

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



**PAPEL DEL RECEPTOR DE DOPAMINA D3 EXPRESADO EN LINFOCITOS T CD8⁺
EN LA INDUCCION DE RESPUESTA CITOTOXICA.**

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.

GLENDIA JEZABEL FUENTEALBA LABRIN

TEMUCO – CHILE
2012

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



**PAPEL DEL RECEPTOR DE DOPAMINA D3 EXPRESADO EN LINFOCITOS T CD8⁺
EN LA INDUCCION DE RESPUESTA CITOTOXICA.**

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.

GLENDIA JEZABEL FUENTEALBA LABRIN

PROFESOR GUIA: DR. RODRIGO ANDRES PACHECO RIVERA

TEMUCO – CHILE
2012

**PAPEL DEL RECEPTOR DE DOPAMINA D3 EXPRESADO EN LINFOCITOS T CD8⁺
EN LA INDUCCION DE RESPUESTA CITOTOXICA.**

PROFESOR GUIA:

Dr. Rodrigo Pacheco Rivera
Jefe del Laboratorio de Neuroinmunología
Fundación Ciencia y Vida

PROFESORES CONSEJEROS:

Dra. Priscilla Brebi Mievile
Laboratorio de Patología Molecular
Universidad de La Frontera

CALIFICACION PROMEDIO TESIS:

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres Alicia y Alberto, por su esfuerzo y entrega durante toda mi vida, por estar junto a mí en cada nueva aventura, por incentivar y guiarme en mis estudios, pero por sobre todo por amarme y acompañarme incondicionalmente.

Un simple gracias nunca será suficiente porque mis logros y avances son totalmente suyos, resultado de sus enseñanzas, siendo mis dos ejemplos a seguir y los pilares de todo lo que soy y llegaré a ser.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a cada una de las personas que participaron en el desarrollo de esta tesis, apoyándome en el ámbito profesional como en lo personal, por los conocimientos compartidos y por sobretodo el afecto entregado haciendo más amena esta la última etapa de mi carrera.

Agradezco el gran apoyo del Dr. Rodrigo Pacheco, por recibirme en su laboratorio y poner a mi disposición todas las facilidades para desarrollar mi investigación, por cada una de las correcciones realizadas las cuales concretan este año de trabajo. A la Dra. Priscilla Brebi por su apoyo y disponibilidad, por guiarme no sólo en lo relacionado a la tesis sino también en mis aspiraciones futuras, por mostrar siempre su disponibilidad de ayudarme en lo que fuese.

A mi familia, padres, hermanos y sobrinos, por el apoyo en todos mis años de estudio, por crear un ambiente lleno de amor y preocupación. A Bastián mi hermoso sobrino quien ha sido mi refugio de afecto. Gracias a la familia Rebolledo Labrin y Anjari Labrin por hacerme sentir una hija más, recibíendome con todo su cariño con comidas ricas y con un hogar donde me sentí muy querida.

A mis compañeros de laboratorio por su disposición a enseñarme, la paciencia y la alegría, que me ayudaron a desarrollarme y crecer como profesional. Por los momentos compartidos que hicieron más ameno mi día a día. Gracias a cada uno de los integrantes del laboratorio de Neuroinmunología y UPR de la fundación Ciencia & Vida.

A mis amigas Marcela y Daniela, por esas tardes de estudio y momentos de entretención, tantas horas entre clases y trabajos en grupo donde compartimos conocimientos y amistad. Gracias de forma muy especial a María Paz por alegrar mi estadía en Santiago por esos momentos de relajación y también por hacerme olvidar el estrés, gracias infinitas por la preocupación.

A mi amado compañero de vida Celso por apoyarme en mis decisiones y darme ánimo en esos días en que las cosas no eran tan fáciles, por escucharme día a día a kilómetros de distancia, pero siempre con el mismo cariño.

Con mucho afecto quiero agradecer de forma muy especial a Francisco Contreras, por ser mi guía durante todo este año, por las infinitas enseñanzas y el tiempo dedicado. Gracias por su disposición, pues me he sentido respaldada y acompañada en este proceso.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	14
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 EL SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO.	16
2.1.1 El papel de las células T en la respuesta inmune adaptativa.....	17
2.2 ACTIVACIÓN Y ESPECIALIZACIÓN DE LINFOCITOS T CD8⁺.....	18
2.2.1 Factores de transcripción maestros del fenotipo Tc1.....	22
2.2.2 Mecanismos efectores para mediar la muerte de células blanco.	23
2.2.3 IFN- γ , una citoquina esencial en la respuesta de linfocitos Tc1.....	24
2.2.4 Granzimas y perforinas en la lisis mediada por linfocitos Tc1.....	25
2.3 EL EMERGENTE ROL DE NEUROTRANSMISORES EN LA REGULACIÓN DE CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE.....	26
2.3.1 Los receptores de dopamina.....	29
2.3.2 Receptores de dopamina expresados en linfocitos.	30
3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	32
3.1 HIPÓTESIS	33
3.2 OBJETIVO GENERAL.....	33
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4. METODOLOGÍA.....	34
4.1 ANIMALES.	34
4.2 PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS T CD8⁺.	34
4.4 EXTRACCIÓN DE ARN Y RT-PCR.	36
4.5 RT-PCR EN TIEMPO REAL.....	37
4.6 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS Y MOLÉCULAS CITOTÓXICAS MEDIANTE .	38
CITOMETRÍA DE FLUJO.	38
4.7 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD <i>IN VIVO</i>.....	38
4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	40
5. RESULTADOS	41
5.1 LA POLARIZACIÓN A FENOTIPO Tc1 INDUCE LA EXPRESIÓN DEL D3R EN LINFOCITOS T CD8⁺.....	41
5.2 LINFOCITOS T CD8⁺ EXPRESAN COMPONENTES QUE PERMITEN TRANSPORTAR, ALMACENAR Y DEGRADAR DOPAMINA.	43
5.3 LA EXPRESIÓN DEL D3R EN LINFOCITOS T CD8⁺ TOTALES FAVORECE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DEL FENOTIPO Tc1 IN VITRO.....	45
5.4 LA EXPRESIÓN DEL D3R EN LINFOCITOS T CD8⁺ VÍRGENES FAVORECE LA POLARIZACIÓN A FENOTIPO Tc1 IN VITRO.	52
5.5 LA EXPRESIÓN DEL D3R EN LINFOCITOS T CD8⁺ VÍRGENES FAVORECE LA ADQUISICIÓN DE FENOTIPO Tc1 Y EL DESARROLLO DE CITOTOXICIDAD IN VIVO.	56

6. DISCUSION	60
7. CONCLUSIONES	66
8. LITERATURA CITADA.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8 ⁺	21
Figura 2. Interacción neuroinmune.....	28
Figura 3. La diferenciación de linfocitos T CD8 ⁺ hacia el fenotipo Tc1 induce la expresión del D3R.....	42
Figura 4. Expresión de componentes del sistema dopaminérgico en linfocitos T CD8 ⁺ durante la diferenciación hacia el fenotipo Tc1	44
Figura 5. La expresión del D3R en linfocitos T CD8 ⁺ totales favorece la expresión de genes característicos del fenotipo Tc1 <i>in vitro</i>	46
Figura 6. La expresión del D3R favorece la función efectora basal del fenotipo Tc1 en linfocitos T CD8 ⁺ totales aislados de bazo.	48
Figura 7. La expresión del D3R no afecta la producción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8 ⁺ de memoria y efectores.	51
Figura 8. Linfocitos T CD8 ⁺ vírgenes deficientes en el D3R tienen menor capacidad de diferenciar hacia el fenotipo Tc1 <i>in vitro</i>	53
Figura 9. La expresión del D3R en linfocitos T CD8 ⁺ vírgenes favorece la adquisición del fenotipo Tc1 <i>in vitro</i>	55
Figura 10. Linfocitos T CD8 ⁺ vírgenes deficientes en el D3R tienen menor capacidad de adquirir el fenotipo funcional Tc1 <i>in vivo</i>	58

ABREVIACIONES

AADC= Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos

ACh= Acetilcolina

AChRs= Receptor de acetilcolina

Ag= Antígeno

APC= Célula presentadora de antígeno

cAMP= Adenosin monofosfato cíclico

β 2 microglobulina= β 2m

CFA= Adyuvante completo de Freund

COMT= Catel-o- metil transferasa

DA= Dopamina

DAT= Transportador de dopamina

DARs= Receptor de dopamina

D β H= Dopamina β hidroxilasa

DC= Célula dendrítica

D3RKO= Deficientes en D3R

Eomes= Eomesodermin

ERKs= Extracellular Regulated Kinase

Fas L= Fas ligando

FBS= Suero fetal bovino

Glu= Glutamato

GluR= Receptor de glutamato

5-HT= Serotonina

5-HTR= Receptor de serotonina

HVA= Acido homovalínico

IFN- γ = Interferon- γ

JNKs= c-Jun Kinase

IL-2= Interleuquina 2

IL-4= Interleuquina 4

IL10= Interleuquina 10
IL-17= Interleuquina 17
LAMP-1= Proteína de membrana asociada al lisosoma
MHC= Complejo mayor de histocompatibilidad
pMHC= Complejo péptido-MHC
MAO= Monoamina oxidasa
MAPKs= Mitogen-activated protein kinase
MFI= Intensidad de fluorescencia media
NE= Norepinefrina
NE/ER= Receptor de norepinefrina/epinefrina
NET= Transportador de norepinefrina
NK= Célula asesina natural
OVA= Ovoalbúmina
SERT= Transportador de serotonina
SNC= Sistema nervioso central
Tbet= T cell specific T-box transcription factor
TCR= Receptor de célula T
Tc1= Linfocito T citotóxico tipo 1
Tc17= Linfocito T citotóxico tipo 17
Tc2= Linfocito T citotóxico tipo 2
TH= Tirosina hidroxilasa
TNF- α = Factor de necrosis tumoral
Treg= Linfocito T regulador
Tyr= L- Tirosina
VMAT= Transportador vesicular de monoaminas
WT= Normal

RESUMEN

La respuesta mediada por linfocitos T CD8⁺ se encuentra especializada en la eliminación tanto de patógenos intracelulares como de tumores. Para esto, los linfocitos T CD8⁺ vírgenes diferencian hacia un fenotipo efector, denominado Tc1, el cual mediante la secreción de moléculas citotóxicas e IFN- γ , promueve la muerte de células infectadas o malignas y estimulan la función de macrófagos y células NK.

En las últimas dos décadas un gran número de estudios han demostrado que diferentes células del sistema inmune tienen la capacidad de sintetizar y liberar neurotransmisores, así como también expresan receptores para estas moléculas, las cuales pueden regular la respuesta inmune. En este sentido, el neurotransmisor dopamina (DA) representa un potencial modulador de la respuesta inmune, ya que los niveles plasmáticos de DA se encuentran alterados en patologías inmunes. Por otra parte, existe un desbalance en la expresión de los receptores de DA (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. De entre los cinco DARs descritos a la fecha, este trabajo se centra en el receptor 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- γ como la migración de linfocitos T CD8⁺.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar si el D3R es relevante para los procesos de diferenciación y respuesta citotóxica de linfocitos T CD8⁺ vírgenes, mediante aproximaciones genéticas. Los resultados obtenidos muestran una atenuación de la capacidad de adquirir el fenotipo Tc1 en células carentes del D3R tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*. Además, la ausencia de D3R en linfocitos T CD8⁺ perjudica la adquisición de capacidad citotóxica por estas células. Estos descubrimientos indican que D3R regula funciones claves de los linfocitos T CD8⁺ y sugieren una importante contribución de la regulación neuro-inmune en patologías que involucran la respuesta de células T CD8⁺, tales como cáncer e infecciones virales.

SUMMARY

CD8⁺ T-cell mediated immune response is specialized in the elimination of both, intracellular pathogens and tumor cells. For this purpose, naïve CD8⁺ T-cells differentiate into an effector phenotype denominated Tc1, which by secreting cytotoxic molecules and IFN- γ consequently kill infected or malignant cells and stimulate macrophages and NK cells functions.

In the last two decades numerous studies have demonstrated that some immune cells have the ability to synthesize and release neurotransmitters, and some immune cells also express receptors for this kind of molecules, thus suggesting that neurotransmitters can modulate the immune response. Since dopamine (DA) plasma levels are altered in some immune-related disorders, DA becomes a potential modulator of the immune response. Furthermore, several studies have shown altered expression of DA receptors (DARs) on T-cells from patients with immune and neurological diseases, suggesting that dopaminergic regulation of the immune response plays an important role in these pathologies. Because among the five DARs described to date, D3 receptor (D3R) displays the highest affinity for DA and because pharmacological evidence suggests that D3R is capable to modulate IFN- γ production and migration of CD8⁺ T-cell, this work focuses in D3R.

This study aims to determine whether the D3R is relevant for processes of differentiation and cytotoxic response of naïve CD8⁺ T-cells using genetic approaches. Results show that absence of D3R in CD8⁺ T-cells results in decreased capability to acquire the Tc1 phenotype in both, *in vitro* as well as *in vivo* systems. Furthermore, lack of D3R impairs acquisition of cytotoxic function by CD8⁺ T-cells. These findings indicate that D3R regulates key functions of CD8⁺ T-cells, suggesting an important contribution of neuro-immune regulation in pathologies involving CD8⁺ T-cells-mediated response, such as cancer and viral infections.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es un sistema de defensa de múltiples funciones que evolucionó para proteger a los animales frente a la invasión por patógenos y el desarrollo de cáncer. Este sistema se puede subdividir en inmunidad innata y adaptativa. Mientras el componente innato representa una primera barrera de defensa inmediata, la inmunidad adaptativa requiere de mayor tiempo para el desarrollo de una respuesta altamente específica y tiene la característica de generar memoria frente a posteriores desafíos. La gran especificidad y diversidad de la respuesta adaptativa está dada por la generación de una enorme variedad de receptores de membrana por parte de linfocitos T y B. Mientras los linfocitos B se caracterizan por reconocer antígenos de manera soluble y posteriormente secretar dichos receptores en forma de inmunoglobulinas, los linfocitos T requieren de la presentación de fragmentos de antígenos en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*, MHC). Dependiendo del correceptor que expresen los linfocitos T, se reconocen dos poblaciones: linfocitos T CD4⁺, que reconocen péptidos cargados en moléculas MHC de clase II, y linfocitos T CD8⁺, capaces de responder a complejos formados por antígenos y moléculas MHC clase I. La primera población es capaz de orquestrar una respuesta adaptativa acorde al tipo de amenaza encontrada. Por otra parte, los linfocitos T CD8⁺ se especializan en la eliminación de células malignas o infectadas por patógenos intracelulares.

La activación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes ocurre ante la estimulación del receptor de la célula T (*T cell antigen receptor*, TCR) por el complejo antígeno-MHC clase I y la co-estimulación de receptores especializados, tales como CD28, por parte de células presentadoras de antígenos (*Antigen presenting cells*, APCs), lo que resulta en la expansión del clon. La producción de citoquinas como interleuquina 12 (IL-12) por APCs induce la diferenciación hacia un fenotipo efector citotóxico (Tc1), caracterizado por la expresión de los factores de transcripción Tbet (*T cell-specific T-box transcription factor*) y Eomes (*Eomesodermin*). Tbet es un factor de transcripción maestro que regula la expresión de citoquinas y moléculas efectoras de células, T CD8⁺, tal como interferon- γ (IFN- γ). Por su parte, Eomes es un factor de transcripción

altamente homólogo a Tbet, expresado particularmente en células T CD8⁺ activadas y que conduce a la expresión tanto de citoquinas antivirales, como IFN- γ y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), así como de moléculas citotóxicas, como perforinas y granzimas. La expresión de estas moléculas efectoras permite la eficiente eliminación tanto de células infectadas como malignas por parte de los linfocitos T CD8⁺ efectores. Considerando el papel central que cumplen los linfocitos T CD8⁺ en la defensa del organismo frente a estas amenazas, los procesos de activación y diferenciación de estas células requieren de una fina regulación.

En las últimas dos décadas, un amplio número de trabajos ha demostrado que el sistema nervioso tiene la capacidad de interactuar con el sistema inmune, a través de la síntesis y liberación de neurotransmisores que pueden regular la diferenciación y función, tanto de células de la inmunidad innata como de la inmunidad adquirida. Diversas evidencias sugieren al neurotransmisor DA como un potencial regulador inmune. Con respecto a esto, un número creciente de estudios han mostrado que los niveles plasmáticos de DA presentan alteraciones en patologías inmunes, encontrándose estos disminuidos en autoinmidades y aumentados en cáncer. Por otra parte, existe un desbalance en la expresión de 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. De entre los cinco DARs descritos a la fecha, el D3R es el que presenta mayor afinidad por DA y el que ha sido asociado con la modulación de la función de linfocitos T CD8⁺. En este sentido, se ha encontrado que el D3R es expresado en linfocitos T CD8⁺ obtenidos de humano y ratón (Watanabe et al., 2006). Adicionalmente, la estimulación farmacológica del D3R en células T CD8⁺ se ha asociado tanto con la secreción de IFN- γ (Ilani et al., 2004) como con la capacidad de migrar hacia nódulos linfáticos (Watanabe et al., 2006). Considerando estos antecedentes, en este trabajo se pretende evaluar mediante herramientas genéticas si la expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺ contribuye a la adquisición de un fenotipo efector y favorece la respuesta citotóxica de estas células.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El sistema inmune adaptativo.

El sistema inmune tiene la extraordinaria tarea de reconocer y eliminar un enorme número de moléculas (antígenos) que podrían ser potencialmente dañinas para el organismo. Una característica clave del sistema inmune es que este debe distinguir entre las moléculas derivadas de organismos extraños y aquellas que provienen del propio organismo (antígenos propios). Por lo tanto, el reconocimiento de antígenos extraños debe ser un proceso extremadamente específico y regulado para asegurar la destrucción del organismo extraño sin dañar excesivamente los tejidos propios.

El sistema inmune de vertebrados consiste en una inmunidad innata y otra adaptativa. El sistema inmune innato constituye la primera barrera de defensa ante organismos extraños, sin embargo este responde a una cantidad relativamente reducida de antígenos extraños. En contraste, el sistema inmune adaptativo ha evolucionado para responder a una extraordinaria variedad de antígenos extraños de manera extremadamente específica y así desarrollar mecanismos altamente eficaces para la eliminación del organismo invasor. Dos tipos principales de células del sistema inmune, los linfocitos T y B, son los responsables de las propiedades antígeno-específicas que posee el sistema inmune adaptativo. Estas células expresan receptores antígeno-específicos en sus superficies celulares, los cuales reconocen antígenos en diferentes formas y juegan papeles muy distintos durante las respuestas inmunes adaptativas. Las células B reconocen antígenos como moléculas solubles y, tras la estimulación antigénica, estas células tienen la capacidad de diferenciarse y secretar una forma soluble del receptor de las células B conocida como anticuerpo. Subsecuentemente, la unión específica del anticuerpo al antígeno puede promover una variedad de mecanismos efectores del sistema inmune para mediar la eliminación del antígeno capturado. Por otro lado, las células T no responden a antígenos solubles y por ende necesitan un sistema molecular especializado para la presentación y reconocimiento del antígeno. Tal sistema requiere de la degradación intracelular del antígeno a pequeños péptidos por las APC (Banchereau et al., 2000, Lanzavecchia and Sallusto, 2001,

Masson et al., 2008). Los fragmentos peptídicos se asocian intracelularmente con las moléculas del MHC y posteriormente son transportados a la superficie de las APC. Este complejo formado por el péptido antigénico unido a las moléculas de MHC (pMHC) en la membrana plasmática de las APC, es el ligando para el TCR. El reconocimiento específico de un pMHC por un TCR junto con las interacciones co-estimuladoras establecidas entre APC y células T (Jenkins and Johnson, 1993), promueven la activación y diferenciación de células T vírgenes a células T efectoras, las cuales dirigen el desarrollo de la respuesta inmune específica contra el patógeno (Korn et al., 2009).

