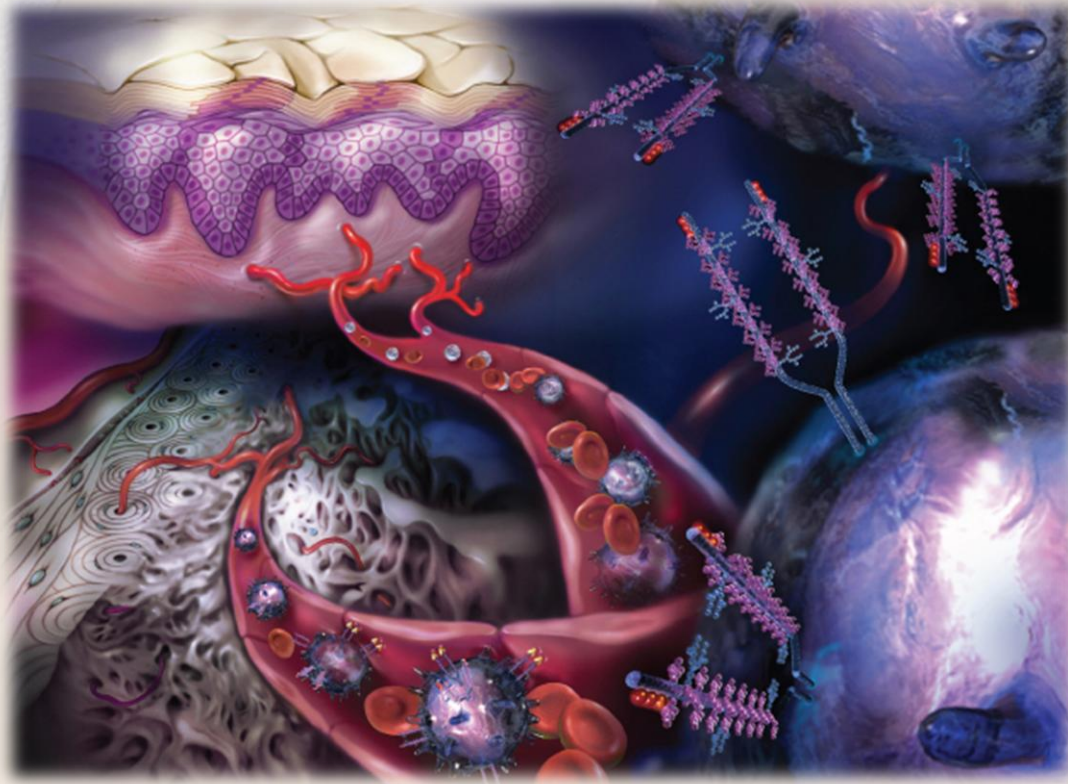


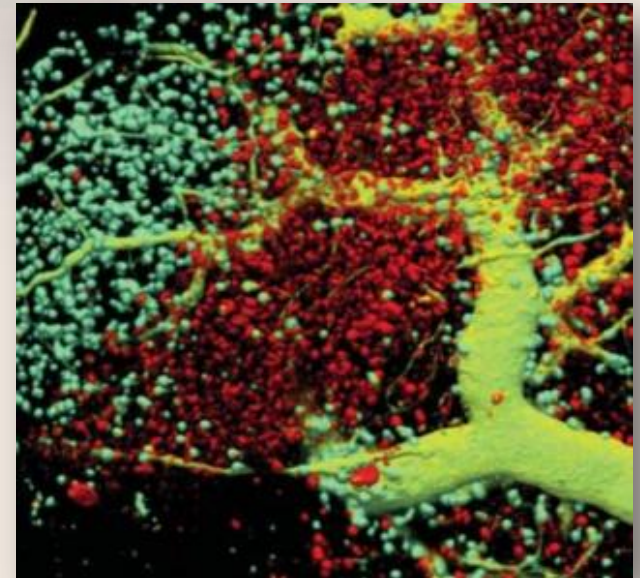
Recirculación y alojamiento



Luisa E. Barboza C.

