... Tokuhisa, T.** 2006. Bcl6 controls granzyme B expression in effector CD8<sup>+</sup> T cells. *European journal of immunology*. 36(12): 3146-3156.
- Zhang, X., Gordon, J.R. & Xiang, J.** 2002. Advances in Dendritic Cell-Based Vaccine of Cancer. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. 17(6): 601-619.
- Zhu, Y., Ju, S., Chen, E., Dai, S., Li, C., Morel, P., ... Lu, B.** 2010. T-bet and eomesodermin are required for T cell-mediated antitumor immune responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 185(6): 3174-3183.