2.1.1 El papel de las células T en la respuesta inmune adaptativa.

Generalmente, los antígenos contra los que son dirigidas las respuestas inmunes adaptativas son de naturaleza proteica. Para la iniciación de una respuesta inmune adaptativa contra un antígeno de esta naturaleza es necesaria la activación tanto de células T específicas como de células B específicas. Sin embargo, la activación de células T resulta central, ya que, una vez que estas células han sido activadas y se vuelven efectoras, estas expresan una serie de moléculas de superficie y secretan un patrón especializado de citoquinas los que en conjunto tienen la capacidad de estimular la activación de células B (Parker, 1993), además de promover la actividad de células fagocíticas (Denkers and Gazzinelli, 1998), promoviendo así la eliminación del patógeno invasor. Hasta ahora han sido descritos dos tipos principales de células T las cuales se diferencian fenotípicamente por la expresión del correceptor para el complejo pMHC en la superficie celular. El primer tipo son las células T $CD4^+$, las cuales reconocen el antígeno peptídico alojado sobre moléculas de MHC clase II. El segundo tipo son las células T $CD8^+$, que reconocen antígenos sobre moléculas de MHC clase I (Nouri-Shirazi et al., 2000). Mientras las células T $CD4^+$ son las células que controlan y regulan la activación tanto de células T $CD8^+$ como de linfocitos B, las células T $CD8^+$ promueven directamente la muerte de células infectadas o transformadas y también ejercen regulación y control sobre otras importantes células efectoras, tales como las células asesinas naturales (*Natural killer cell*, NK) o los macrófagos, durante la respuesta inmune (Nouri-Shirazi et al., 2000). Adicionalmente, existe una sub-población de células T $CD4^+$ llamadas T reguladoras (Tregs) que también son activadas normalmente en una

respuesta inmune adaptativa y cumplen la función de regular negativamente la función de células T efectoras (Nouri-Shirazi et al., 2000). En consecuencia, la exacerbación de la función de Tregs o la disfunción de células T CD8⁺ podrían permitir el desarrollo de tumores o susceptibilidad a infecciones por patógenos intracelulares como los virus.

2.2 Activación y especialización de linfocitos T CD8⁺.

La capacidad del organismo para combatir patógenos intracelulares o células tumorales requiere de una respuesta combinada entre el sistema inmune innato y adaptativo, que reconoce, responde y elimina estas células.

El desarrollo de los linfocitos T CD8⁺, se inicia con la migración de células precursoras desde la médula ósea al timo, lugar donde ocurre la selección positiva de aquellas células cuyo TCR reconoce péptidos propios en moléculas de MHC de clase I con una afinidad intermedia. Adicionalmente, ocurre la eliminación de aquellas células que reconocen estos mismo complejos con alta afinidad y que por tanto podrían reaccionar de manera dañina contra constituyentes propios (selección negativa) (Palmer, 2003). Una vez que egresan del timo como células T maduras, estas pueblan la circulación sanguínea y linfática, lo que permite que los linfocitos T maduros patrullen por los diferentes órganos linfoides secundarios del organismo, tales como bazo y nódulos linfáticos, en busca de antígenos presentados por APCs que migran hacia estos órganos. Los linfocitos T CD8⁺ maduros se pueden subdividir en tres poblaciones generales, las células vírgenes, de memoria y efectoras. Como su nombre lo señala, las células vírgenes no han experimentado reconocimiento antigénico. En el contexto de inflamación o infección, el reconocimiento de pMHC presentados por APCs promueve eventos de fosforilación, aumenta los niveles de Ca⁺² y genera una cascada de señales que estimulan a las células T CD8⁺ vírgenes a proliferar y diferenciarse (Figura 1) (Monks et al., 1998, Dustin and Shaw, 1999, Grakoui et al., 1999). Posteriormente, ocurre el desarrollo de otras dos poblaciones denominadas células efectoras, que tienen una vida media corta y células de memoria, que presentan una vida media mayor y que a su vez pueden responder mucho más rápido frente a un reencuentro con el

antígeno, proliferando y diferenciándose en células efectoras, siendo más eficientes en la eliminación del patógeno (Williams and Bevan, 2007, Harty and Badovinac, 2008).

Los linfocitos T CD8⁺ vírgenes, efectores y de memoria son tres poblaciones que difieren en fenotipo, función, vida media y potencial de proliferación. Adicionalmente, estas poblaciones se pueden definir fenotípicamente en base a la expresión de marcadores de superficie tales como CD62L (L-selectina) y CD44. CD62L es una molécula que tiene relación con la migración de linfocitos T hacia órganos linfoides secundarios. Así, mientras los linfocitos T vírgenes expresan altos niveles de CD62L en su superficie para poder recircular a través de órganos linfoides en búsqueda de sus antígenos, los linfocitos T activados experimentan una rápida baja en la expresión de esta molécula, correlacionándose con una pérdida de la capacidad de entrar en los nódulos linfáticos (Hamann et al., 1997, Sallusto et al., 1999, Hamann et al., 2000). La expresión de CD62L vuelve a disminuir en la mayoría de las células T de memoria (células de memoria central), aunque permanece elevada en un pequeño subconjunto de células de memoria (células de memoria efectora) (Masopust et al., 2001, Huster et al., 2004, Reiner et al., 2007). Por otro lado, la expresión de CD44, una glicoproteína de membrana involucrada en la migración de linfocitos hacia el sitio de la infección, incrementa en la superficie de linfocitos T como consecuencia de la activación celular y permanece elevada en células T de memoria (Lesley et al., 1993). Es así como estas moléculas en conjunto son comúnmente utilizadas para identificar los diferentes tipos de linfocitos T, ya sean células vírgenes, efectoras o de memoria (Mackay, 1993).

Antígenos extraños y propios inducen la activación y respuesta por parte de los linfocitos T CD8⁺ y la subsecuente formación de memoria. Por ejemplo, células T CD8⁺ efectoras específicas para un patógeno alcanzan su número máximo a los 6-8 días del encuentro con el antígeno (Kaech et al., 2002b). Una vez eliminado el patógeno la mayoría de las células efectoras muere y solo unas pocas sobreviven para formar una población de memoria que tiene un periodo de vida mucho más prolongado (Harty and Badovinac, 2002, Kaech et al., 2002b). Estos

linfocitos de memoria tienen la función de conferir una rápida protección antígeno-específica contra patógenos que ya han invadido el organismo con anterioridad.

La adquisición de funciones efectoras es crítica para el control de patógenos intracelulares y tumores, y se caracteriza por la producción de moléculas citotóxicas, como perforinas y granzimas, así como la producción de dos citoquinas principales, IFN- γ y TNF- α (Glimcher et al., 2004, Williams and Bevan, 2007, Rutishauser and Kaech, 2010). Por una parte, IFN- γ es capaz de activar células efectoras como macrófagos y neutrófilos, potenciar la función de NK, de regular la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ hacia el fenotipo Th1, así como también de suprimir metabólicamente células infectadas o transformadas (Billiau, 1996). Por otro lado, TNF- α es una citoquina proinflamatoria que tiene como función inhibir la expresión y replicación de genes virales, pudiendo también iniciar la vía de apoptosis en células infectadas o tumorales (Wallach et al., 1999). Adicionalmente, en base a las citoquinas que estos secretan y su capacidad citotóxica, los linfocitos T CD8⁺ efectores se pueden subdividir en tres subtipos denominados Tc1, Tc2 y Tc17. Los linfocitos Tc1 (Fong and Mosmann, 1990, Croft et al., 1994, Sad et al., 1995, Kemp and Ronchese, 2001, Dobrzanski et al., 2006, Ye et al., 2007) producen IFN- γ y poseen gran capacidad citotóxica, los tipo 2 (Tc2) (Croft et al., 1994, Helmich and Dutton, 2001, Dobrzanski et al., 2004a, Dobrzanski et al., 2004b) , tienen baja capacidad citotóxica y producen IL-4 e IL-10 y por último el fenotipo efector más recientemente descrito es el Tc17, que produce IL-17 y posee baja capacidad citotóxica (Hamada et al., 2009, Kondo et al., 2009, Garcia-Hernandez Mde et al., 2010).

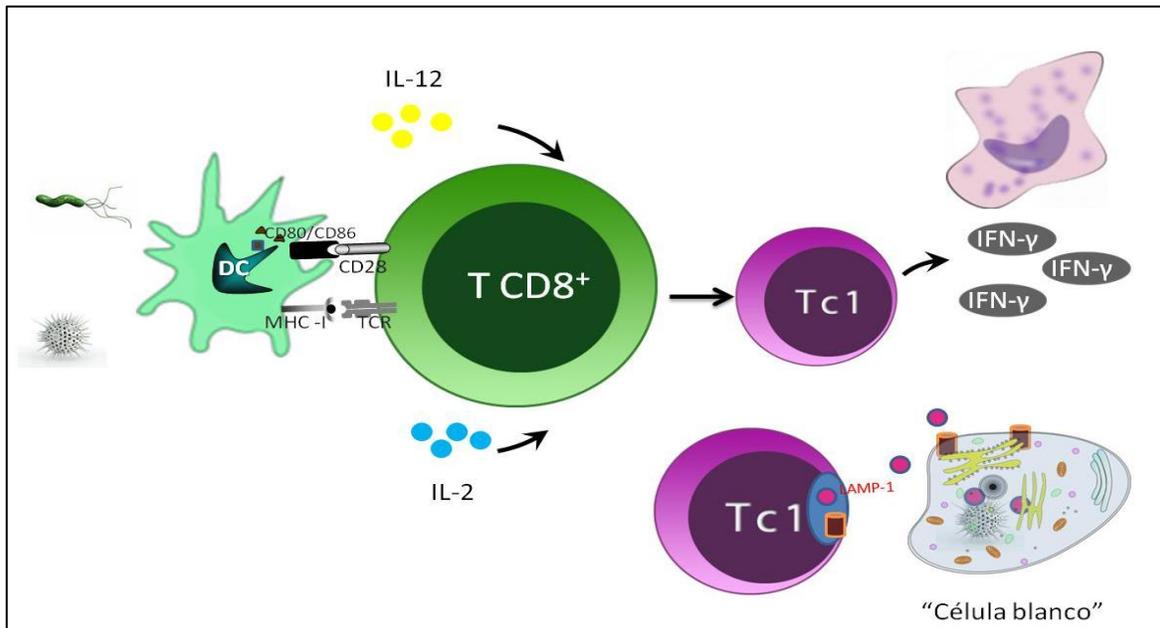


Figura 1. Respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8⁺. Linfocitos T CD8⁺ al reconocer un antígeno presentado por una APC en presencia de citoquinas como IL-2 e IL-12, inicia un programa de diferenciación que capacita a estos linfocitos para ser uno de los actores relevantes en la respuesta citotóxica, la cual es altamente efectiva contra patógenos intracelulares y células tumorales.

La transición de células T CD8⁺ vírgenes a efectoras requiere de cambios en la expresión de genes específicos (Kaech et al., 2002a), lo cual está mediado por la expresión de factores de transcripción (Glimcher et al., 2004). Así, el factor de transcripción Tbet (Sullivan et al., 2003) y Eomes (Pearce et al., 2003) son los reguladores mas descritos en el proceso de polarización de células Tc1 (Pearce et al., 2003, Intlekofer et al., 2005). Por su parte, los linfocitos Tc2 se encuentran regulados por la expresión del factor de transcripción GATA3, mientras que los linfocitos Tc17 por RORγt (Garcia-Hernandez Mde et al., 2010).

2.2.1 Factores de transcripción maestros del fenotipo Tc1.

Como se ha señalado, la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8⁺ requiere de la producción de moléculas citotóxicas y citoquinas, las cuales son posteriormente secretadas por estas células y provocan la muerte de células blanco. Este mecanismo se regula a nivel transcripcional y, en particular para el fenotipo Tc1, se han descrito dos factores de transcripción maestros específicos denominados Tbet y Eomes, los cuales además inhiben la adquisición de fenotipos alternativos como Tc2 y Tc17 (Zhu et al., 2010). Estos factores de transcripción actúan de forma cooperativa y redundante en la generación del fenotipo, por inducción de la expresión de IFN- γ , perforina y granzima (Intlekofer et al., 2005, Joshi et al., 2007, Banerjee et al., 2010).

El factor de transcripción Tbet se encuentra altamente expresado en células inmunes como Th1, Tc1 y NK, siendo crítico en la función efectora de células Th1 y NK, pero solo es parcialmente requerido por linfocitos T CD8⁺ Tc1 (Zhu et al., 2010). Las células T CD4⁺ y NK de ratones deficientes en Tbet son afectadas en su habilidad para expresar IFN- γ , no obstante los linfocitos T CD8⁺ de estos ratones presentan una inducción normal de IFN- γ y de función citotóxica (Szabo et al., 2002). Es así como en células T CD8⁺, Tbet no es esencial (Sullivan et al., 2003) debido a la expresión de Eomes, el cual puede programar la expresión de IFN- γ solo o en cooperación con Tbet (Pearce et al., 2003). Por otra parte, y en contraste con lo que ocurre con Tbet, Eomes se expresa fuertemente en linfocitos T CD8⁺ y de manera muy débil en linfocitos T CD4⁺ (Pearce et al., 2003).

Eomes es un factor de transcripción de la caja T homólogo a Tbet que es clave en el desarrollo de los vertebrados (Ryan et al., 1996), y adicionalmente tiene un rol en la diferenciación del trofoblasto en mamíferos, por ende ratones deficientes en Eomes mueren cuando aun son embriones (Russ et al., 2000). Además, y de manera importante, este factor de transcripción es necesario y suficiente para la inducción de la expresión de moléculas citotóxicas induciendo la expresión de IFN- γ , perforina y granzima (Pearce et al., 2003).

2.2.2 Mecanismos efectores para mediar la muerte de células blanco.

La activación eficiente de linfocitos T CD8⁺ en presencia de IL-12 conduce al desarrollo de Tc1 los cuales presentan varios mecanismos efectores para eliminar a las células blanco (Figura 1). Estas células adquieren la capacidad de lisar células blanco a través de la liberación de moléculas citotóxicas, tales como perforinas y granzimas (Heusel et al., 1994, Kagi et al., 1994), además de citoquinas moduladoras como IFN- γ , que aumenta la función efectora de otras células inmunes, incluyendo células dendríticas (DCs), macrófagos y NK (Schoenborn and Wilson, 2007), jugando un papel clave en la amplificación de la respuesta inmune innata y adaptativa.

Las células T CD8⁺ pueden inducir directamente la lisis de las células blanco por dos vías, ambas activadas en respuesta a señales desencadenadas por la estimulación del TCR (Henkart and Sitkovsky, 1994). Una de estas vías involucra el aumento de factores citotóxicos solubles como perforina y granzima, los cuales son almacenados en vesículas intracelulares (Kagi et al., 1996, Trapani et al., 2000). Estas moléculas aumentan rápidamente tras la estimulación del TCR de linfocitos T CD8⁺ y, una vez secretadas sobre la célula blanco, conducen a la perforación de la membrana y la activación de caspasas en la célula blanco, resultando en su eventual lisis. La otra vía involucrada en la lisis celular es la unión entre la molécula FAS ligando (FASL) expresada en la superficie de la célula T CD8⁺ con la molécula FAS en la célula blanco. Esta interacción intercelular conduce a la oligomerización de receptores de muerte en la célula blanco, lo que desencadena señales que inician apoptosis dependiente de caspasas (Berke, 1995, Nagata and Golstein, 1995). Esta vía que involucra la interacción FAS-FASL no solo está asociada a eliminación de células tumorales o infectadas, sino también en eliminar células linfoides autorreactivas (Trapani and Smyth, 2002). Tanto los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos como las células NK utilizan mecanismos similares para lisar células, los cuales incluyen un incremento en la expresión de moléculas citotóxicas y la polarización de éstas, las cuales se encuentran almacenadas en vesículas que se fusionan con la membrana celular dejando expuestas moléculas como la proteína de membrana asociada al lisosoma (LAMP-1) la cual además se utiliza como marcador de degranulación (Figura 1). A diferencia de las células NK, que presentan actividad citotóxica constitutiva, las células T CD8⁺ vírgenes requieren de 5 a 8 días después del encuentro

con el antígeno para adquirir capacidad citotóxica, proliferar y migrar al tejido afectado (de Saint Basile et al., 2010).

2.2.3 IFN- γ , una citoquina esencial en la respuesta de linfocitos Tc1.

La unión del TCR con el complejo pMHC resulta también en una abundante secreción de IFN- γ por linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ del fenotipo Th1 (Boehm et al., 1997), una citoquina que exhibe una amplia gama de actividades proinflamatorias, contribuyendo fuertemente al desarrollo de la respuesta inmune contra patógenos intracelulares y tumores. El importante papel de IFN- γ en este tipo de respuestas inmunes se debe a diversas funciones que ejerce sobre diferentes tipos de células del sistema inmune y sobre las células blanco. Por una parte amplifica la función de las APCs mediante la estimulación de la fagocitosis, regulando positivamente moléculas MHC clase I y clase II (Boehm et al., 1997), también y como se ha señalado promueve la diferenciación de células T CD4⁺ hacia el fenotipo Th1 (O'Garra and Arai, 2000, Szabo et al., 2003, Schulz et al., 2009) las cuales median respuestas contra patógenos intracelulares y por último estimula la función de NK (Schoenborn and Wilson, 2007).

Experimentos desarrollados con ratones que carecen de IFN- γ o el receptor para este, ilustran la gran importancia de esta citoquina en la inmunidad protectora contra tumores y patógenos intracelulares. Con respecto a esto, dichos ratones muestran una susceptibilidad exacerbada a sufrir infecciones por diversos patógenos incluyendo virus, tales como influenza, coriomeningitis linfocítica (Russell and Ley, 2002) y también bacterias intracelulares como *Listeria monocytogenes* y *Mycobacteria tuberculosis* (Cooper et al., 1993, Mogue et al., 2001, Shtrichman and Samuel, 2001). Además, se ha visto que la carencia de IFN- γ o de su receptor resultan en un crecimiento tumoral acelerado y un gran aumento en la mortalidad en modelos murinos de tumor ocular (Coursey et al., 2011), leucemia (Yang et al., 2011), cáncer de mama (Pulaski et al., 2002) pulmón y colon (Qin et al., 2003), entre otros. Así, todas estas evidencias muestran el papel crucial que IFN- γ y su receptor juegan en la respuesta inmune antitumoral y contra patógenos intracelulares.

2.2.4 Granzimas y perforinas en la lisis mediada por linfocitos Tc1.

Los gránulos líticos se encuentran en organelos híbridos que están especializados en la secreción de estas moléculas efectoras. Estos han sido denominados lisosomas secretores o lisosomas relacionados con organelos, ya que además de almacenar las proteínas citotóxicas antes de su secreción operan como lisosomas convencionales (esto quiere decir que degradan proteínas y otras moléculas) (Blott and Griffiths, 2002). Ante el reconocimiento de una célula blanco por parte de linfocitos efectoras Tc1 ocurre la polarización de gránulos citotóxicos que contienen perforinas y granzimas hacia la orientación de la célula blanco y posterior secreción del contenido lítico sobre dicha célula.