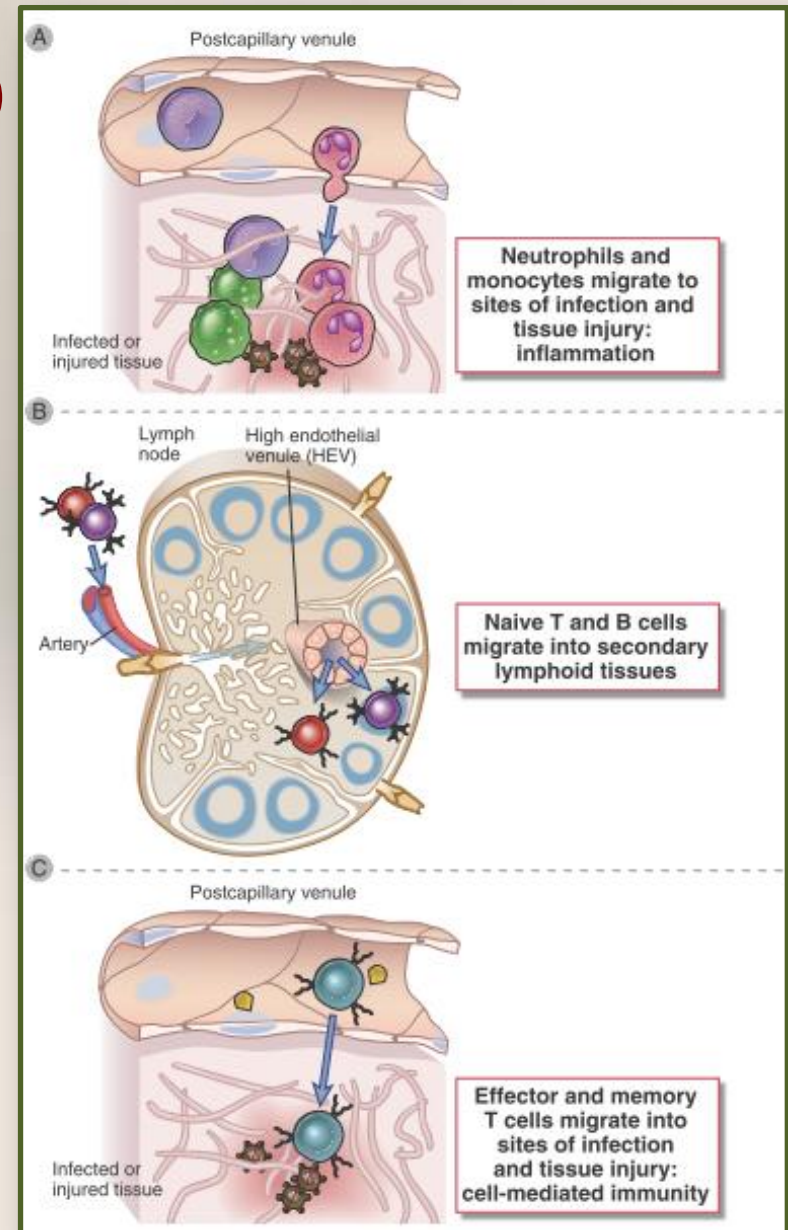
Contenido

- Generalidades
- Interacciones entre los leucocitos y el endotelio
 - Células endoteliales altas
 - Extravasación de los leucocitos
- Moléculas de adhesión:
 - Selectinas y sus ligandos
 - Integrinas y sus ligandos
- Quimiocinas y sus receptores



Tráfico leucocitario

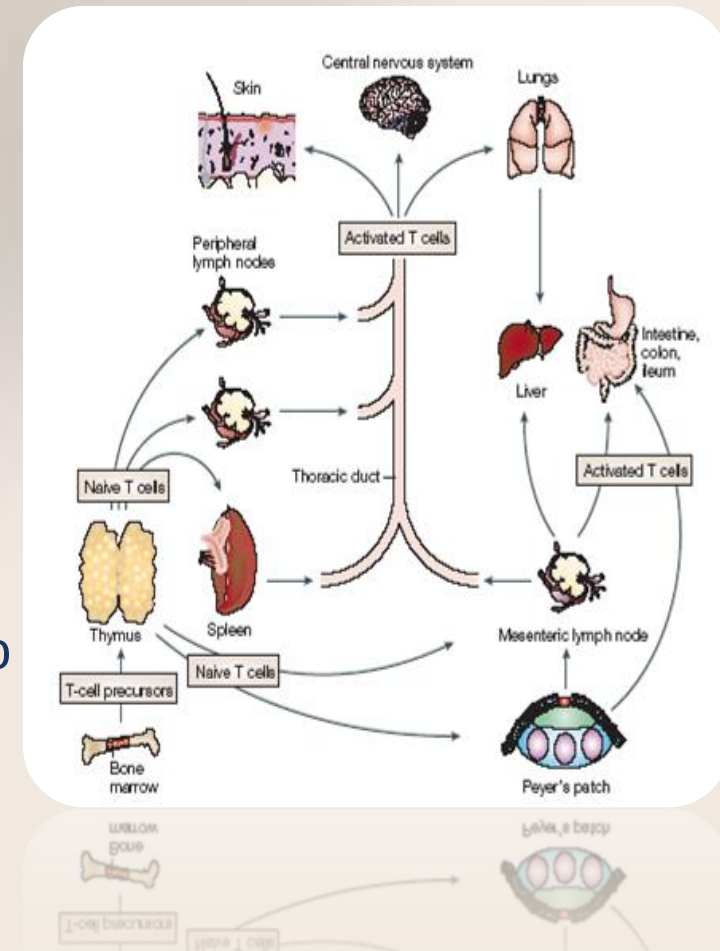
- Proceso altamente regulado:
 - Reclutamiento de neutrófilos y monocitos desde los sitios de generación hacia el sitio de la infección o de daño
 - Transporte los linfocitos desde los sitios de maduración hacia los órganos linfoides secundarios
 - Movilizar a los linfocitos desde los órganos secundarios hacia el sitio de infección



Recirculación y alojamiento de los leucocitos

Objetivos fundamentales de la recirculación y alojamiento:

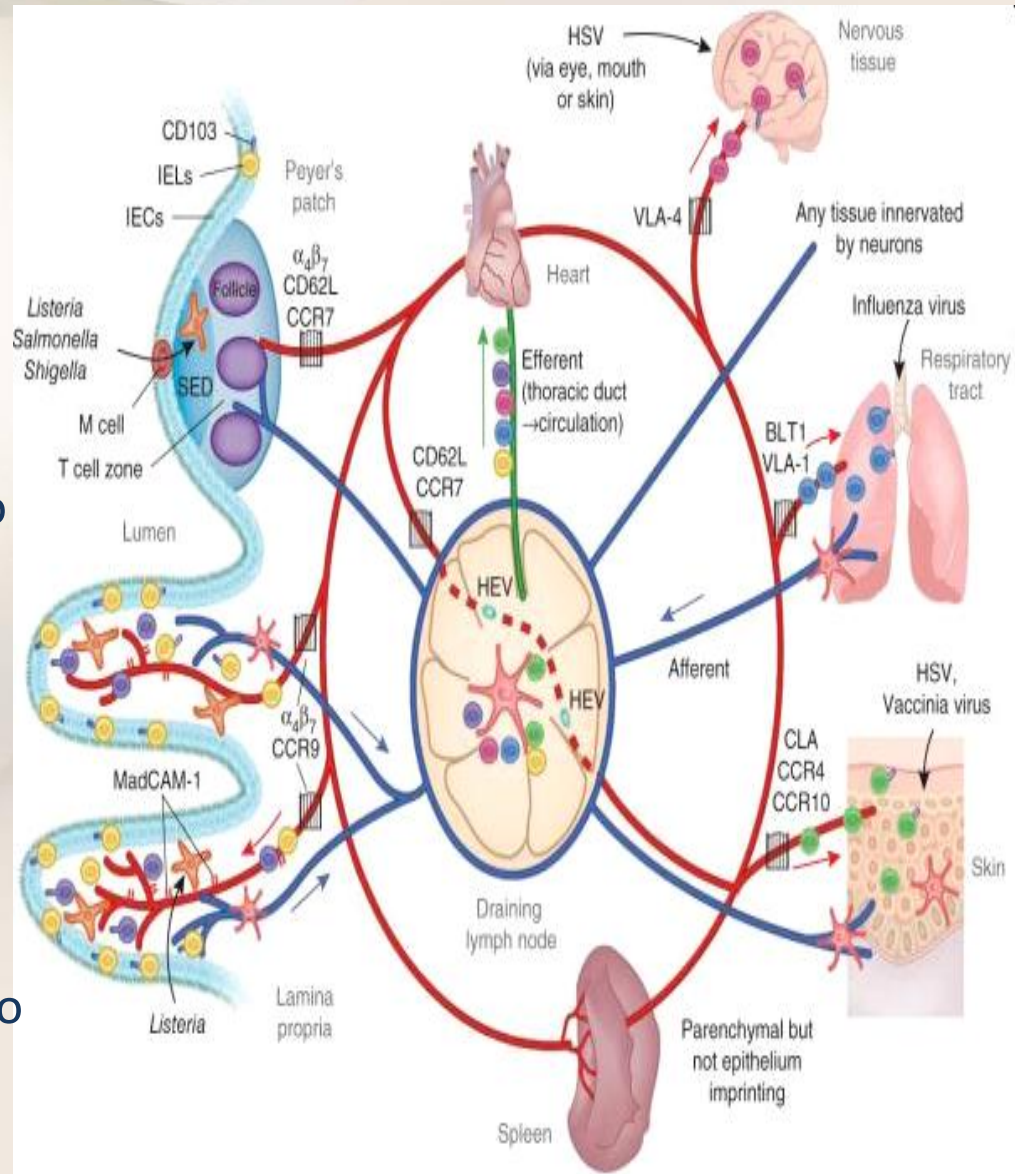
- Balance en la distribución de linfocitos en los tejidos
- Selección de linfocitos Ag-específicos (órganos linfoides secundarios)
- Renovación continua de los microambientes
- Representantes en todo el cuerpo de linfocitos específicos para un determinado Ag
- Reclutamiento rápido a los sitios de inflamación



Recirculación de linfocitos

Tráfico no es aleatorio

- Células T naïve recirculan constantemente en NL
 - No tienen acceso a la tejido no linfoide: piel, pulmón, TGI
- Células de memoria y efectoras, capacidad de circulación mas amplia, virtualmente pueden penetrar en cualquier tejido linfoide o no linfoide
 - Tendencia a ubicarse en su sitio de origen