La molécula perforina, mediante la formación de poros en la membrana plasmática de la célula blanco, cumple un papel crucial en este proceso citotóxico, puesto que, por una parte genera directamente muerte celular por lisis osmótica y por otra, permite el acceso de granzimas (Voskoboinik et al., 2006) las cuales desencadenan apoptosis dependiente de caspasas (Sarin et al., 1997, Trapani et al., 1998). La importancia de la actividad citotóxica dependiente de perforina ha sido demostrada en la inmunidad contra cáncer mediante la utilización de ratones deficientes en perforina (Bolitho et al., 2009). Lo anterior también se puede extender a humanos, dado que un estudio reciente muestra que pacientes con mutaciones en el gen que codifica para perforina tienen una mayor frecuencia de linfomas que los controles (Chia et al., 2009).

Las granzimas, son una familia de serín-proteasas que se encuentra principalmente en gránulos citoplasmáticos de células T citotóxicas y células NK. La entrada en la célula activa caspasas intracelulares que conducen a la apoptosis de la célula blanco. Se han descrito tres subtipos de granzimas (según el grupo de substratos que reconocen) que son expresadas en Tc1 y NK de humanos y ratón (Kaiserman et al., 2006). Aunque es sabido que granzima B y probablemente granzima A (Martinvalet et al., 2008) tienen un rol en la inducción de apoptosis en la célula blanco, la función de otras granzimas en este proceso es menos conocido (Pardo et al., 2009).

2.3 El emergente rol de neurotransmisores en la regulación de células del sistema inmune.

Clásicamente se ha visto que la importante función de células T y células B así como la de DC, macrófagos y células NK, entre otras, se encuentra regulada por una serie de interacciones intercelulares entre diferentes tipos de células del sistema inmune así como mediadores proteicos llamados citoquinas. Sin embargo, durante los últimos años han surgido diferentes estudios que indican que estas células del sistema inmune también pueden ser reguladas por neurotransmisores (Figura 2) (Franco et al., 2007). Respecto a esto, se ha descrito que una serie de receptores para neurotransmisores clásicos, tales como receptores metabotrópicos y ionotrópicos de glutamato (GluRs), receptores de acetilcolina (AChRs), receptores de 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, Pacheco et al., 2007), DARs (Saha et al., 2001, Besser et al., 2005, Sarkar et al., 2006, Watanabe et al., 2006), 5-HTRs (Leon-Ponte et al., 2007), AChRs (Kawashima and Fujii, 2003), norepinefrina/epinefrina (NE/ERs) (Elenkov et al., 2000), ácido γ -aminobutírico (GABARs) (Tian et al., 2004), entre otros; mientras que las células B expresan DARs (McKenna et al., 2002), 5-HTRs (Iken et al., 1995), AChRs (Kawashima and Fujii, 2003) y NE/ERs (Kohm et al., 2002), entre otros. Así como las células T y las células B expresan receptores de neurotransmisores, se han descritos varios otros tipos de células inmunes que expresan receptores para algunos neurotransmisores, lo que es de gran importancia ya que implica que estas células podrían ser reguladas por moléculas provenientes del sistema nervioso.

La identificación de estos receptores en células del sistema inmune ha revelado la gran importancia que podrían tener los neurotransmisores en el desencadenamiento y/o desarrollo de patologías que implican desregulación de la respuesta inmune tales como las autoinmunidades y el cáncer. Asimismo, este hecho implica que diferentes estados fisiológicos o patológicos del sistema nervioso probablemente puedan tener repercusión en la funcionalidad del sistema inmune. Además, la existencia de este tipo de receptores en leucocitos junto con la existencia, ya conocida, de receptores para citoquinas en células del sistema nervioso (Wrona, 2006) abre la posibilidad de que existan nuevas redes de comunicación bidireccional entre células del sistema inmune y el sistema nervioso (Figura 2).

Recientemente se ha descrito que no solo las neuronas pueden liberar neurotransmisores, sino que también algunas células del sistema inmune son capaces de producir 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, se ha descrito que las células T bajo ciertas condiciones pueden liberar 5-HT (O'Connell et al., 2006), NE/E (Nishibori et al., 2003), DA (Beck et al., 2004) y ACh (Kawashima and Fujii, 2003); las células B son capaces de liberar DA (Beck et al., 2004) y NE/E (Cosentino et al., 2000); mientras que las más potentes APCs, las DCs, pueden liberar Glu (Pacheco et al., 2006), 5-HT (O'Connell et al., 2006) y también se ha sugerido que producen DA (Nakano et al., 2008, Nakano et al., 2009, Prado et al., 2012). 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.

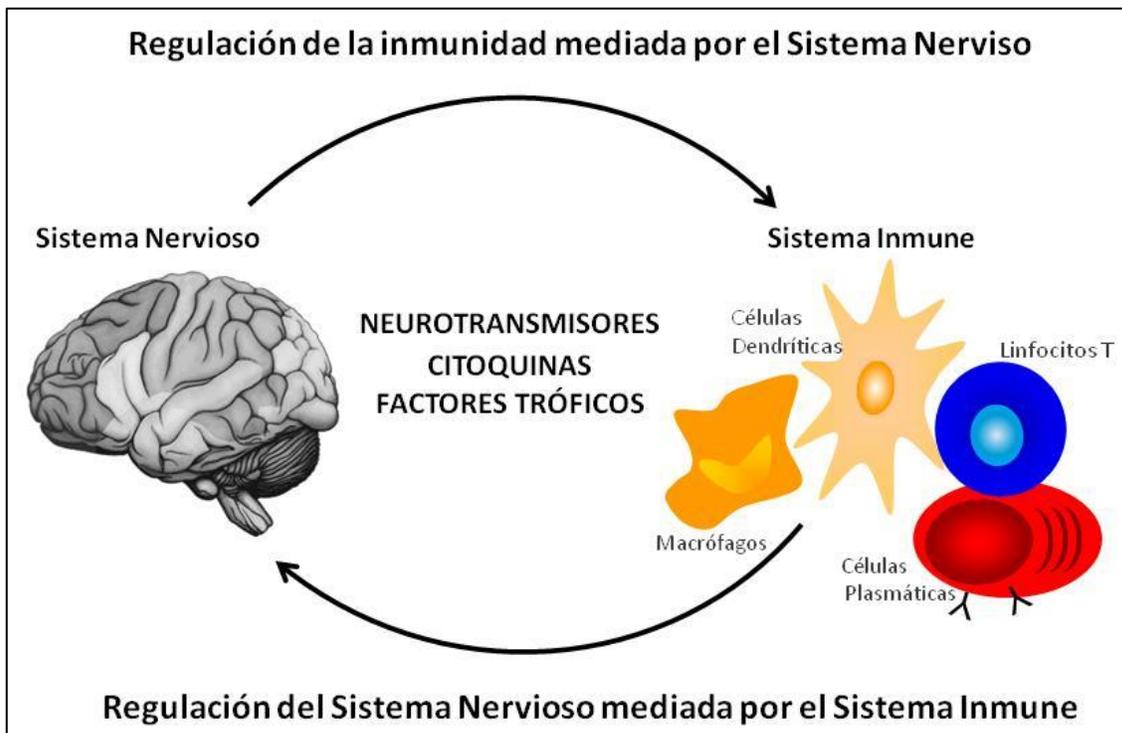


Figura 2. Interacción Neuroinmune. Una comunicación bidireccional tiene lugar entre el sistema nervioso y el sistema inmune tanto en estado normal como durante el desarrollo de patologías. Las mismas moléculas, incluyendo citoquinas, neurotransmisores y factores tróficos, participan como mediadores en ambas direcciones (Pacheco et al., 2012).

En el Sistema Nervioso Central (SNC) la DA ha sido relacionada con distintas funciones como movimiento, motivación, aprendizaje y secreción hormonal (Missale et al., 1998). La DA pertenece a la familia de catecolaminas y es sintetizada 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- β -hidroxilasa (D β 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) (Mignini et al., 2006) o también puede ser degradada por

enzimas citoplasmáticas como la Monoamina Oxidasa (MAO-A y MAO-B) (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 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.

2.3.1 Los receptores de dopamina.

La DA es un importante neurotransmisor involucrado en diversas funciones del sistema nervioso como movimiento (Cenci, 2007), adicción a drogas (Dayan, 2009), percepción del dolor (Potvin et al., 2009), secreción hormonal (Ben-Jonathan and Hnasko, 2001), motivación y placer (Wise, 2008) y 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). 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 $G_{\alpha s}$ estimulando la producción de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), mientras que los DARs de tipo II (D2R, D3R y D4R) se acoplan habitualmente a $G_{\alpha i}$, 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_{α} , 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).

2.3.2 Receptores de dopamina expresados en linfocitos.

Respecto a las vías de transducción de señales desencadenadas por el reconocimiento del antígeno necesarias para la activación eficiente de las células T, se sabe que implica la activación de la vía de PKC/Ca²⁺ 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-κB, NF-AT y complejos AP-1. Ha sido 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-κB (Jimenez et al., 2001, Hershfield, 2005). Por lo tanto, la estimulación de DARs en células T podría regular positiva o negativamente la función de estas células. A la fecha se ha descrito la expresión de los cinco DARs en células T de humanos, los cuales juegan diferentes papeles en la regulación de la fisiología de estas células. Mientras que la estimulación del D3R resulta en la activación de linfocitos T, la estimulación de los receptores D1, D2, D4 y D5 induce una inhibición de la respuesta de células T. Específicamente, la estimulación del D3R se ha asociado con el acoplamiento a G α i (Watanabe et al., 2006), al aumento en la producción de TNF- α (Besser et al., 2005) y el potenciamiento de la quimiotaxis, la adhesión a fibronectina y a ICAM-1 en linfocitos T CD8⁺ (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⁺ y CD8⁺ (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 D1 y D3 en células T de ratón favorecen la inmunidad mediada por este tipo de células. La estimulación del D1R inhibe la actividad de las células Tregs, 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⁺ (Watanabe et al., 2006), mediando en estas mismas células un incremento en la síntesis de IFN- γ e inhibiendo la síntesis de IL-4 e IL-10 (Ilani et al., 2004) . 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

Uno de los grandes desafíos actuales de la inmunología es comprender cómo el sistema inmune es regulado por el sistema nervioso y como esto está implicado en el desarrollo de enfermedades. Es así como dentro de los últimos años ha surgido un gran interés en el estudio de la regulación de la respuesta inmune por medio de neurotransmisores. Dentro de los diferentes neurotransmisores, la DA resulta especialmente interesante como regulador del sistema inmune, ya que diversos componentes del sistema dopaminérgico expresados en el sistema inmune se han visto alterados en numerosas patologías neurológicas, autoinmunes y cáncer. Dentro de este contexto, las evidencias actuales sugieren que el D3R podría ser un importante regulador de la respuesta inmune, sin embargo, los pocos estudios que existen al respecto muestran evidencias farmacológicas y no genéticas. Además, solo hay dos estudios que han analizado al receptor D3R en células T CD8⁺, de los cuales uno solo realiza ensayos de células humanas *in vitro* y otro estudia el papel de este receptor en la migración y adhesión celular. Es importante destacar que no hay estudios que muestren evidencias genéticas sobre el papel de este receptor en la función efectora y citotóxica de células T CD8⁺. Primero que todo se pretende confirmar y estudiar de manera más detallada la expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺. Con la utilización de ratones Knockout para el D3R se pretende obtener evidencias genéticas de como este receptor afecta el desarrollo del fenotipo Tc1 y la función efectora y citotóxica de estas células tanto *in vitro* como *in vivo*. El estudio de la función reguladora que cumple D3R en las células T CD8⁺ puede entregar valiosas evidencias para entender mecanismos de interacción neuroinmune que podrían estar involucrados en diversas patologías. Así mismo, el desarrollo de este estudio podría dar luces de futuros blancos moleculares a ser considerados en inmunoterapias futuras.

3.1 HIPÓTESIS

El receptor de dopamina D3 expresado en linfocitos T CD8⁺ contribuye a la adquisición del fenotipo Tc1, favoreciendo la función efectora de estas células.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar si el receptor de dopamina D3 expresado en células T CD8⁺ es importante para el proceso de diferenciación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes hacia el fenotipo efector Tc1, favoreciendo la respuesta citotóxica y producción de moléculas efectoras.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la expresión del receptor de dopamina D3 y de componentes del sistema dopaminérgico en linfocitos T CD8⁺ tanto vírgenes como diferenciados hacia el fenotipo Tc1.
2. Evaluar la adquisición de función efectora Tc1 de linfocitos T CD8⁺ normales o carentes en el receptor de dopamina D3 *in vitro*.
3. Comparar la capacidad efectora de linfocitos T CD8⁺ normales o carentes en el receptor de dopamina D3 *in vivo*.

4. METODOLOGÍA

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Neuroinmunología de la Fundación Ciencia & Vida, Santiago, Chile.

4.1 Animales.

Ratones en el fondo genético C57BL/6 de entre 8 y 12 semanas de edad fueron usados en todos los experimentos. Los ratones wild-type (WT) C57BL/6 fueron obtenidos de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA), mientras que los ratones D3R knockout (D3RKO) fueron gentilmente donados por el Dr. Marc Caron de la Universidad de Duke (Durham, NC, USA). Los ratones que expresan el TCR transgénicos OT-1 ($V\alpha 2V\beta 5$) que reconoce el péptido SIINFEKL (derivado de ovoalbúmina (OVA)) alojado sobre la molécula de MHC de clase I H-2K^b (complejo H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄), WT/OT-1 fueron obtenidos de Taconic, mientras que los ratones D3RKO/OT-1 fueron generados en nuestro laboratorio. Todos los animales fueron mantenidos y manipulados de acuerdo a las directrices 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⁺.

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 utilizando una jeringa para tuberculina con aguja 25G (Becton Dickinson, Curitiba, Brasil). Luego, la suspensión celular fue centrifugada y resuspendida en una solución de lisis ACK (150 mM NH₄Cl; 1 mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA disódico; pH 7.2), con el fin de eliminar los glóbulos rojos. Los nodos linfáticos fueron disgregados en PBS 1X (8,1 μM Na₂HPO₄; 1,47 μM KH₂PO₄; 0,8 % NaCl; 0,02 % KCl) utilizando portaobjetos esmerilados. Las suspensiones celulares provenientes de nodos linfáticos y de bazo depletado de eritrocitos fueron utilizadas como fuentes de células T CD8⁺. La

obtención de linfocitos T CD8⁺ totales se realizó mediante selección negativa utilizando un kit de purificación basado en la utilización de esferas magnética unidas a anticuerpos dirigidos contra múltiples moléculas de superficie celular, obteniendo rutinariamente una pureza superior al 85% (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania). La purificación de las diferentes poblaciones de linfocitos T CD8⁺ presentes en el bazo se realizó mediante la incubación de los linfocitos T CD8⁺ 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⁺ vírgenes (CD62L^{alto} CD44^{bajo}), efectores (CD62L^{alto} CD44^{alto}) y de memoria (CD62L^{bajo} CD44^{alto}) fueron separadas mediante un *cell-sorter* FACSaria II (Becton Dickinson, San José, CA, USA), obteniéndose de manera rutinaria una pureza superior al 98% para cada población.

4.3 Polarización de linfocitos T CD8⁺ hacia el fenotipo Tc1.

Linfocitos T CD8⁺ totales o vírgenes obtenidos según lo mencionado en el punto anterior fueron estimulados en placas de 96 pocillos de fondo plano a una concentración de 2×10^5 células por pocillo con anticuerpo anti-CD3 ϵ (100 ng/pocillo) adherido a placa (Biolegend, San Diego, CA, USA) en presencia de anticuerpo anti-CD28 (2 μ 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 (Gibco, Nueva York, USA), suplementado con suero fetal bovino (FBS) 10%, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 1 U/mL /estreptomicina 1 μ g/mL, gentamicina 50 μ g/mL, anti-fúngico/anti-biótico 1mM, β -mercaptoetanol 50 μ M, L-glutamina 2.05 mM (Todos de Gibco, Nueva York, USA), durante 3 días a 37°C y 5% de CO₂.

Para analizar la expresión de componentes de la maquinaria dopaminérgica, factores de transcripción y moléculas efectoras, se extrajo ARN total a diferentes tiempos de cultivo. Para evaluar la producción de moléculas efectoras a nivel de proteína, las células fueron re-estimuladas con ionomicina 1 μ g/ml (Sigma, San Luis, Missouri, USA) y PMA 50 ng/ml (Sigma,

San Luis, Missouri, USA) en presencia de brefeldina A 5 $\mu\text{g/ml}$ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 4 horas, en los diferentes tiempos de cultivo.

4.4 Extracción de ARN y RT-PCR.

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 nm/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. Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los ADNc generados se almacenaron a -20°C . Con los ADNc generados se realizaron reacciones de PCR para amplificar diferentes genes. Para esto se utilizó 1 μL de ADNc, 10 μL de Go-Taq Green Master Mix 2X (Promega, Madison, WI, USA), partidores y agua en un volumen final de 20 μL . Los partidores sentido y antisentido fueron usados a una concentración de 10 μM . La reacción de PCR fue llevada a cabo con el siguiente perfil térmico: 94°C (5 min) antes de iniciar los ciclos de PCR; 40 ciclos: disociación 95°C (30 s), hibridación 60°C (45 s) y extensión 72°C (30 s); 72°C (10 min) al finalizar los ciclos de PCR. Las secuencias de los partidores utilizados se muestran a continuación: β -actina sentido: 5'-CAG CTT CTT CTT TGC AGC TCC TT-3'; β -actina antisentido: 5'- CCT GGA TGG CTA CGT ACA TGG C-3'; TH sentido: 5'-TCC CAA GGA AAG TGT CAG AG-3', TH antisentido 5'-AGA GAT GCA AGT CCA ATG TCC-3'; D β H sentido: 5'-TTC CAA TGT GCA GCT GAG TC-3', D β H antisentido 5'-GGT GCA CTT GTC TGT GCA GT-3'; DAT sentido: 5'-TGG CTT CGT TGT CTT CTC CT-3', DAT antisentido 5'-ATG CTG ACC ACG ACC ACA TA-3'; NET sentido: 5'-GCT AGA TAG TTC AAT GGG

AGG-3', NET antisentido 5'-CTC ACG AAC TTC CAA CAC AG-3'; SERT sentido: 5'-CTG AGA TGA GGA ACG AAG AC-3', SERT antisentido 5'-CTG AGT GAT TCC ATA GAA CCA-3'; VMAT2 sentido: 5'-GTC GTA GTT CCC ATC ATT CC-3', VMAT2 antisentido 5'-ATA GTA AGA GAA GAT GCT GTG G-3'; MAO-A sentido: 5'-GCA TGA TAA TTG AAG ATG AGG AGG-3', MAO-A antisentido 5'-CGA ATC ACC CTT CCA TAC AG-3'; MAO-B sentido: 5'-GTA TGG AAT CCT ATC ACC TAC C-3', MAO-B antisentido 5'-AAT TTC CTC TCC TGT CCT CC-3'. El tamaño de los amplicones fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, a 100V por 40 minutos.

4.5 RT-PCR en tiempo real.

Las reacciones de RT-PCR en tiempo real se realizaron con 1 μ L de ADNc (50 ng), 10 μ L Brilliant SYBR Green QRT-PCR Master Mix II 2X (Stratagene, Santa Clara, California, USA), 1 μ L de cada partidor (sentido y antisentido a una concentración 10 μ M cada uno) y 7 μ L de agua ultra pura, para un volumen final de 20 μ L. 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: β 2microglobulina (β 2m) sentido: 5'-CAC CGG AGA ATG GGA AGC CGA A-3'; β 2m antisentido: 5'-TCC ACA CAG ATG GAG CGT CCA G-3; D3R sentido: 5'- GAA CTC CTT AAG CCC CAC CAT -3', D3R antisentido 5'- GAA GGC CCC GAG CAC AAT -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 β 2-microglobulina. Los valores relativos de expresión de los diferentes ARNm fueron calculados con la siguiente fórmula = $2^{-(Ct \text{ del ARNm problema} - Ct \text{ de la } \beta 2\text{-microglobulina})} \times 10^3$.

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⁺ no estimulados o diferenciados hacia el fenotipo Tc1, estas células fueron tratadas con PMA y ionomicina en presencia de brefeldina A como se mencionó anteriormente (ver sección 4.3). Posteriormente, las células fueron incubadas 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- γ APC (clon XMG1.2, BD Pharmigen) y anti-Granzima B FITC (clon 16G6, eBiosciences), por 30 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⁺ con el programa FACSDiva (ambos de BD Biosciences).

4.7 Ensayo de citotoxicidad *in vivo*.

Linfocitos T CD8⁺ vírgenes (CD62L^{alto} CD44^{bajo}) fueron purificados de ratones WT/OT-1 o D3RKO/OT-1 mediante *cell-sorting* y luego fueron teñidos con la sonda fluorescente *Cell Trace Violet* (Invitrogen) a una concentración 10 μ M final, por 20 minutos a 37°C. A continuación, las células fueron lavadas una vez con PBS 1X/FBS 5% y dos veces con PBS 1X. Adicionalmente, se analizó el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ V α 2⁺ V β 5⁺ purificados de cada ratón, para luego transferir 10⁶ células antígeno-específicas a cada ratón recipiente C57BL/6 por la vena de la cola. Luego de un día, los animales fueron inmunizados con una emulsión que contiene 100 μ g/mL de proteína OVA (Sigma) en adyuvante completo de Freund (CFA, Thermo Scientific, Wilmington, USA) por vía subcutánea. Se incluyeron los siguientes controles: animales no transferidos con células OT-1 e inmunizados, el cual da cuenta de la citotoxicidad producida por los linfocitos T OVA-específicos endógenos, y animales transferidos con células OT-1 pero no inmunizados, con el fin de evaluar la inducción de respuesta citotóxica por parte de la inmunización. Luego de 7

días, los ratones fueron transferidos con una mezcla de esplenocitos compuesta por dos poblaciones celulares mezcladas en una relación 1:1. Una población de esplenocitos fue pulsada con péptido OT-1 a una concentración 0.5µM final por 45 minutos a 37°C y luego teñidas con CFSE (Invitrogen) 1µM (CFSE^{bajo}); mientras que la otra población de esplenocitos no fue pulsada y fue teñida con CFSE 5 µM (CFSE^{alto}), la cual sirve como un control interno. Dicha mezcla (1:1) de esplenocitos fue inyectada (5.2 x 10⁶ células/ratón) por la vena de la cola. Luego de un día, los ratones recipientes fueron sacrificados y se extrajeron las células del bazo, las cuales fueron directamente analizadas mediante citometría de flujo para evaluar la proporción de células CFSE^{alto} y CFSE^{bajo} o bien para re-estimular los linfocitos T CD8⁺ presentes en la mezcla con PMA y ionomicina en presencia de brefeldina A, de la misma manera mencionada previamente (ver sección 4.3). Posteriormente a la re-estimulación, las células fueron teñidas con anticuerpos contra CD8 conjugado a fluoróforo, fijadas con paraformaldehído 1%, permeabilizadas, e incubadas con anticuerpo contra IFN-γ conjugado a fluoróforo. Posteriormente se evaluó la producción de IFN-γ en la población transferida (CD8⁺ Cell Trace Violet⁺) mediante citometría de flujo. La citotoxicidad fue calculada a partir del porcentaje de la población pulsada y no pulsada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Citotoxicidad\ específica = \left(100 \times \left(1 - \frac{(NP/pOT1)_{control}}{(NP/pOT1)_{experimental}} \right) \right)$$

Donde NP corresponde al porcentaje de células CFSE^{alto} (que no fueron pulsadas con péptido OT1) respecto al total de células CFSE⁺, pOT1 corresponde al porcentaje de células CFSE^{bajo} (que fueron pulsadas con péptido OT1) respecto al total de células CFSE⁺, el control corresponde a los ratones que no recibieron transferencia de células transgénicas OT1 pero si fueron inmunizados y los ratones experimentales corresponden a aquellos que si recibieron transferencia de células transgénicas OT-1 y si fueron inmunizados.

4.8 Análisis estadístico.

Para el análisis de la significancia estadística de las diferencias observadas, los datos de todas las réplicas fueron representados como la media \pm la desviación estándar y las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante el test t de student no pareado de dos colas. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Los datos fueron analizados usando el software Prisma 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 La polarización a fenotipo Tc1 induce la expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺.

Estudios previos han demostrado la expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺ totales de ratón y en la subpoblación vírgen de este mismo tipo celular proveniente de humanos (Watanabe et al., 2006), sin embargo, no existen estudios sobre la expresión del D3R durante la activación y diferenciación de linfocitos T CD8⁺ hacia fenotipo Tc1. Debido a esto, en este trabajo se estimularon linfocitos T CD8⁺ totales, purificados de bazo de ratón, en presencia tanto de anticuerpos contra CD3 ϵ y CD28 como de las citoquinas IL-2 e IL-12, para luego de diferentes tiempos de cultivo, extraer ARN mensajero de estas células y evaluar la presencia del transcrito del D3R mediante PCR en tiempo real. De manera adicional, se evaluó el grado de diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ hacia el fenotipo Tc1, mediante la re-estimulación a diferentes tiempos y la determinación de la expresión del marcador fenotípico IFN- γ mediante citometría de flujo. Como se muestra en la figura 3A, alrededor del 20% de los linfocitos T CD8⁺ totales obtenidos desde el bazo y re-estimulados inmediatamente después de la purificación tienen la capacidad de producir IFN- γ (0 días), lo que aumenta progresivamente con el tiempo de cultivo, tanto en frecuencia de linfocitos productores de esta citoquina como en intensidad de fluorescencia asociada a la citoquina, obteniéndose más de un 80% de linfocitos T CD8⁺ productores de IFN- γ después de tres días de cultivo en estas condiciones. De este modo, se confirmó que las condiciones utilizadas en este estudio conducen a la adquisición de fenotipo Tc1 por parte de linfocitos T CD8⁺. A continuación, se evaluó la expresión del D3R a diferentes tiempos durante la diferenciación hacia el fenotipo Tc1. Los datos de PCR muestran que si bien el transcrito del D3R no se detecta en linfocitos T CD8⁺ sin estimular o estimulados por 24 horas, es posible detectar ARNm del D3R a las 48 horas de cultivo, el cual corresponde con el tamaño del producto obtenido con el núcleo estriado (Figura 3B). De manera interesante, la inducción de la expresión del D3R bajo estas condiciones es transiente, ya que no se detecta este producto luego de tres días cultivo (Figura 3B). De este modo, estos resultados sugieren que la expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺ participaría en el proceso de diferenciación hacia el fenotipo Tc1.

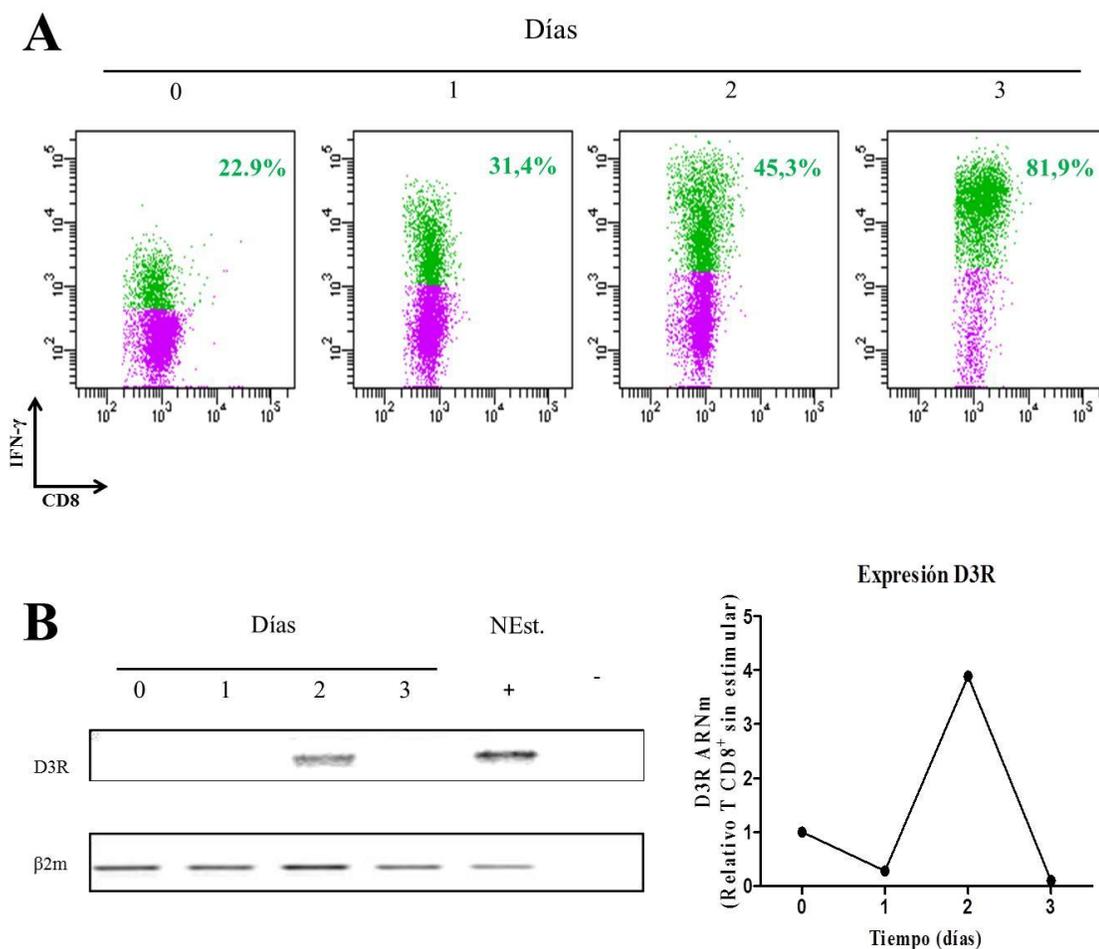


Figura 3. La diferenciación de linfocitos T CD8⁺ hacia el fenotipo Tc1 induce la expresión del D3R. Linfocitos T CD8⁺ obtenidos de ratones WT fueron cultivados en condiciones polarizantes hacia el fenotipo Tc1 por 3 días. **(A)** La expresión de IFN- γ en la población CD8⁺ fue evaluada luego de re-estimar a diferentes tiempos de cultivo mediante citometría de flujo. **(B)** A diferentes tiempos de cultivo se extrajo ARN total de células sin re-estimar para luego evaluar la expresión del ARNm del D3R mediante PCR en tiempo real con partidores específicos. En el panel de la izquierda se muestra una electroforesis de los productos de la reacción de PCR en tiempo real, mientras que en el panel derecho se muestran los niveles de expresión relativos a los linfocitos T CD8⁺ sin cultivar. La expresión del ARNm de β -2microglobulina se usó para normalizar la expresión del ARNm de D3R. El control positivo (+) corresponde a núcleo estriado (NEst); el control negativo (-) corresponde

a la reacción sin templado. Los datos presentados son representativos de tres experimentos independientes.

5.2 Linfocitos T CD8⁺ expresan componentes que permiten transportar, almacenar y degradar dopamina.

Con el fin de conocer si los linfocitos T CD8⁺ tienen la capacidad de sintetizar, almacenar, transportar y degradar DA, se analizaron marcadores del sistema dopaminérgico mediante RT-PCR, los que se esquematizan en la figura 4A. En este análisis se incluyó además de DAT, los transportadores de norepinefrina (NET) y de serotonina (SERT), pues se ha demostrado que ambos también pueden participar en la re-captación de DA, aunque con menor eficacia que DAT (Larsen et al., 2011). Como se observa en la figura 4B, en ninguno de los tiempos analizados se detectó la presencia de TH ni de DβH en linfocitos T CD8⁺, lo que sugiere que estas células no tienen la capacidad de sintetizar DA ni NE. Por otra parte, no fue posible detectar el transcrito de DAT ni de NET, mientras que sí se detectó el de SERT en todos los tiempos analizados, lo que junto con la detección del ARNm para VMAT-2 sugiere que los linfocitos T CD8⁺ serían capaces de internalizar y almacenar monoaminas como DA en compartimentos vesiculares (Figura 4B). Debido al carácter altamente oxidativo de DA, aquellas células que contienen este neurotransmisor requieren de la expresión de enzimas que permitan su degradación en el citoplasma, tales como MAO o COMT. En este caso se analizaron las dos variantes de MAO, detectándose el transcrito de MAO-A tanto en linfocitos T CD8⁺ sin estimular como diferenciados al fenotipo Tc1 (Figura 4B). Por otro lado, la expresión de MAO-B es inducible ya que si bien no se detecta en células sin estimular ni luego de 24 horas de cultivo, el ARNm para esta enzima fue detectable posterior a las 48 horas de cultivo (Figura 4B). En conjunto, estos resultados sugieren que si bien los linfocitos T CD8⁺ no son capaces de producir DA de manera autónoma, estas células tendrían la capacidad de capturar DA desde el medio externo, de almacenar DA en vesículas intracelulares y de degradar DA en el citoplasma.

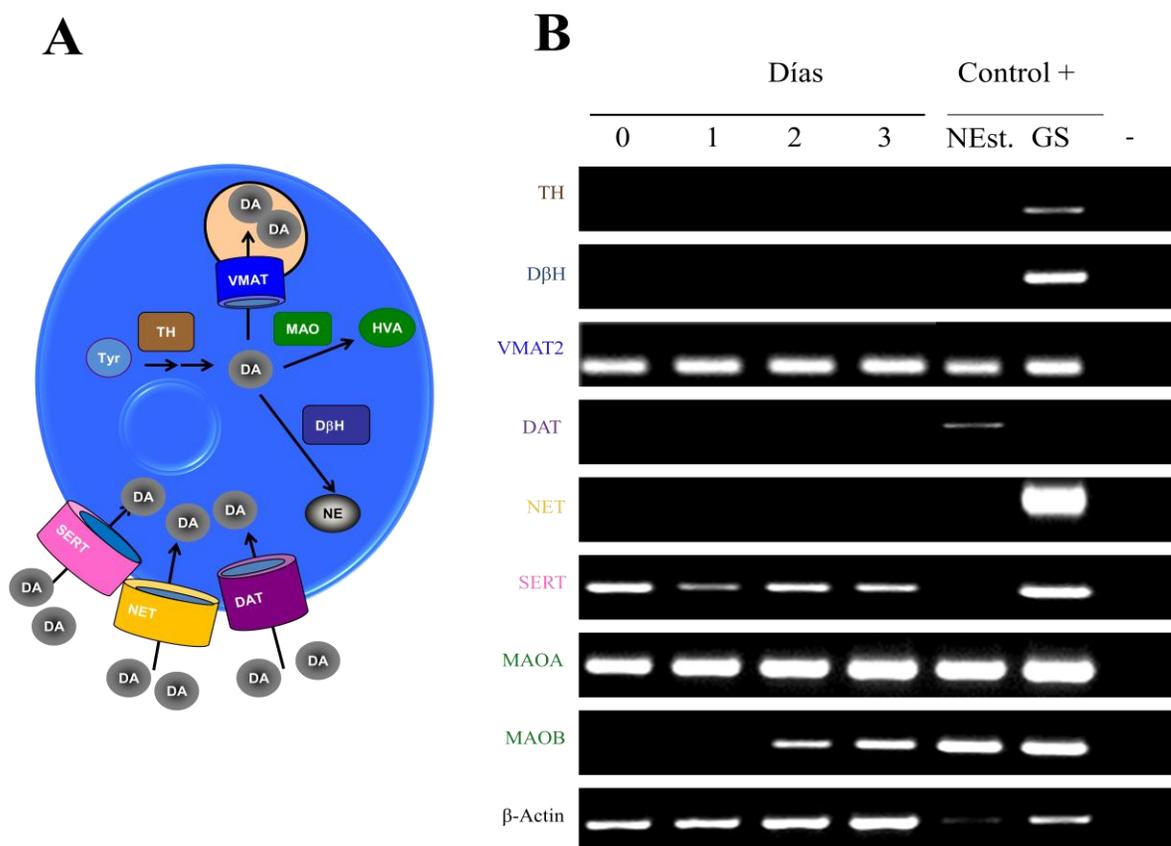


Figura 4. Expresión de componentes del sistema dopaminérgico en linfocitos T CD8⁺ durante la diferenciación hacia el fenotipo Tc1. Linfocitos T CD8⁺ obtenidos de ratones WT fueron cultivados en condiciones polarizantes hacia el fenotipo Tc1 para extraer ARN en los tiempos indicados. **(A)** Esquema representativo con los componentes del sistema dopaminérgico que fueron analizados. Tyr: L-tirosina, TH: tirosina hidroxilasa, DA: dopamina, DβH: DA-β-hidroxiilasa, VMAT: transportador vesicular de monoaminas, DAT: transportador de DA de membrana plasmática, NET: transportador de norepinefrina, SERT: transportador de serotonina, MAO: monoamina oxidasa, HVA: ácido homovanílico **(B)** A diferentes tiempos de cultivo se extrajo ARN total de células sin re-estimular para luego evaluar la expresión del ARNm de los diferentes componentes. La expresión de β-Actina se incluyó como gen normalizador. El control positivo (+) corresponde a glándula suprarrenal (GS) ó núcleo estriado (NEst); el control negativo (-) corresponde a la reacción sin templado. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

5.3 La expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺ totales favorece la expresión de marcadores del fenotipo Tc1 *in vitro*.

Considerando que la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ hacia el fenotipo Tc1 induce la expresión del D3R, a continuación se evaluó la relevancia de este receptor en el proceso de diferenciación. Para esto, se purificaron células T CD8⁺ totales del bazo de ratones WT o deficientes en el D3R (D3RKO), para luego incubarlas en condiciones que conducen a la adquisición del fenotipo Tc1. Con el fin de caracterizar de manera detallada el proceso de diferenciación, se evaluó tanto la expresión de factores de transcripción necesarios para este fenotipo, como Tbet y Eomes, así como también la expresión de moléculas efectoras características del fenotipo Tc1, como la citoquina IFN- γ y las proteínas citotóxicas granzima B y perforina 1. La figura 5 muestra los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativo para los diferentes genes de interés. Los niveles de los factores de transcripción Tbet y Eomes aumentan durante el período de diferenciación hacia Tc1 en células T CD8⁺ WT, llegando a un máximo a los dos días de iniciado el cultivo para luego disminuir (Figura 5A). Por su parte, la expresión de ambos factores de transcripción por linfocitos T CD8⁺ D3RKO presenta una cinética similar a la observada en linfocitos T CD8⁺ WT, sin embargo la carencia de D3R resulta en una menor expresión tanto de Tbet como de Eomes en todos los tiempos analizados (Figura 5A y 5B). Al analizar la expresión de moléculas efectoras en células T CD8⁺ WT, es posible notar que también hay un incremento en la expresión tanto del transcrito de IFN- γ , como de perforina 1 y de granzima B con el tiempo de cultivo, disminuyendo levemente al tercer día de cultivo (Figura 5C-E). Al evaluar la expresión de moléculas efectoras por parte de linfocitos T CD8⁺ D3RKO se observó una menor inducción de la expresión de los transcritos tanto de IFN- γ como de perforina 1 y granzima B comparado con los linfocitos T CD8⁺ WT (Figura 3C-E). En conjunto, estos datos sugieren que la expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺ favorece la expresión a nivel de ARNm tanto de factores de transcripción como de moléculas efectoras características del fenotipo Tc1.