Migración leucocitaria

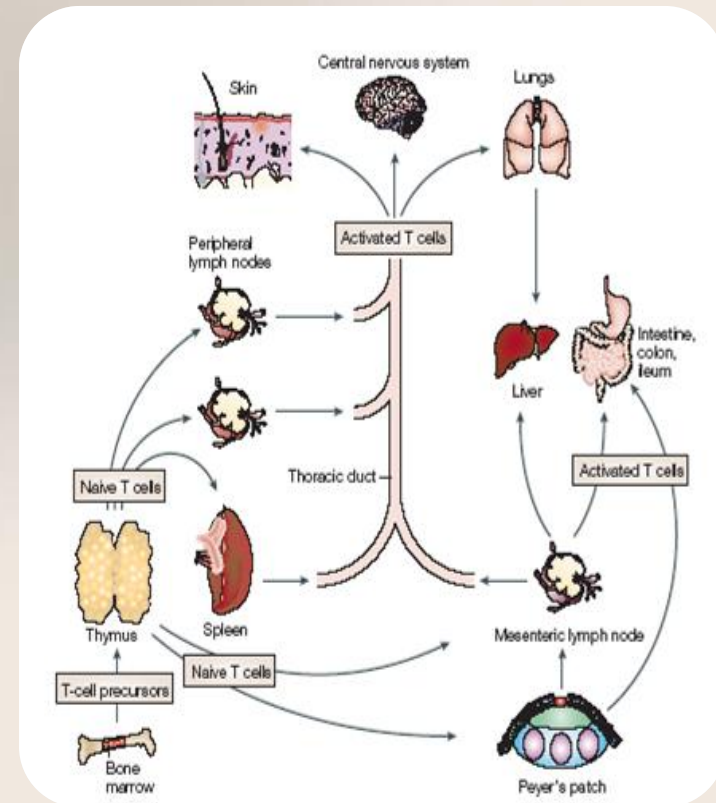
Proceso organizado

- Interacciones secuenciales entre los leucocitos y células endoteliales vasculares
- Qué determina la distribución y tráfico diferencial?
 - ✓ Expresión y activación diferencial de receptores de quimiocinas y de integrinas



Principios generales de la migración leucocitaria

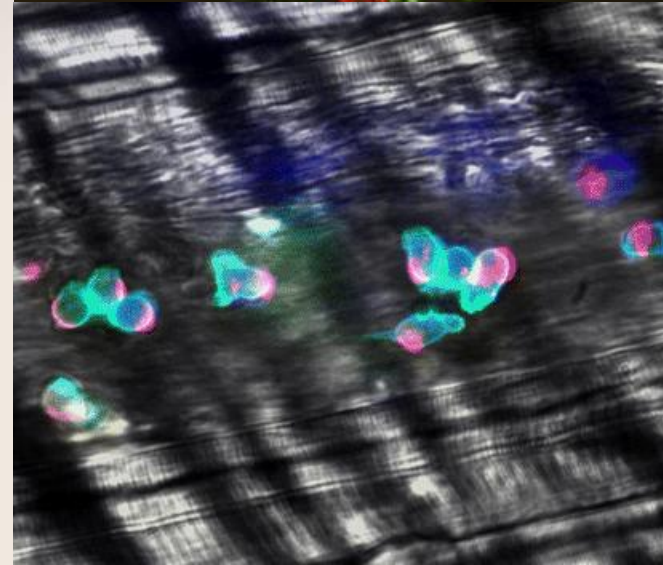
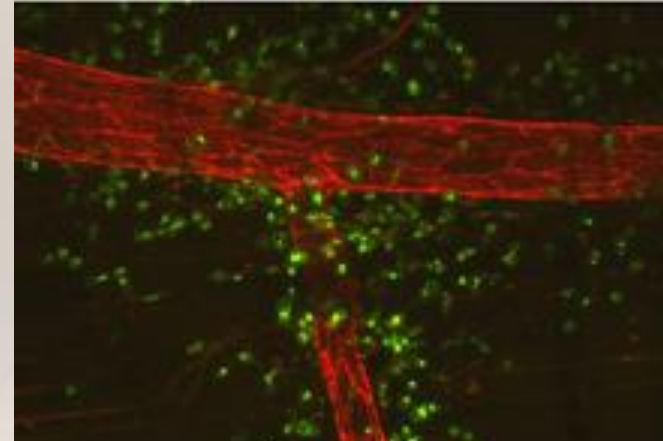
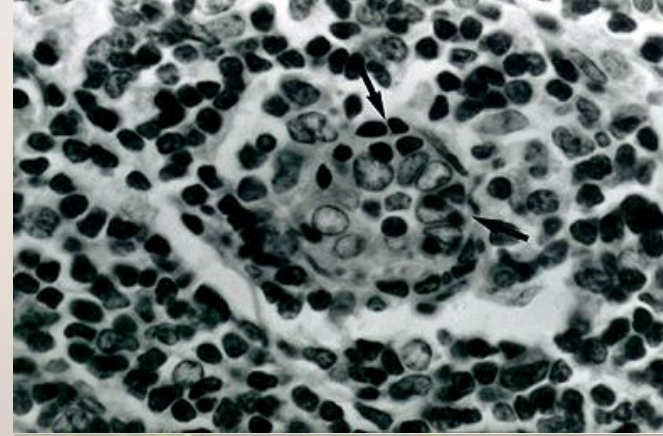
- Los leucocitos que no han sido activados por estímulos externos normalmente se encuentran en la circulación y en los órganos linfáticos
 - Luego de la activación son rápidamente reclutados a donde se necesitan
- Las células endoteliales en los sitios de infección y daño tisular también se activan, principalmente en respuesta a citoquinas secretada por los macrófagos y otras células del tejido en estos sitios.