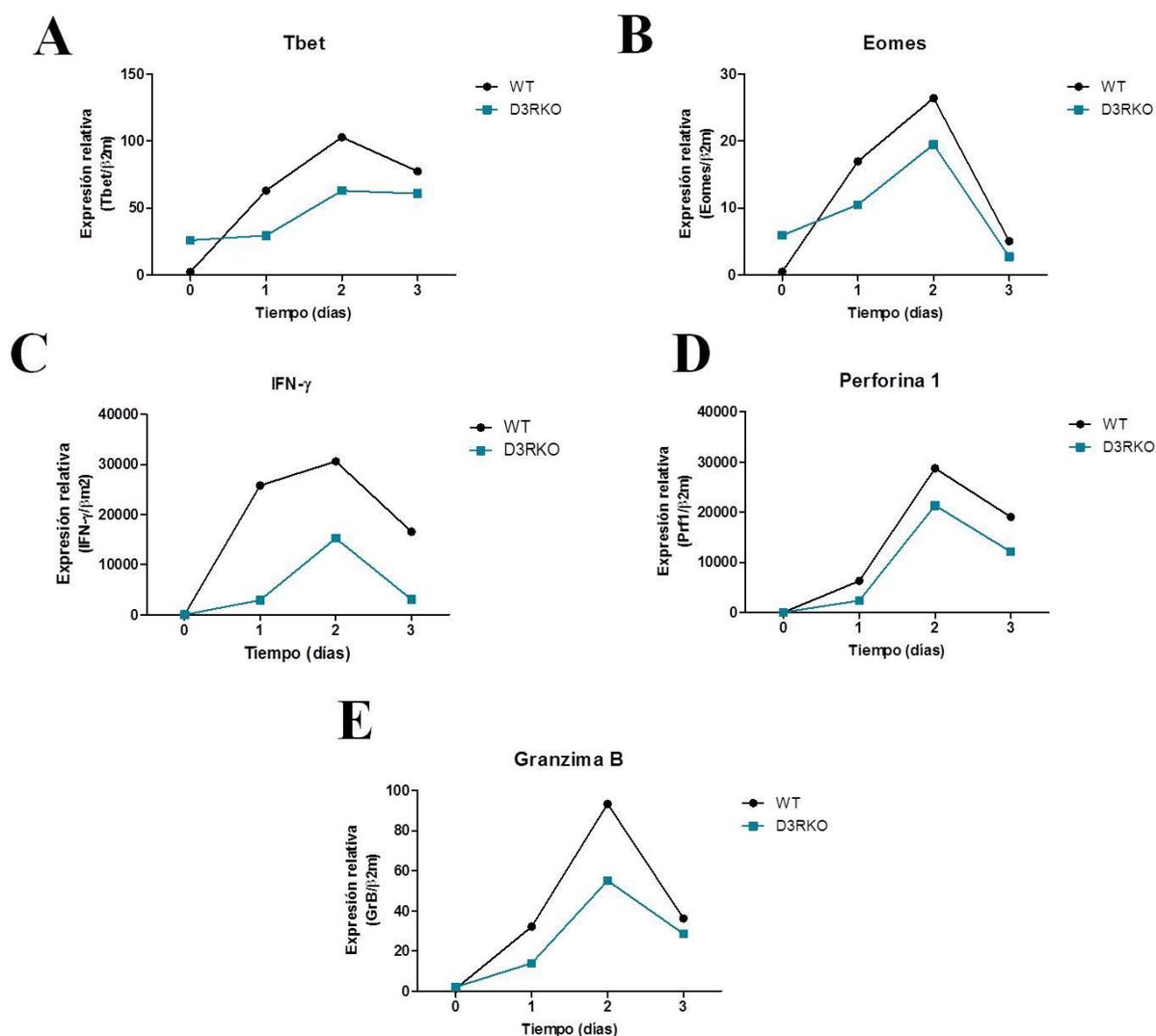


Figura 5. La expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺ totales favorece la expresión de genes característicos del fenotipo Tc1 *in vitro*. Linfocitos T CD8⁺ totales obtenidos de ratones WT y D3RKO fueron cultivados en condiciones polarizantes hacia el fenotipo Tc1 por tres días y se extrajo ARN total en los tiempos indicados. Se evaluó la expresión de ARNm de los factores de transcripción Tbet (A) y Eomes (B), de la citoquina IFN- γ (C) y de las moléculas citotóxicas perforina 1 (D) y granzima B (E) mediante PCR en tiempo real. Se presenta la expresión de cada gen relativo a la expresión del gen de referencia β -2 microglobulina en cada uno de los tiempos analizados. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Con el objetivo de evaluar si las diferencias observadas a nivel de ARNm entre linfocitos T CD8⁺ totales WT y D3RKO se traducen en una diferencia a nivel de producción de proteína, se analizó la producción tanto de IFN- γ como de granzima B y LAMP-1 al inicio y luego de tres días de cultivo. La molécula LAMP-1 se encuentra asociada a la membrana de endosomas que contienen moléculas citotóxicas, por lo que su exposición en la membrana plasmática de los linfocitos T CD8⁺ indica la liberación de gránulos citotóxicos. Al evaluar la producción de IFN- γ se observó que al inicio del cultivo las células T CD8⁺ totales obtenidas de ratones D3RKO presentan una frecuencia de producción de esta citoquina significativamente menor comparada con las células T CD8⁺ totales WT (Figura 6A). En contraste, esta diferencia ya no se observa después de tres días en condiciones de diferenciación hacia el fenotipo Tc1 (Figura 6A). En el caso de la producción de granzima B, no se observó diferencias entre ambos genotipos tanto al inicio del cultivo como al cabo de tres días de cultivo bajo condiciones inductoras del fenotipo Tc1 (Figura 6B). Por su parte, la expresión de LAMP-1 en la superficie de los linfocitos T CD8⁺ totales D3RKO al inicio del cultivo fue significativamente menor comparado con las células T CD8⁺ totales normales, diferencia que no se observa luego de tres días de diferenciación hacia el fenotipo Tc1 (Figura 6C). A partir de estos resultados indican que la ausencia del D3R en linfocitos T CD8⁺ totales afecta la producción de proteínas efectoras y la capacidad citotóxica basales. Sin embargo la ausencia de D3R en la población de células T CD8⁺ totales no afecta el potencial efector después de inducir la diferenciación hacia el fenotipo Tc1.

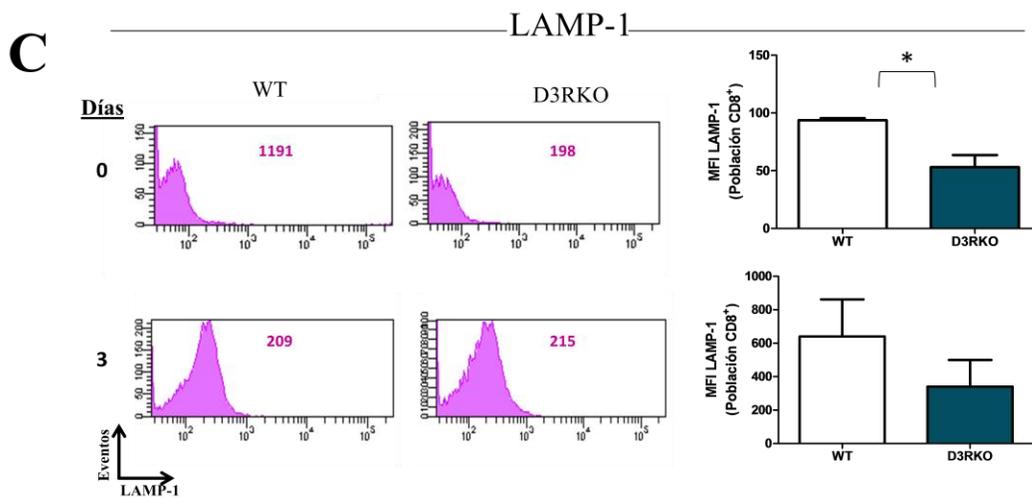
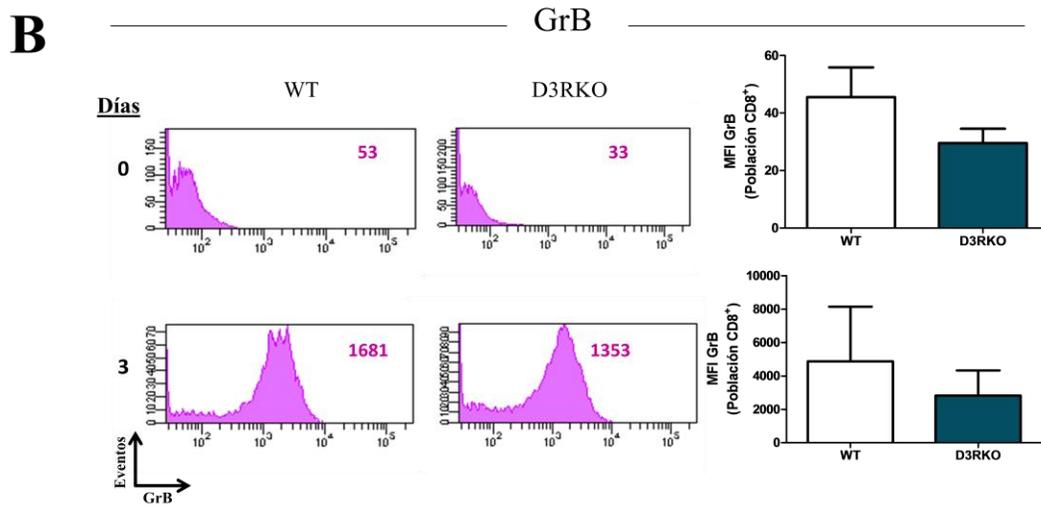
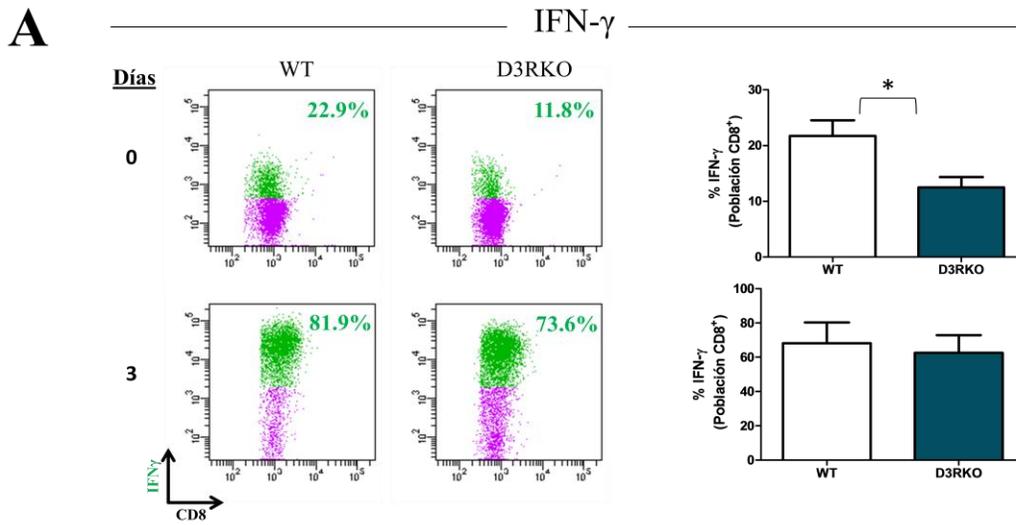


Figura 6. La expresión de D3R favorece la función efectora basal del fenotipo Tc1 en linfocitos T CD8⁺ totales aislados de bazo. Linfocitos T CD8⁺ totales obtenidos de ratones WT y D3RKO fueron inmediatamente estimulados con PMA y ionomicina en presencia de brefeldina A o cultivados en condiciones de diferenciación hacia el fenotipo Tc1 por 3 días y luego re-estimulados con PMA, ionomicina y brefeldina A. Se evaluó la expresión de LAMP-1 en la superficie celular y la acumulación de proteínas intracelulares en la población CD8⁺ mediante citometría de flujo. (A) Gráfico de puntos representativo de la producción de IFN- γ por linfocitos T CD8⁺ WT y D3RKO se muestran en los paneles de la izquierda. Los números adentro de cada panel indican el porcentaje de células IFN- γ ⁺. En (B) y en (C) se muestran histogramas representativos (paneles izquierdos) de la expresión de GrB y LAMP-1 en la población CD8⁺, respectivamente. Los números adentro de cada histograma indican la intensidad media de fluorescencia (MFI) de cada parámetro en la población CD8⁺ (B y C). Los gráficos de barras de la derecha (A-C) 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.

5.4 La expresión del D3R no afecta la producción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8⁺ de memoria y efectores.

Considerando que los datos obtenidos muestran una diferencia en la expresión de IFN- γ entre linfocitos T CD8⁺ normales y D3RKO 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⁺ residentes en el bazo, se decidió purificar la población de linfocitos T CD8⁺ vírgenes, efectores y de memoria de acuerdo a la expresión diferencial de las moléculas de superficie CD62L y CD44, mediante *cell sorting* (Figura 7A). De este modo, las diferentes poblaciones fueron purificadas a partir de ratones WT y D3RKO y re-estimuladas para luego evaluar la producción de IFN- γ mediante citometría de flujo. Al analizar las tres poblaciones obtenidas de ratones WT fue posible determinar que, mientras las células T CD8⁺ vírgenes no producen IFN- γ en respuesta a la estimulación (Figura 7B), tanto las células efectoras, como las de memoria producen IFN- γ en respuesta a la estimulación (Figura 7C y D), y

por lo tanto contribuyen a la producción de esta citoquina en la mezcla de linfocitos T CD8⁺ totales. Sin embargo, la producción de IFN- γ por parte de las poblaciones efectoras y de memoria deficientes en el D3R fue similar a la observada en células WT (Figura 7C y D). De este modo, estos resultados sugieren que la diferencia en la producción de IFN- γ observada entre linfocitos T CD8⁺ totales WT y D3RKO no puede ser explicada por la producción de esta citoquina en las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ vírgenes, efectoras o de memoria.

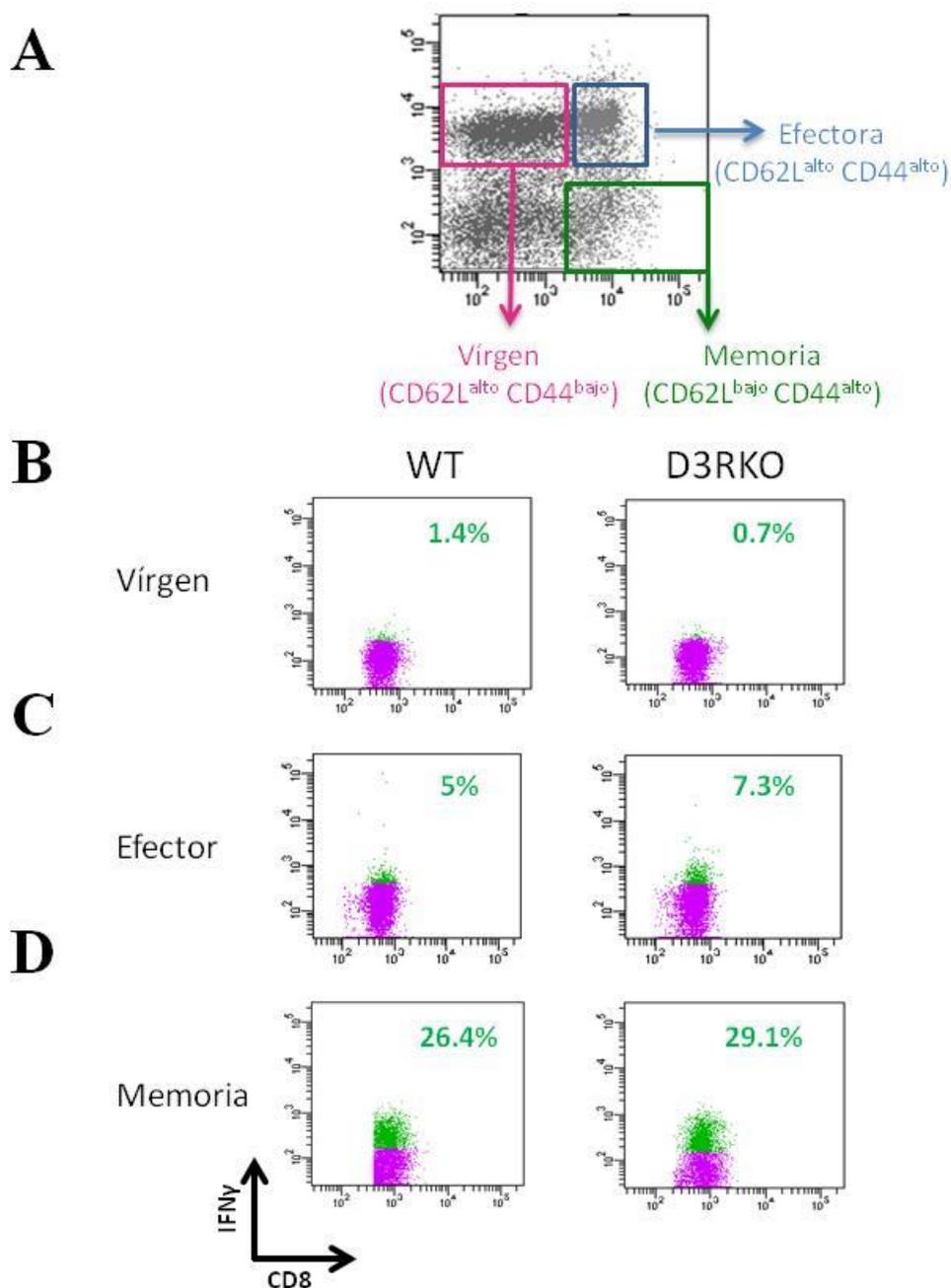


Figura 7. La expresión del D3R no afecta la producción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8⁺ de memoria y efectores. Linfocitos T CD8⁺ purificados de bazo de ratones WT y D3RKO fueron separados mediante *cell sorting* en base a la expresión de las moléculas de superficie CD62L y CD44, tal como se representa en el gráfico de puntos mostrado (A). Las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ fueron inmediatamente estimuladas con PMA y ionomicina

en presencia de brefeldina A y luego de evaluó la producción de IFN- γ en la población vírgen (B), efectora (C) y de memoria (D). Los números indican el porcentaje de células productoras de IFN- γ dentro de la población CD8⁺.

5.5 La expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺ vírgenes favorece la polarización a fenotipo Tc1 *in vitro*.

Dado que no se observaron diferencias significativas entre linfocitos T CD8⁺ totales WT y D3RKO después del período de diferenciación hacia el fenotipo Tc1, se decidió evaluar la contribución del D3R en la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes purificados mediante *cell sorting* hacia el fenotipo Tc1. De manera similar a lo realizado con linfocitos T CD8⁺ totales, las células vírgenes se incubaron bajo condiciones de polarización al fenotipo Tc1 para evaluar la expresión, a nivel de ARNm, de diferentes genes asociados con dicho fenotipo. De este modo, se pudo observar que la expresión tanto de Tbet como de Eomes aumenta en linfocitos T CD8⁺ normales durante el cultivo, lo que también ocurre en linfocitos T CD8⁺ D3RKO 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 8A y B). Una tendencia similar se observa al comparar la expresión del ARNm de IFN- γ , siendo menor la expresión por parte de los linfocitos T CD8⁺ D3RKO durante los dos primeros días de cultivo para luego obtenerse niveles similares entre ambos genotipos al tercer día (Figura 8C). Por otra parte, la expresión de perforina 1 y de granzima B exhibe una cinética diferente, presentándose un máximo al tercer día de cultivo en linfocitos T CD8⁺ normales. En ausencia del D3R, la expresión del transcrito de ambos genes sigue una cinética similar a la observada en células T CD8⁺ WT durante los dos primeros días. Sin embargo, la ausencia del D3R en las células T CD8⁺ resulta en una fuerte disminución de la expresión de ambos transcritos al tercer día de diferenciación (Figura 8D y E). Así, estos datos sugieren que la expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺ vírgenes favorece la expresión, a nivel de ARNm, tanto de factores de transcripción como de moléculas efectoras características del fenotipo Tc1.

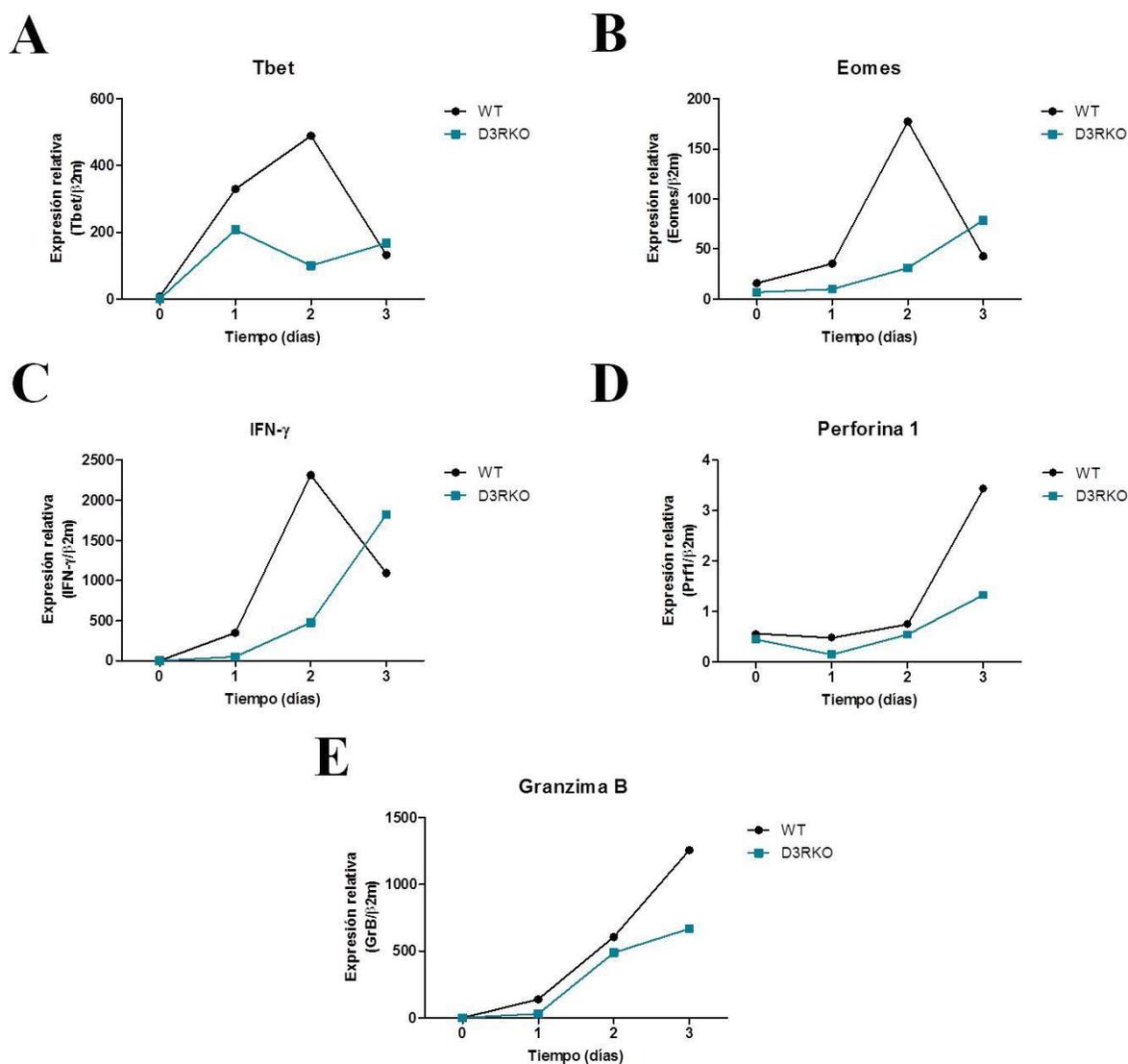


Figura 8. Linfocitos T CD8⁺ vírgenes deficientes en el D3R tienen menor capacidad de diferenciar hacia el fenotipo Tc1 *in vitro*. Linfocitos T CD8⁺ vírgenes (CD62L^{alto} CD44^{bajo}) de ratones WT y D3RKO fueron purificados mediante *cell-sorting* y cultivados en condiciones que favorecen la diferenciación 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- γ (C) y de las moléculas citotóxicas perforina 1 (D) y granzima B (E) mediante PCR en tiempo real. Se presenta la expresión de cada

gen relativo a la expresión del gen de referencia β -2 microglobulina en cada uno de los tiempos analizados. Se muestran los resultados de un experimento representativo de dos experimentos independientes.

De manera similar a lo realizado previamente con linfocitos T CD8⁺ totales, a continuación se analizó la producción tanto de IFN- γ como de granzima B a nivel de proteína y la expresión de LAMP-1 en la superficie celular mediante citometría de flujo. Consistente con las diferencias observadas entre linfocitos T CD8⁺ de ambos genotipos a nivel de ARNm, tanto la frecuencia de células productoras de IFN- γ como el nivel de expresión de esta citoquina por parte de los linfocitos T CD8⁺ D3RKO fue consistentemente menor comparado con los niveles detectados en linfocitos T CD8⁺ normales (Figura 9A). Adicionalmente, la deficiencia en el D3R resulta en una menor expresión tanto de granzima B como de LAMP-1 en linfocitos T CD8⁺ (Figura 9B y C), sugiriendo que la expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺ vírgenes favorece la adquisición del fenotipo Tc1.

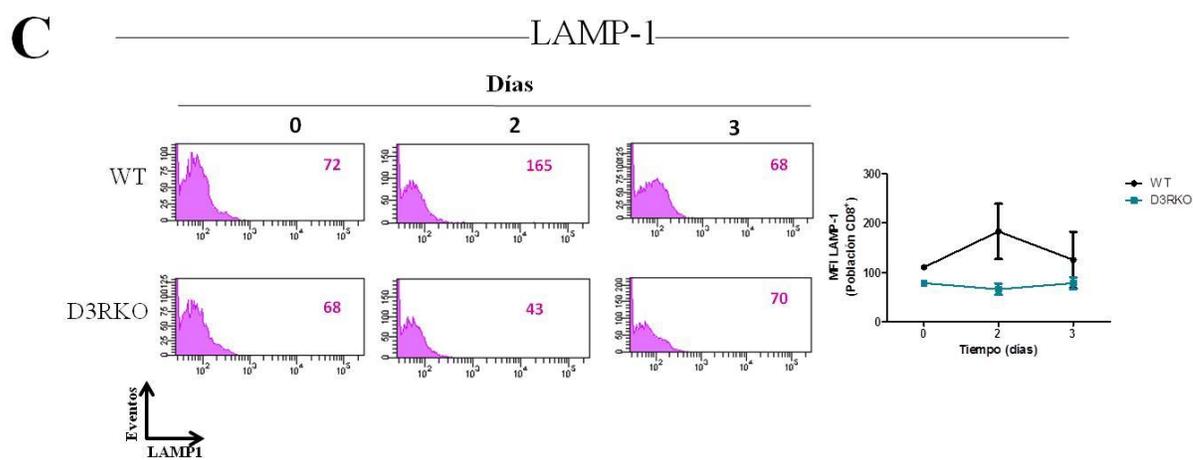
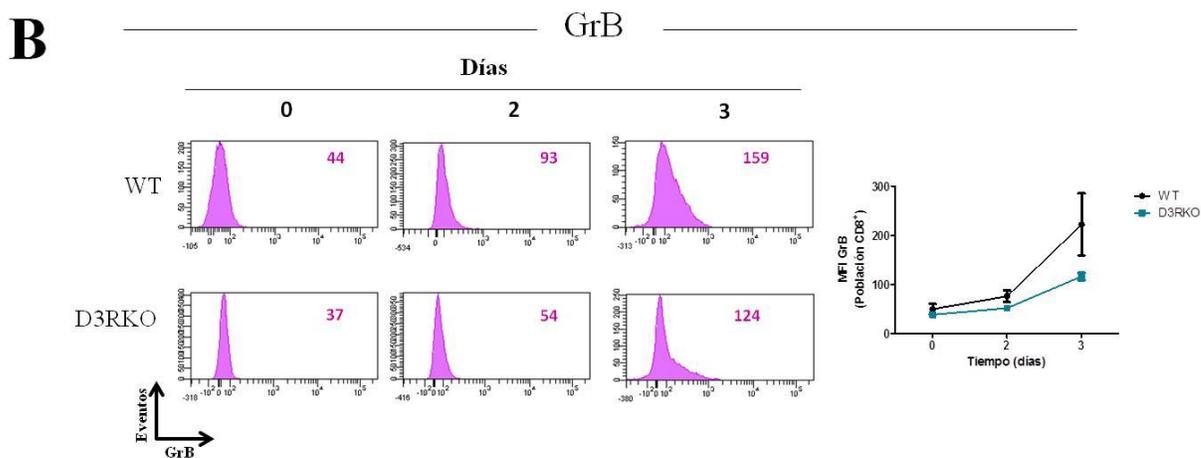
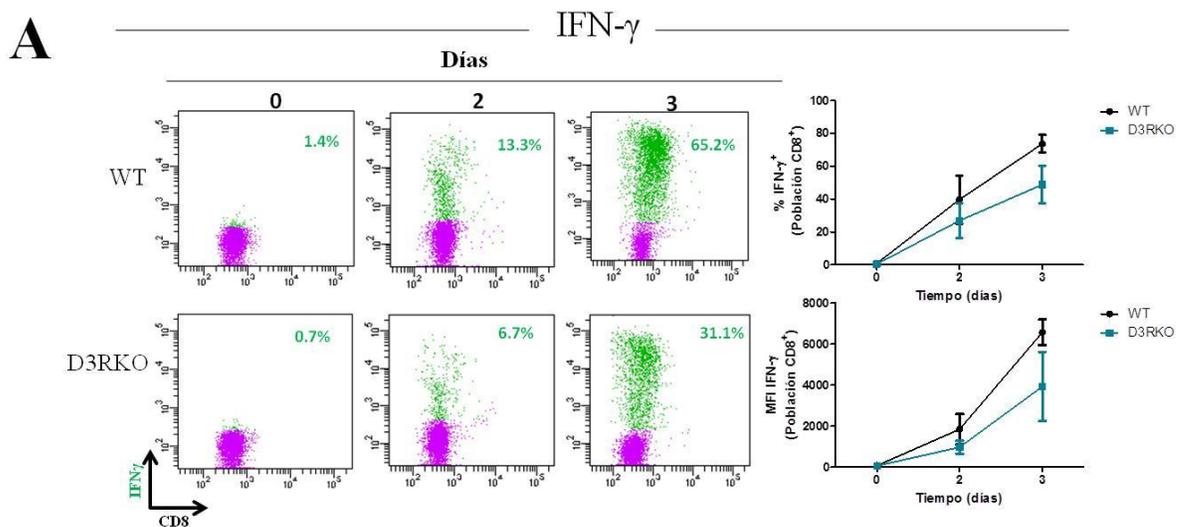


Figura 9. La expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺ vírgenes favorece la adquisición del fenotipo Tc1 *in vitro*. Linfocitos T CD8⁺ vírgenes (CD62L^{alto} CD44^{bajo}) de ratones WT y D3RKO fueron purificados mediante *cell-sorting* y cultivados en condiciones que promueven la diferenciación hacia el 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 (paneles de la izquierda) muestran la producción de IFN- γ en la población CD8⁺ WT o D3RKO. Los números adentro de los gráficos de puntos indican el porcentaje de células IFN- γ ⁺ dentro de la población CD8⁺. En (B) y en (C) se muestran histogramas representativos de la expresión de granzima B y LAMP-1 en la población CD8⁺, respectivamente (paneles de la izquierda). Los números adentro de los histogramas indican la intensidad media de fluorescencia (MFI) de cada parámetro en la población CD8⁺. Los gráficos de la derecha (A-C) representan la media \pm error estándar de 2 experimentos independientes. Los valores graficados en los paneles de la derecha corresponden al porcentaje de células positivas en la población CD8⁺ (A, gráfico superior), o la MFI asociada al parámetro medido en la población CD8⁺ (A gráfico inferior, B y C).

5.6 La expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺ vírgenes favorece la adquisición de fenotipo Tc1 y el desarrollo de citotoxicidad *in vivo*.

Debido a que los resultados obtenidos sugieren fuertemente que la expresión del D3R contribuye a la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes hacia el fenotipo Tc1, se evaluó la relevancia de este fenómeno mediante experimentos de citotoxicidad *in vivo*. Para esto se utilizaron linfocitos T CD8⁺ vírgenes que reconocen de manera específica un péptido derivado de la proteína modelo OVA, provenientes de ratones ya sea WT/OT-1 o D3RKO/OT-1. Luego de obtener las células vírgenes mediante *cell sorting*, estas fueron teñidas con la sonda fluorescente *Cell Trace Violet* y luego fueron inyectadas por vía intravenosa a ratones recipientes WT. Un día después, los animales fueron inmunizados con una emulsión de OVA en adyuvante completo de

Freund y siete días después fueron desafiados con una mezcla de esplenocitos compuesta por una población de células pulsadas con péptido OT-1 y teñidas con CFSE^{bajo} y por otra población que no fue pulsada y teñida con CFSE^{alto}, la cual sirve como un control interno. Después de un día del desafío se obtuvieron las células del bazo de los ratones recipientes para ser analizadas. Una fracción de las células fue directamente analizada mediante citometría de flujo para evaluar las poblaciones CFSE^{alto} y CFSE^{bajo} y así determinar la citotoxicidad específica. La otra fracción de células del bazo fue re-estimulada *in vitro* para analizar la producción de IFN- γ por parte de la población de linfocitos T CD8⁺ transferida que se encontraban teñidas con *Cell Trace Violet* (Figura 10A). Como se muestra en la figura 10B, este sistema permite evaluar citotoxicidad *in vivo*, ya que la transferencia de linfocitos T CD8⁺ vírgenes WT/OT-1 resulta en una marcada disminución en la población pulsada con pOT-1, provocando una citotoxicidad específica promedio cercana al 63%. Por su parte, los linfocitos T CD8⁺ vírgenes D3RKO/OT-1 producen una citotoxicidad promedio cercana al 55%, una diferencia que si bien no resulta significativa, indica una tendencia hacia una menor capacidad citotóxica por parte de estas células (Figura 10B). En línea con esta tendencia, la frecuencia de células transferidas productoras de IFN- γ es marcadamente menor en el caso de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes D3RKO/OT-1 (Figura 10C). Esta diferencia es aun más pronunciada al evaluar la producción de IFN- γ por célula, ya que los linfocitos T CD8⁺ vírgenes D3RKO/OT-1 transferidos producen significativamente menos IFN- γ que las células transferidas WT (Figura 10C). En conjunto, estos resultados apuntan a que la expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺ vírgenes contribuye de manera importante en la respuesta citotóxica antígeno-específica *in vivo*.

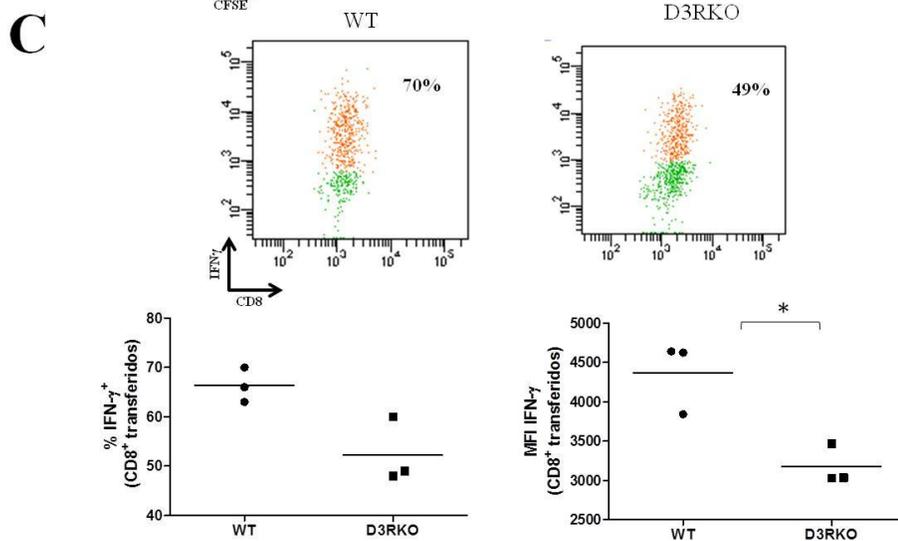
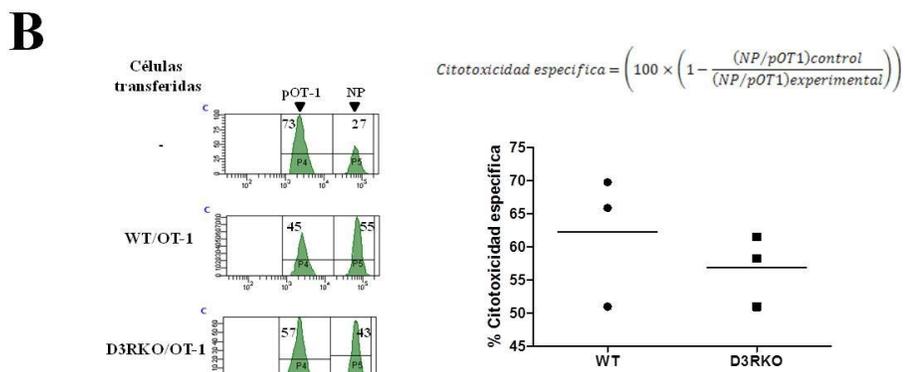
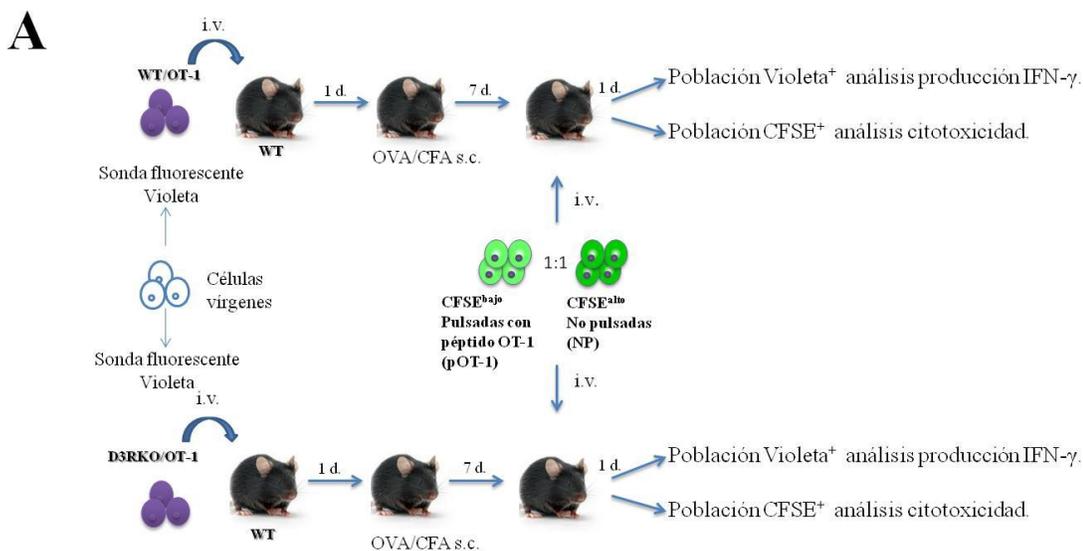