Tráfico Leucocitario

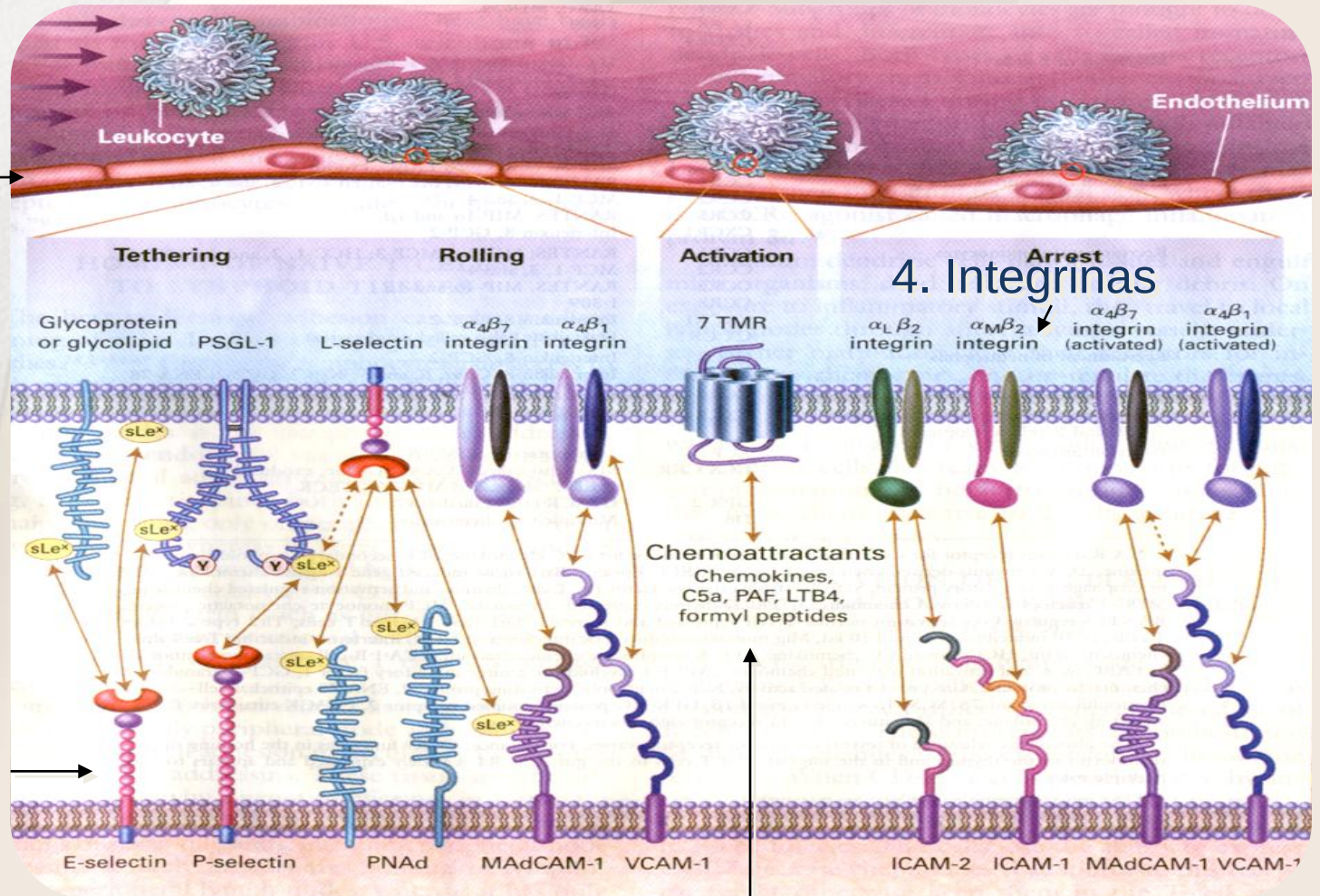
¿Qué elementos participan?

- Vénulas endoteliales altas
- Selectinas y sus ligandos
- Quimiocinas y sus receptores
- Integrinas y su interacción con moléculas de la superfamilia de Ig (moléculas de adhesión)