Figura 10. Linfocitos T CD8⁺ vírgenes deficientes en el D3R tienen menor capacidad de adquirir el fenotipo funcional Tc1 *in vivo*. (A) Esquema experimental: Linfocitos T CD8⁺ vírgenes (CD62L^{alto} CD44^{bajo}) fueron purificados a partir de ratones WT/OT-1 o D3RKO/OT-1, luego fueron teñidos con la sonda fluorescente Violeta *Cell Trace Violet* y posteriormente se inyectaron estos linfocitos i.v. (10⁶ linfocitos antígeno-específicos/ratón) en recipientes WT. Un día después, los animales fueron inmunizados con OVA/CFA y una vez transcurridos 7 días, se les inyectó i.v. una mezcla 1:1 correspondiente a una población de esplenocitos pulsados con péptido OT-1 (pOT-1, CFSE^{bajo}) y otra población que no fue pulsada (NP, CFSE^{alto}), la cual sirve como un control interno. Un día después se evaluó la citotoxicidad específica en la población CFSE⁺ (B) y la producción de IFN- γ en la población Violeta⁺ (C). En (B) se muestran histogramas representativos (paneles de la izquierda) de las poblaciones pulsadas y no pulsadas, donde el número inserto indica el porcentaje de cada población con respecto a las células CFSE⁺ totales. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como se indica en la fórmula arriba a la derecha. El gráfico (panel de la derecha) muestra todos los datos obtenidos junto a la citotoxicidad específica promedio. En (C) se muestran gráficos de puntos representativos (paneles superiores) de la producción de IFN- γ en la población CD8⁺. Los números indican el porcentaje de eventos IFN- γ ⁺ en la población CD8⁺. Los gráficos inferiores representan el porcentaje de células IFN- γ ⁺ (izquierda) y la MFI asociada a IFN- γ en la población CD8⁺ provenientes de 3 ratones por grupo experimental. La media de cada grupo se indica con una línea horizontal. *, p < 0,05 según el test *t* de Student no pareado, de dos colas).

6. DISCUSION

Este estudio evidencia que la expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺ promueve el desarrollo de inmunidad citotóxica. En primer lugar se determinó que la expresión de este receptor en linfocitos T CD8⁺ ocurre de manera transiente durante la diferenciación al fenotipo citotóxico. De la misma manera se determinó que estas células expresan componentes que permiten el transporte, almacenamiento y degradación de DA. La relevancia funcional de la expresión de este receptor, evaluada mediante el uso de ratones genéticamente deficientes en el D3R, determinó que este receptor favorece el fenotipo Tc1 tanto en linfocitos T CD8⁺ totales re-estimulados *ex vivo*, como en linfocitos T CD8⁺ vírgenes diferenciados a fenotipo Tc1 *in vitro*. De manera adicional, los datos obtenidos sugieren fuertemente que la expresión de este receptor contribuye en la respuesta citotóxica mediada por linfocitos T CD8⁺ *in vivo*.

En los últimos años el estudio de la regulación del sistema inmune por neurotransmisores muestra que estas moléculas pueden influenciar la activación y diferenciación de células T. En este sentido, diferentes reportes han indicado que el neurotransmisor DA es capaz de modular la activación y función de linfocitos T (Pacheco et al., 2009), sin embargo gran parte de los estudios han abordado la contribución de los diferentes DARs mediante el uso de fármacos. Adicionalmente, pocos estudios han demostrado de manera consistente la expresión de estos receptores en diferentes estados de activación de linfocitos T (McKenna, Ilani y quizás otros). Respecto de la expresión del DAR de mayor afinidad, el D3R, el grupo de O. Yoshie mostró previamente que es posible detectarlo a nivel de ARNm en linfocitos T CD8⁺ totales de bazo de ratón y en particular en linfocitos T CD8⁺ vírgenes obtenidos de humano. Sin embargo en este estudio no se determinó qué población en particular de células T CD8⁺ expresa el D3R en bazo de ratón (Watanabe et al., 2006). En contraste con dicho trabajo, los datos presentados en esta tesis indican que no es posible detectar ARNm del D3R en linfocitos T CD8⁺ totales de bazo de ratón y que este se induce al segundo día de inducción de diferenciación hacia el fenotipo Tc1. Los diferentes resultados obtenidos en esta tesis en comparación con los de Watanabe et al., podrían explicarse por diferencias en el grado de activación basal de los linfocitos T CD8⁺ en cada trabajo. De este modo, la presencia de infecciones o de mayor manipulación de las células

en el trabajo de Watanabe et al., podrían provocar una inducción en la expresión del D3R, lo que hace que se detecte en la población total de linfocitos T CD8⁺ recién purificados desde el bazo. Por otra parte, esta tesis da cuenta de que la expresión del D3R es transiente, detectándose solo dos días posterior al inicio del cultivo, indicando que la expresión de este receptor ocurre posterior a la activación de los linfocitos T CD8⁺. La cinética de inducción del D3R sugiere que la expresión de este receptor no es necesaria para la activación de los linfocitos T CD8⁺, sino más bien parece estar implicada en la consolidación del fenotipo Tc1. Adicionalmente, la expresión de este receptor puede ser consecuencia de la expresión de factores de transcripción maestros que inician la diferenciación de los linfocitos hacia un fenotipo efector Tc1, dado que la expresión tanto de Tbet como de Eomes antecede la expresión del D3R. Sin embargo, una vez que D3R se expresa, este parece ser necesaria para poder inducir una fuerte expresión de los factores de transcripción maestros Eomes y Tbet tardíamente durante el programa de diferenciación hacia Tc1, ya que la expresión de ambos factores de transcripción maestros se vio disminuida en células T CD8⁺ vírgenes D3RKO en vías de diferenciación hacia Tc1 (Figuras 8A y 8B).

En este trabajo se estudió por primera vez la expresión de componentes del sistema dopaminérgico en linfocitos T CD8⁺, lo cual había sido analizado previamente tanto en linfocitos T CD4⁺ como en DCs (Cosentino et al., 2007, Prado et al., 2012). Los resultados muestran que los linfocitos T CD8⁺ expresan SERT, MAO-A, MAO-B y VMAT2, lo que abre la posibilidad de que estas células almacenen y degraden DA, además de ser potencialmente capaces de transportar este neurotransmisor al interior de la célula por una vía no canónica mediante la utilización de SERT (Larsen et al., 2011). Estos resultados pueden ser validados en el futuro mediante determinaciones de internalización de DA marcada y a través de mediciones del contenido de DA endógena en estas células. La expresión de SERT en linfocitos T CD8⁺ nos indica que estas células podrían almacenar también serotonina, información que ya ha sido descrita para otras células inmunes (O'Connell et al., 2006, Leon-Ponte et al., 2007), pero no para células T CD8⁺. Considerando que tanto VMAT2 como las enzimas MAO pueden respectivamente transportar y degradar serotonina, este resultado también permite proyectar futuras investigaciones en las que se analice si linfocitos T CD8⁺ tienen capacidad de sintetizar y/o internalizar serotonina y, en

base a esto, estudiar cómo este neurotransmisor modularía la activación y desarrollo de linfocitos T CD8⁺.

A continuación se analizó la relevancia del D3R en la activación y adquisición de fenotipo efector en linfocitos T CD8⁺ totales, mediante el uso de células genéticamente deficientes en su expresión. Para esto se analizó la expresión de los factores de transcripción Tbet y Eomes característicos del fenotipo efector Tc1 (Zhu et al., 2010) (Figura 3A y B), los que son claves en la inducción de función citotóxica pues promueven la expresión de IFN- γ (Figura 5C), perforina 1 (Figura 5D) y granzima B (Figura 5E). Tal como se mencionó más arriba, los dos factores de transcripción analizados serían parcialmente dependientes de la expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺ durante la polarización hacia fenotipo Tc1, ya que se observó de manera consistente menores niveles tanto de Tbet como de Eomes en linfocitos T CD8⁺ deficientes en el D3R. Esta diferencia se observa incluso en los tiempos previos a la inducción de la expresión del D3R, lo que implica que este receptor podría expresarse en células precursoras de linfocitos T CD8⁺ afectando de esta manera la activación y/o diferenciación de linfocitos T CD8⁺.

En el caso de la expresión de IFN- γ , perforina 1 y granzima B, también se observó una menor expresión en linfocitos T CD8⁺ deficientes en el D3R. Esto sería una consecuencia de la expresión deficiente en los factores de transcripción Tbet y Eomes, los cuales modulan a su vez la expresión de estas moléculas. Es importante destacar que recientemente se han descrito otros factores de transcripción capaces de modular la expresión de moléculas efectoras como por ejemplo perforinas (Belz and Kallies, 2010). En particular Bcl-6 ha sido descrito que juega un importante rol en la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ y su expresión suprime la expresión de granzima B (Yoshida et al., 2006). De este modo, una proyección de este trabajo sería estudiar también otros factores de transcripción, los cuales al igual que Tbet y Eomes, podrían ser modulados por el D3R.

Al analizar la producción de IFN- γ a nivel de proteína en linfocitos T CD8⁺ totales inmediatamente después de aislar estas células del bazo, se vio un menor porcentaje de células

positivas para esta citoquina en células T CD8⁺ que carecen del D3R. En este caso es posible que estas diferencias se deban a que se trabajó con linfocitos T CD8⁺ totales, los que contienen a diferentes poblaciones como células vírgenes, de memoria y efectoras, entre otras. Las células vírgenes representan aproximadamente el 80% de los linfocitos T CD8⁺ y en este estudio confirmamos que no tienen la capacidad de producir IFN- γ , por lo que no contribuyen a la diferencia observada con linfocitos T CD8⁺ totales (Figura 7B). Por otra parte, al analizar linfocitos T CD8⁺ de memoria, los cuales ante el reencuentro con el antígeno son capaces de producir rápidamente IFN- γ (Kambayashi et al., 2003, Jabbari and Harty, 2006), tampoco se observó una diferencia entre ambos genotipos en la capacidad de producir esta citoquina (Figura 7D). De igual manera, no se observaron diferencias en la producción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8⁺ efectores purificados de ratones normales o deficientes en el D3R (Figura 7C). De este modo, las diferencias observadas en la producción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8⁺ totales no se deben a una menor expresión de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8⁺ vírgenes, de memoria o efectores deficientes en el D3R lo que permite sugerir que la población responsable de dicha diferencia sean los linfocitos T CD8⁺ que expresan bajos niveles tanto de CD62L y CD44, la cual no fue analizada en este estudio. Esta población incluye a los linfocitos T CD8⁺ de memoria central y memoria efectores, los cuales también pueden producir IFN- γ en respuesta a re-estimulación y que por lo tanto podrían ser evaluados en el futuro. Es importante destacar que el resultado obtenido con linfocitos T CD8⁺ totales es consistente con lo obtenido por Ilani et al. quienes mediante herramientas farmacológicas reportaron que la estimulación de linfocitos T CD8⁺ humanos con un agonista del D3R induce la expresión de IFN- γ . Este trabajo demuestra mediante otra metodología que la función de este receptor en los linfocitos T CD8⁺ sería la de favorecer el desarrollo del fenotipo Tc1.

Es importante notar también que los análisis de expresión a nivel de proteína no muestran diferencias en la expresión de IFN- γ , granzima B y LAMP-1 en linfocitos T CD8⁺ totales, lo que se correlaciona bien con los datos obtenidos mediante PCR cuantitativo (Figura 5). Es posible que futuras determinaciones de los niveles de proteína a tiempos más cortos permitan evidenciar diferencias entre ambos genotipos de linfocitos T CD8⁺. Se debe hacer notar también los problemas que reviste el trabajar con la diferenciación de una población heterogénea como los

linfocitos T CD8⁺ totales, ya que diferentes respuestas influenciadas por el D3R pueden estar siendo enmascaradas.

Debido a lo anterior, se continuó la investigación con células vírgenes puesto que estas células son una población clave en el inicio de la respuesta inmune. Estas tienen la capacidad de diferenciarse a los diferentes linajes de linfocitos T CD8⁺ como células de memoria, efectoras o reguladoras (Curtsinger et al., 2003, Chang et al., 2007, Stemberger et al., 2007, Gerlach et al., 2010), por lo que la modulación de su función por el D3R podría tener gran relevancia en el origen de las diferentes poblaciones de linfocitos T CD8⁺. En este caso también se observó una menor expresión tanto de los factores de transcripción Tbet y Eomes como de las moléculas efectoras durante el cultivo de polarización a Tc1 por parte de los linfocitos T CD8⁺ deficientes en el D3R, lo que a su vez se correlacionó con una menor expresión a nivel de proteína tanto de IFN- γ como de granzima B y LAMP-1 (Figura 9), sugiriendo fuertemente que la expresión de este receptor en linfocitos T CD8⁺ vírgenes promueve la adquisición del fenotipo citotóxico. Es importante mencionar que no existen trabajos que hayan evaluado la contribución de este receptor en la funcionalidad de esta subpoblación de linfocitos T CD8⁺ de esta manera. Una proyección de este trabajo es evaluar la inducción de la expresión del D3R a nivel de proteína en condiciones de polarización a fenotipo Tc1 utilizando linfocitos T CD8⁺ vírgenes, con el fin de relacionar la expresión de los diversos factores con la cinética de expresión del receptor. De manera importante, en este trabajo se evaluó la relevancia del D3R expresado en linfocitos T CD8⁺ vírgenes *in vivo* mediante ensayos de citotoxicidad antígeno-específicos. En línea con los resultados expuestos previamente, se observó que la expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺ vírgenes favorece el desarrollo de actividad citotoxicidad *in vivo*, correlacionándose con la expresión de IFN- γ *in vivo* (Figura 10C). Aunque estos datos no son estadísticamente significativos, la repetición de estos experimentos permitirá definir mejor la magnitud de estas diferencias. Una proyección de estos resultados, considerando lo demostrado por Watanabe et al., en términos de la regulación de la migración de los linfocitos T CD8⁺ por parte del D3R, es evaluar la capacidad linfocitos T CD8⁺ normales o deficientes en el D3R de migrar hacia diferentes tejidos, lo cual podría permitir explicar los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* realizados en esta tesis. Otra proyección sería el uso de un modelo de crecimiento tumoral o

de infección viral, con el fin de evaluar la relevancia de la expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺ durante una respuesta inmune protectora.

7. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en esta tesis permiten concluir que linfocitos T CD8⁺ de ratón expresan el D3R luego de la activación de estas células, teniendo además la capacidad de almacenar, internalizar y degradar DA. Por otra parte, fue posible mostrar que la expresión de este receptor favorece la polarización de células T CD8⁺ al fenotipo efector Tc1 *in vitro*, mediante la modulación de los niveles de expresión tanto de los factores de transcripción Tbet y Eomes, como de las moléculas efectoras IFN- γ y LAMP-1 en un tiempo inicial en linfocitos T CD8⁺ totales.

Este trabajo muestra que la presencia del D3R en linfocitos T CD8⁺ vírgenes favorece la polarización de esta población al fenotipo Tc1, potenciando la expresión de marcadores de este fenotipo. De manera adicional, se concluye que la expresión del D3R en linfocitos T CD8⁺ vírgenes favorece tanto la diferenciación a fenotipo Tc1 como la función citotóxica *in vivo*, indicando que este receptor cumple un papel relevante en la regulación de la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8⁺. De este modo, se presentan antecedentes adicionales sobre cómo la respuesta inmune puede ser modulada por DA. Finalmente, es posible proponer que la estimulación del D3R en linfocitos T CD8⁺ tendría un potencial en el desarrollo de inmunoterapias para cáncer así como también en la potenciación de respuestas contra patógenos intracelulares como virus y bacterias.

8. LITERATURA CITADA

- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2274-8.
- BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBECQUE, S., LIU, Y. J., PULENDRAN, B. & PALUCKA, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18, 767-811.
- BANERJEE, A., GORDON, S. M., INTLEKOFER, A. M., PALEY, M. A., MOONEY, E. C., LINDSTEN, T., WHERRY, E. J. & REINER, S. L. 2010. Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8+ T cells to compete for the memory cell niche. *J Immunol*, 185, 4988-92.
- BECK, G., BRINKKOEETTER, 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. *Crit Care*, 8, 485-91.
- BELZ, G. T. & KALLIES, A. 2010. Effector and memory CD8+ T cell differentiation: toward a molecular understanding of fate determination. *Curr Opin Immunol*, 22, 279-85.
- BEN-JONATHAN, N. & HNASKO, R. 2001. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev*, 22, 724-63.
- BERKE, G. 1995. The CTL's kiss of death. *Cell*, 81, 9-12.
- 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. *J Neuroimmunol*, 169, 161-71.
- BILLIAU, A. 1996. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol*, 62, 61-130.
- BLOTT, E. J. & GRIFFITHS, G. M. 2002. Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 122-31.
- BOEHM, U., KLAMP, T., GROOT, M. & HOWARD, J. C. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, 15, 749-95.
- BOLITHO, P., STREET, S. E., WESTWOOD, J. A., EDELMANN, W., MACGREGOR, D., WARING, P., MURRAY, W. K., GODFREY, D. I., TRAPANI, J. A., JOHNSTONE, R. W. & SMYTH, M. J. 2009. Perforin-mediated suppression of B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 2723-8.
- CENCI, M. A. 2007. Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia. *Trends Neurosci*, 30, 236-43.
- 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. *J Exp Med*, 178, 2243-7.
- COSENTINO, M., BOMBELLI, R., FERRARI, M., MARINO, F., RASINI, E., MAESTRONI, G. J., CONTI, A., BOVERI, M., LECCHINI, S. & FRIGO, G. 2000. HPLC-ED measurement of endogenous catecholamines in human immune cells and hematopoietic cell lines. *Life Sci*, 68, 283-95.
- COSENTINO, M., FIETTA, A. M., FERRARI, M., RASINI, E., BOMBELLI, R., CARCANO, E., SAPORITI, F., MELONI, F., MARINO, F. & 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, 632-42.
- 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. *J Immunol*, 187, 4219-28.
- 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. *J Exp Med*, 180, 1715-28.

- CURTSINGER, J. M., LINS, D. C. & MESCHER, M. F.** 2003. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med*, 197, 1141-51.
- CHANG, J. T., PALANIVEL, V. R., KINJYO, I., SCHAMBACH, F., INTLEKOFER, A. M., BANERJEE, A., LONGWORTH, S. A., VINUP, K. E., MRASS, P., OLIARO, J., KILLEEN, N., ORANGE, J. S., RUSSELL, S. M., WENINGER, W. & REINER, S. L.** 2007. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science*, 315, 1687-91.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 9809-14.
- DAYAN, P.** 2009. Dopamine, reinforcement learning, and addiction. *Pharmacopsychiatry*, 42 Suppl 1, S56-65.
- DE SAINT BASILE, G., MENASCHE, G. & FISCHER, A.** 2010. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat Rev Immunol*, 10, 568-79.
- DENKERS, E. Y. & GAZZINELLI, R. T.** 1998. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev*, 11, 569-88.
- DOBRZANSKI, M. J., REOME, J. B., HOLLENBAUGH, J. A. & DUTTON, R. W.** 2004a. Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses. *J Immunol*, 172, 1380-90.
- DOBRZANSKI, M. J., REOME, J. B., HOLLENBAUGH, J. A., HYLIND, J. C. & DUTTON, R. W.** 2004b. Effector cell-derived lymphotoxin alpha and Fas ligand, but not perforin, promote Tc1 and Tc2 effector cell-mediated tumor therapy in established pulmonary metastases. *Cancer Res*, 64, 406-14.
- DOBRZANSKI, M. J., REOME, J. B., HYLIND, 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. *J Immunol*, 177, 8191-201.
- DUSTIN, M. L. & SHAW, A. S.** 1999. Costimulation: building an immunological synapse. *Science*, 283, 649-50.
- 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. *Pharmacol Rev*, 52, 595-638.
- FONG, T. A. & MOSMANN, T. R.** 1990. Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *J Immunol*, 144, 1744-52.
- FRANCO, R., PACHECO, R., LLUIS, C., AHERN, G. P. & O'CONNELL, P. J.** 2007. The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends Immunol*, 28, 400-7.
- GARCIA-HERNANDEZ MDE, 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. *J Immunol*, 184, 4215-27.
- GERLACH, C., VAN HEIJST, J. W., SWART, E., SIE, D., ARMSTRONG, N., KERKHOVEN, R. M., ZEHN, D., BEVAN, M. J., SCHEPERS, K. & SCHUMACHER, T. N.** 2010. One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation. *J Exp Med*, 207, 1235-46.
- GIORELLI, M., LIVREA, P. & TROJANO, M.** 2005. Dopamine fails to regulate activation of peripheral blood lymphocytes from multiple sclerosis patients: effects of IFN-beta. *J Interferon Cytokine Res*, 25, 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. *Nat Rev Immunol*, 4, 900-11.

- GRAKOU, 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*, 285, 221-7.
- HAMADA, H., GARCIA-HERNANDEZ MDE, L., REOME, J. B., MISRA, S. K., STRUTT, T. M., MCKINSTRY, K. K., COOPER, A. M., SWAIN, S. L. & DUTTON, R. W.** 2009. Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol*, 182, 3469-81.
- HAMANN, A., KLUGEWITZ, K., AUSTRUP, F. & JABLONSKI-WESTRICH, D.** 2000. Activation induces rapid and profound alterations in the trafficking of T cells. *Eur J Immunol*, 30, 3207-18.
- HAMANN, D., BAARS, P. A., REP, M. H., HOOIBRINK, B., KERKHOF-GARDE, S. R., KLEIN, M. R. & VAN LIER, R. A.** 1997. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med*, 186, 1407-18.
- 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. *Biochem Biophys Res Commun*, 266, 129-34.
- HARTY, J. T. & BADOVINAC, V. P.** 2002. Influence of effector molecules on the CD8(+) T cell response to infection. *Curr Opin Immunol*, 14, 360-5.
- HARTY, J. T. & BADOVINAC, V. P.** 2008. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol*, 8, 107-19.
- 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. *J Immunol*, 166, 6500-8.
- HENKART, P. A. & SITKOVSKY, M. V.** 1994. Cytotoxic lymphocytes. Two ways to kill target cells. *Curr Biol*, 4, 923-5.
- 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. *Eur J Immunol*, 35, 25-30.
- HEUSEL, J. W., WESSELSCHMIDT, R. L., SHRESTA, S., RUSSELL, J. H. & LEY, T. J.** 1994. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell*, 76, 977-87.
- HOENICKA, J., ARAGUES, M., PONCE, G., RODRIGUEZ-JIMENEZ, R., JIMENEZ-ARRIERO, M. A. & PALOMO, T.** 2007. From dopaminergic genes to psychiatric disorders. *Neurotox Res*, 11, 61-72.
- HUSTER, K. M., BUSCH, V., SCHIEMANN, M., LINKEMANN, K., KERKSIEK, K. M., WAGNER, H. & BUSCH, D. H.** 2004. Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 5610-5.
- IKEN, K., CHHENG, S., FARGIN, A., GOULET, A. C. & KOUASSI, E.** 1995. Serotonin upregulates mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation through 5-HT1A receptors. *Cell Immunol*, 163, 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 J*, 18, 1600-2.
- INTLEKOFER, A. M., TAKEMOTO, N., WHERRY, E. J., LONGWORTH, S. A., NORTHRUP, J. T., PALANIVEL, V. R., MULLEN, A. C., GASINK, C. R., KAECH, S. M., MILLER, J. D., GAPIN, L., RYAN, K., RUSS, A. P., LINDSTEN, T., ORANGE, J. S., GOLDRATH, A. W., AHMED, R. & REINER, S. L.** 2005. Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol*, 6, 1236-44.
- JABBARI, A. & HARTY, J. T.** 2006. Secondary memory CD8+ T cells are more protective but slower to acquire a central-memory phenotype. *J Exp Med*, 203, 919-32.

- JENKINS, M. K. & JOHNSON, J. G.** 1993. Molecules involved in T-cell costimulation. *Curr Opin Immunol*, 5, 361-7.
- JIMENEZ, J. L., PUNZON, C., NAVARRO, J., MUNOZ-FERNANDEZ, 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. *J Pharmacol Exp Ther*, 299, 753-9.
- JOSHI, N. S., CUI, W., CHANDELE, A., LEE, H. K., URSO, D. R., HAGMAN, J., GAPIN, L. & KAECH, S. M.** 2007. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity*, 27, 281-95.
- KAECH, S. M., HEMBY, S., KERSH, E. & AHMED, R.** 2002a. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell*, 111, 837-51.
- KAECH, S. M., WHERRY, E. J. & AHMED, R.** 2002b. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*, 2, 251-62.
- KAGI, D., LEDERMANN, B., BURKI, K., ZINKERNAGEL, R. M. & HENGARTNER, H.** 1996. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol*, 14, 207-32.
- KAGI, D., VIGNAUX, F., LEDERMANN, B., BURKI, K., DEPRAETERE, V., NAGATA, S., HENGARTNER, H. & GOLSTEIN, P.** 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*, 265, 528-30.
- KAISERMAN, D., BIRD, C. H., SUN, J., MATTHEWS, A., UNG, K., WHISSTOCK, J. C., THOMPSON, P. E., TRAPANI, J. A. & BIRD, P. I.** 2006. The major human and mouse granzymes are structurally and functionally divergent. *J Cell Biol*, 175, 619-30.
- KAMBAYASHI, T., ASSARSSON, E., LUKACHER, A. E., LJUNGGREN, H. G. & JENSEN, P. E.** 2003. Memory CD8+ T cells provide an early source of IFN-gamma. *J Immunol*, 170, 2399-408.
- KAWASHIMA, K. & FUJII, T.** 2003. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci*, 74, 675-96.
- KEMP, R. A. & RONCHESE, F.** 2001. Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity. *J Immunol*, 167, 6497-502.
- KIPNIS, J., CARDON, M., AVIDAN, H., LEWITUS, G. M., MORDECHAY, S., ROLLS, A., SHANI, Y. & SCHWARTZ, M.** 2004. Dopamine, through the extracellular signal-regulated kinase pathway, downregulates CD4+CD25+ regulatory T-cell activity: implications for neurodegeneration. *J Neurosci*, 24, 6133-43.
- 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. *J Immunol*, 168, 6314-22.
- KONDO, T., TAKATA, H., MATSUKI, F. & TAKIGUCHI, M.** 2009. Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17. *J Immunol*, 182, 1794-8.
- KORN, T., BETTELLI, E., OUKKA, M. & KUCHROO, V. K.** 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*, 27, 485-517.
- LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F.** 2001. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*, 106, 263-6.
- LARSEN, M. B., SONDEERS, M. S., MORTENSEN, O. V., LARSON, G. A., ZAHNISER, N. R. & AMARA, S. G.** 2011. Dopamine transport by the serotonin transporter: a mechanistically distinct mode of substrate translocation. *J Neurosci*, 31, 6605-15.
- LEON-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, 3139-46.
- LESLEY, J., HYMAN, R. & KINCADE, P. W.** 1993. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol*, 54, 271-335.

- MACKAY, C. R. 1993. Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, 5, 423-7.
- MARTINVALET, D., DYKXHOORN, D. M., FERRINI, R. & LIEBERMAN, J. 2008. Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell*, 133, 681-92.
- MASOPUST, D., VEZYS, V., MARZO, A. L. & LEFRANCOIS, L. 2001. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*, 291, 2413-7.
- MASSON, F., MOUNT, A. M., WILSON, N. S. & BELZ, G. T. 2008. Dendritic cells: driving the differentiation programme of T cells in viral infections. *Immunol Cell Biol*, 86, 333-42.
- 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. *J Neuroimmunol*, 132, 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. *J Neuroimmunol*, 206, 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. *Auton Autacoid Pharmacol*, 26, 183-9.
- MISSALE, C., NASH, S. R., ROBINSON, S. W., JABER, M. & CARON, M. G. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*, 78, 189-225.
- 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. *J Exp Med*, 193, 271-80.
- 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, 82-6.
- NAGATA, S. & GOLSTEIN, P. 1995. The Fas death factor. *Science*, 267, 1449-56.
- 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. *Biochem Biophys Res Commun*, 373, 286-91.
- NAKANO, K., HIGASHI, T., TAKAGI, R., HASHIMOTO, K., TANAKA, Y. & MATSUSHITA, S. 2009. Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. *Int Immunol*, 21, 645-54.
- NEVE, K. A., SEAMANS, J. K. & TRANTHAM-DAVIDSON, H. 2004. Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res*, 24, 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. *J Pharmacol Sci*, 92, 7-12.
- NOURI-SHIRAZI, M., BANCHEREAU, J., FAY, J. & PALUCKA, K. 2000. Dendritic cell based tumor vaccines. *Immunol Lett*, 74, 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, 1010-7.
- O'GARRA, A. & ARAI, N. 2000. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol*, 10, 542-50.
- PACHECO, R., CIRUELA, F., CASADO, V., MALLOL, J., GALLART, T., LLUIS, C. & FRANCO, R. 2004. Group I metabotropic glutamate receptors mediate a dual role of glutamate in T cell activation. *J Biol Chem*, 279, 33352-8.
- PACHECO, R., GALLART, T., LLUIS, C. & FRANCO, R. 2007. Role of glutamate on T-cell mediated immunity. *J Neuroimmunol*, 185, 9-19.

- PACHECO, R., OLIVA, H., MARTINEZ-NAVIO, J. M., CLIMENT, N., CIRUELA, F., GATELL, J. M., GALLART, T., MALLOL, J., LLUIS, C. & FRANCO, R. 2006. Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation. *J Immunol*, 177, 6695-704.
- PACHECO, R., PRADO, C. E., BARRIENTOS, M. J. & BERNALES, S. 2009. Role of dopamine in the physiology of T-cells and dendritic cells. *J Neuroimmunol*, 216, 8-19.
- PACHECO, R., CONTRERAS, F. & PRADO, C. 2012. Cells, Molecules and Mechanisms Involved in the Neuro-Immune Interaction. *Cell Interaction*, InTech Europe, 139-166p.
- PALMER, E. 2003. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol*, 3, 383-91.
- PARDO, J., AGUILO, J. I., ANEL, A., MARTIN, P., JOECKEL, L., BORNER, C., WALLICH, R., MULLBACHER, A., FROELICH, C. J. & SIMON, M. M. 2009. The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes Infect*, 11, 452-9.
- PARKER, D. C. 1993. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol*, 11, 331-60.
- PEARCE, E. L., MULLEN, A. C., MARTINS, G. A., KRAWCZYK, C. M., HUTCHINS, A. S., ZEDIAK, V. P., BANICA, M., DICIOCCIO, C. B., GROSS, D. A., MAO, C. A., SHEN, H., CEREB, N., YANG, S. Y., LINDSTEN, T., ROSSANT, J., HUNTER, C. A. & REINER, S. L. 2003. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science*, 302, 1041-3.
- POTVIN, S., GRIGNON, S. & MARCHAND, S. 2009. Human evidence of a supra-spinal modulating role of dopamine on pain perception. *Synapse*, 63, 390-402.
- PRADO, C., CONTRERAS, F., GONZALEZ, H., DIAZ, P., ELGUETA, D., BARRIENTOS, M., HERRADA, A. A., LLADSER, A., BERNALES, S. & PACHECO, R. 2012. Stimulation of dopamine receptor d5 expressed on dendritic cells potentiates th17-mediated immunity. *J Immunol*, 188, 3062-70.
- 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 Res*, 62, 4406-12.
- 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 Res*, 63, 4095-100.
- 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. *Cell Signal*, 12, 557-63.
- REINER, S. L., SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. 2007. Division of labor with a workforce of one: challenges in specifying effector and memory T cell fate. *Science*, 317, 622-5.
- RUSS, A. P., WATTLER, S., COLLEDGE, W. H., APARICIO, S. A., CARLTON, M. B., PEARCE, J. J., BARTON, S. C., SURANI, M. A., RYAN, K., NEHLS, M. C., WILSON, V. & EVANS, M. J. 2000. Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature*, 404, 95-9.
- RUSSELL, J. H. & LEY, T. J. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*, 20, 323-70.
- RUTISHAUSER, R. L. & KAECH, S. M. 2010. Generating diversity: transcriptional regulation of effector and memory CD8 T-cell differentiation. *Immunol Rev*, 235, 219-33.
- RYAN, K., GARRETT, N., MITCHELL, A. & GURDON, J. B. 1996. Eomesodermin, a key early gene in *Xenopus* mesoderm differentiation. *Cell*, 87, 989-1000.
- SAD, S., MARCOTTE, R. & MOSMANN, T. R. 1995. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity*, 2, 271-9.
- 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+ and CD8+ T cells in vitro: a receptor-mediated mechanism. *Neuroimmunomodulation*, 9, 23-33.

- SALLUSTO, F., LENIG, D., FORSTER, R., LIPP, M. & LANZAVECCHIA, A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401, 708-12.
- 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, 209-15.
- 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. *J Immunol*, 177, 7525-9.
- SCHOENBORN, J. R. & WILSON, C. B. 2007. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*, 96, 41-101.
- SCHULZ, E. G., MARIANI, L., RADBRUCH, A. & HOFER, T. 2009. Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12. *Immunity*, 30, 673-83.
- SHTRICHMAN, R. & SAMUEL, C. E. 2001. The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Curr Opin Microbiol*, 4, 251-9.
- SIBLEY, D. R., MONSMA, F. J., JR. & SHEN, Y. 1993. Molecular neurobiology of dopaminergic receptors. *Int Rev Neurobiol*, 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. *Mol Neurobiol*, 16, 125-34.
- STEMBERGER, C., HUSTER, K. M., KOFFLER, M., ANDERL, F., SCHIEMANN, M., WAGNER, H. & BUSCH, D. H. 2007. A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity*, 27, 985-97.
- STRANGE, P. G. 1993. New insights into dopamine receptors in the central nervous system. *Neurochem Int*, 22, 223-36.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15818-23.
- SZABO, S. J., SULLIVAN, B. M., PENG, S. L. & GLIMCHER, L. H. 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*, 21, 713-58.
- SZABO, S. J., SULLIVAN, B. M., STEMMANN, C., SATOSKAR, A. R., SLECKMAN, B. P. & GLIMCHER, L. H. 2002. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science*, 295, 338-42.
- 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. *J Immunol*, 173, 5298-304.
- TORRES, G. E., GAINETDINOV, R. R. & CARON, M. G. 2003. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci*, 4, 13-25.
- TRAPANI, J. A., DAVIS, J., SUTTON, V. R. & SMYTH, M. J. 2000. Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Curr Opin Immunol*, 12, 323-9.
- 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. *J Biol Chem*, 273, 27934-8.
- TRAPANI, J. A. & SMYTH, M. J. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*, 2, 735-47.
- VANG, T., TORGERSEN, K. M., SUNDVOLD, V., SAXENA, M., LEVY, F. O., SKALHEGG, B. S., HANSSON, V., MUSTELIN, T. & TASKEN, K. 2001. Activation of the COOH-terminal Src kinase

- (Csk) by cAMP-dependent protein kinase inhibits signaling through the T cell receptor. *J Exp Med*, 193, 497-507.
- VOSKOBOINIK, I., SMYTH, M. J. & TRAPANI, J. A.** 2006. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 6, 940-52.
- 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. *Annu Rev Immunol*, 17, 331-67.
- WATANABE, Y., NAKAYAMA, T., NAGAKUBO, D., HIESHIMA, K., JIN, Z., KATOU, F., HASHIMOTO, K. & YOSHIE, O.** 2006. Dopamine selectively induces migration and homing of naive CD8+ T cells via dopamine receptor D3. *J Immunol*, 176, 848-56.
- WEIHE, E., DEPBOYLU, C., SCHUTZ, B., SCHAFER, M. K. & EIDEN, L. E.** 2006. Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression. *Cell Mol Neurobiol*, 26, 659-78.
- WILLIAMS, M. A. & BEVAN, M. J.** 2007. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol*, 25, 171-92.
- WISE, R. A.** 2008. Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. *Neurotox Res*, 14, 169-83.
- WRONA, D.** 2006. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol*, 172, 38-58.
- YANG, Y., WANG, H., YU, H., YEAP, B. Y., LIANG, T., WANG, G., CHENG, T. & 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, 3721-4.
- YE, Z., TANG, C., XU, S., ZHANG, B., ZHANG, X., MOYANA, T., YANG, J. & XIANG, J.** 2007. Type 1 CD8+ T cells are superior to type 2 CD8+ T cells in tumor immunotherapy due to their efficient cytotoxicity, prolonged survival and type 1 immune modulation. *Cell Mol Immunol*, 4, 277-85.
- YOSHIDA, K., SAKAMOTO, A., YAMASHITA, K., ARGUNI, E., HORIGOME, S., ARIMA, M., HATANO, M., SEKI, N., ICHIKAWA, T. & TOKUHISA, T.** 2006. Bcl6 controls granzyme B expression in effector CD8+ T cells. *Eur J Immunol*, 36, 3146-56.
- ZHU, Y., JU, S., CHEN, E., DAI, S., LI, C., MOREL, P., LIU, L., ZHANG, X. & LU, B.** 2010. T-bet and eomesodermin are required for T cell-mediated antitumor immune responses. *J Immunol*, 185, 3174-83.