Reclutamiento leucocitario: Secuencia de eventos

1. HEV

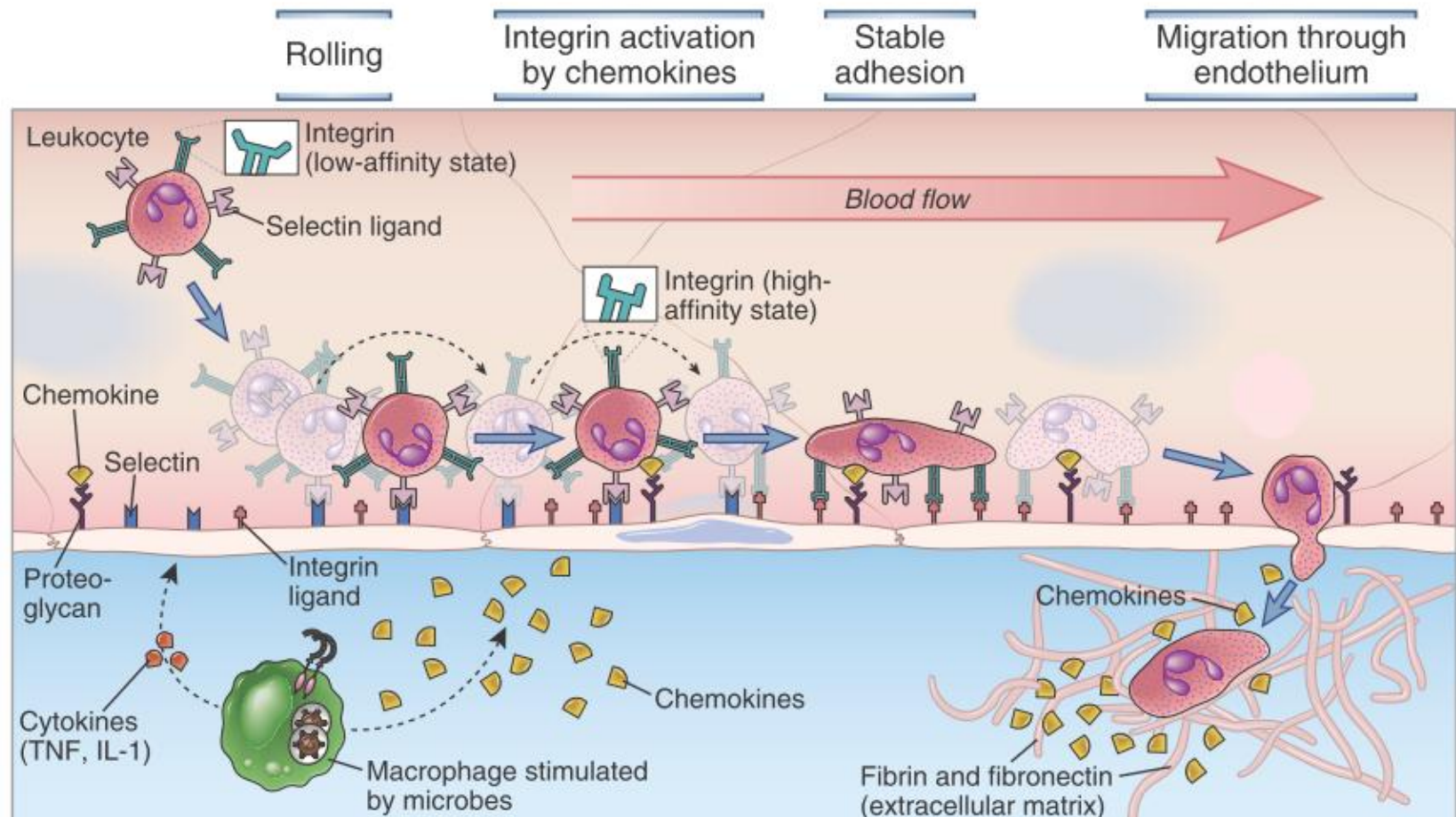


4. Integrinas

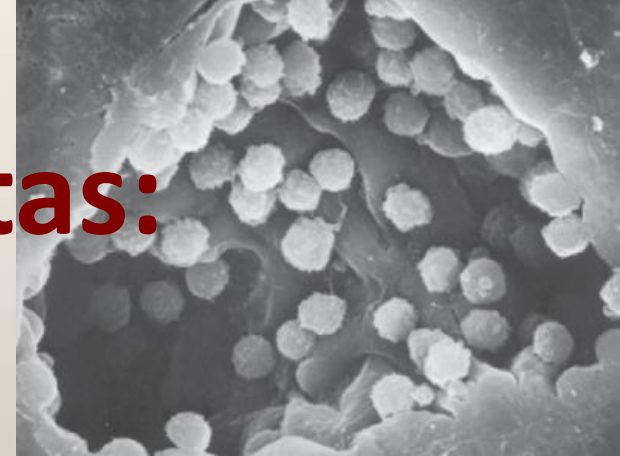
2. Selectinas

3. Quimiocinas

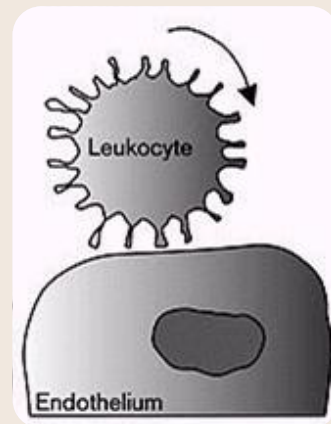
Reclutamiento leucocitario: Secuencia de eventos



Vénulas endoteliales altas: (HEVs)



- Interacción con células endoteliales altas (HEVs), ubicadas en vénulas post-capilares:
 - Son redondeadas, endotelio cuboidal, expresan adhesinas vasculares, características de cada órgano
 - Presentes en todos los órganos linfoides, excepto en el bazo
 - Se forman por influencia de linfocitos T y citokinas (linfotóxina) y quimiocinas liberadas por las células del mesenquima
 - Reconocidas por receptores de “homing” presentes en los linfocitos



Vénulas endoteliales altas: (HEVs)

- HEV sectorización:
 - Zona paracortical, interfolicular de los NL, placas de Peyer
 - HEV NL : PNAD altamente glicosilado y sulfatado (ligando de L-selectina)
 - LP y PP : MADCAM1
 - Las CDs entran por los vasos linfáticos aferentes, (excepto CDs plasmocitoides (pCDs) luego se ubican en la vecindad de las HEV
 - Con la excepción de las pCDs las HEV no dejan pasar a los leucocitos a los NL

	Normal venule	Peripheral lymph-node HEV	Peyer's-patch HEV
			
Endothelium	Flat	Tall and plump	Tall and plump
Basal lamina	Thin	Thick	Thick
Perivascular sheath	Scanty	Prominent	Prominent
CD31	+	+	+
ICAM2	+	+	+
ICAM1	-/+	++	++
VE-cadherin	+	+	+
Sialomucins			
Core protein	+	++	+
PNAD epitope	-	++	+
Sulphation	-	+	+
MADCAM1	-	-	+
Chemokines (CCL19, CCL21, CXCL12 and CXCL13)	-	+	+

CCL, CC-chemokine ligand; CXCL, CXC-chemokine ligand; VE, vascular endothelial.

Vénulas endoteliales altas: (HEVs)

Table 1. High endothelial venules (HEV)-associated molecules and their possible functions

Molecule	Classification	Possible functions in lymphocyte trafficking
MAdCAM-1	Adhesion molecule (expressed in mucosal and immature HEV)	Integrin $\alpha_4\beta_7$ ligand, control of lymphocyte rolling and adhesion to HEV
PNAd (sulfated and glycosylated molecules, i.e. GlyCAM-1, CD34, endomucin, nepmucin)	Adhesion molecules	L-selectin ligands, control of lymphocyte tethering and rolling on HEV
ICAM-1, ICAM-2	Adhesion molecules	Integrin ligands, control of lymphocyte firm adhesion to HEV
Fuc-TVII, β 3GlcNAcT-3, GlcNAc6ST2	Enzyme	Synthesis of functional L-selectin ligand
CCL21, CCL19, CXCL13, CXCL12	Chemokines	Activation of integrins, induction of cell adhesion and migration
Autotaxin	Enzyme	Activation of lysophosphatidic acid signaling
DARC	Chemokine receptor	Chemokine immobilization, scavenging?
Mac25/angiomodulin	Growth factor binding protein	Regulation of the local concentration of growth factors/chemokines?
LRHG	ECM and growth factor binding protein	Regulation of the local concentration of growth factors?

DARC, Duffy antigen receptor for chemokines; ECM, extracellular matrix; LRHG, leucine-rich HEV glycoprotein.

HEV:

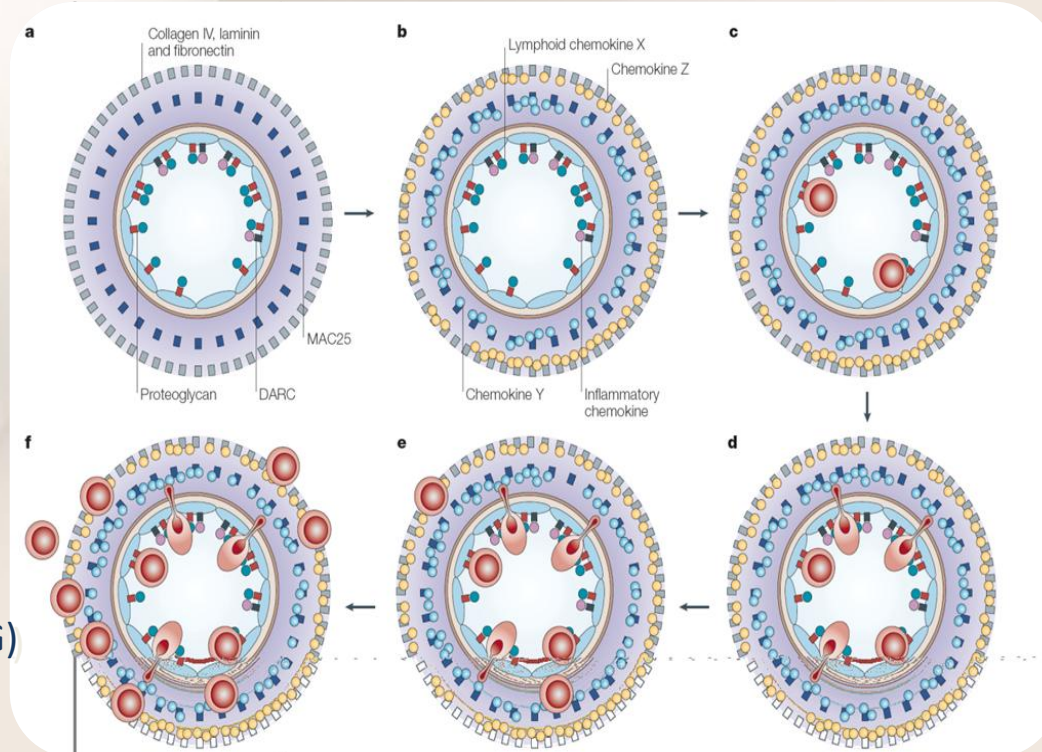
- Expresión de selectinas e integrinas no es suficiente (estas requieren de su activación por quimiocinas)
- Expresan constitutivamente quimiocinas
 - Ej. CCL9, CXCL12 y CXCL13 son transportadas por las HEV hacia la luz del vaso (es sectorizado (HEV foliculares y HEV interfolicular?))

	Normal venule	Peripheral lymph-node HEV	Peyer's-patch HEV
			
Endothelium	Flat	Tall and plump	Tall and plump
Basal lamina	Thin	Thick	Thick
Perivascular sheath	Scanty	Prominent	Prominent
CD31	+	+	+
ICAM2	+	+	+
ICAM1	-/+	++	++
VE-cadherin	+	+	+
Sialomucins			
Core protein	+	++	+
PNAD epitope	-	++	+
Sulphation	-	+	+
MADCAM1	-	-	+
Chemokines (CCL19, CCL21, CXCL12 and CXCL13)	-	+	+

CCL, CC-chemokine ligand; CXCL, CXC-chemokine ligand; VE, vascular endothelial.

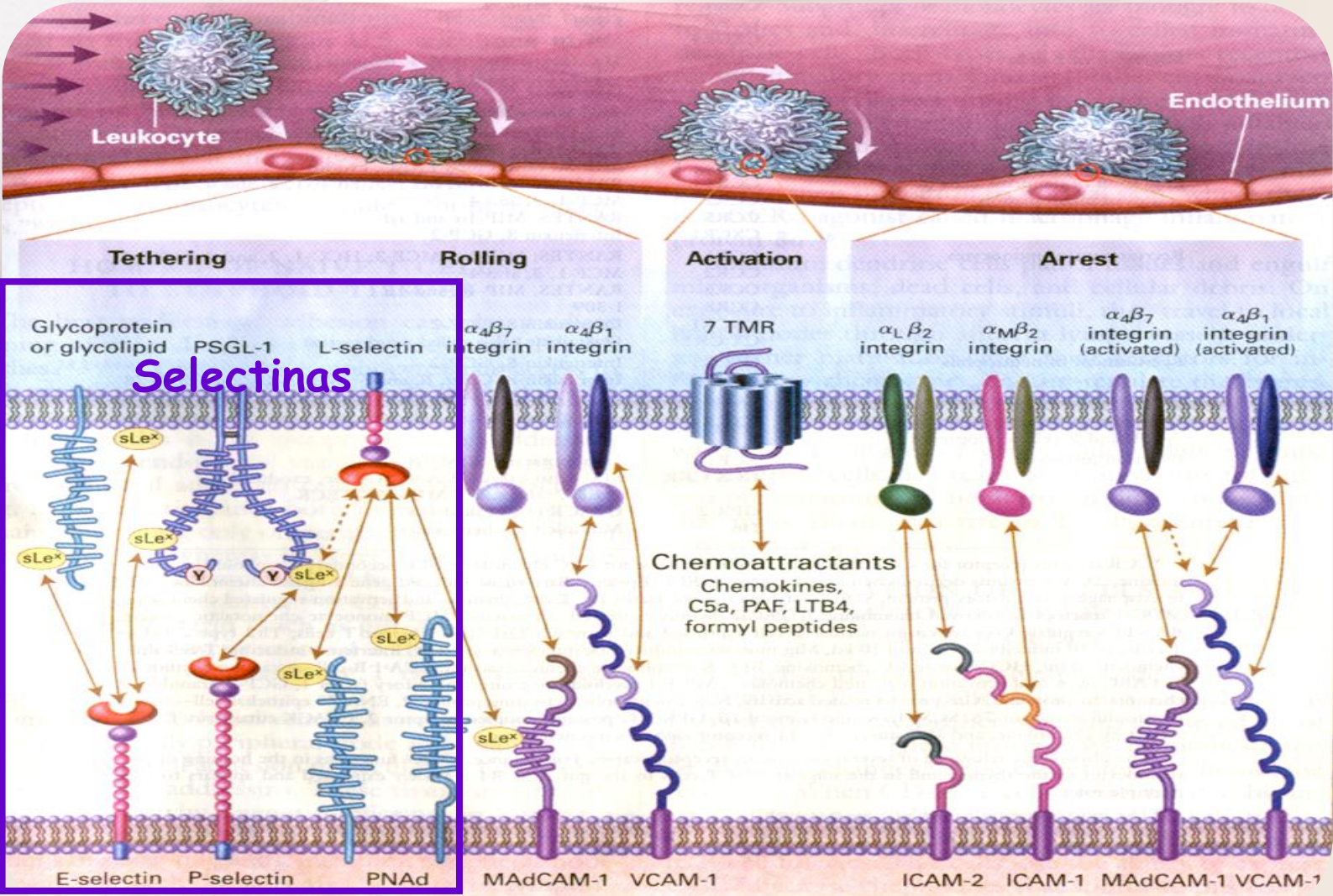
Recirculación y alojamiento de los leucocitos

- Mecanismos de acceso a quimiocinas desde la red de fibroblastos (FRC):
 - Transporte vesicular
 - Presión hidrostática
 - Transcitosis a través de HEV
- Como se mantienen las quimiocinas unidas a las HEV
 - Proteoglicanos
 - Co-receptores de TGF- β (CD105, glicoproteína HEV rica en leucina (LRHG))
 - DARC (receptor de antígeno Duffy para quimiocinas)
 - En la membrana basal MAC25, colágeno IV y laminina



DARC y CCR7 (CCL12), pueden mantener quimiocinas adosadas

Recirculación de linfocitos



Moléculas de adhesión endotelial

Selectinas

- Glicoproteínas transmembrana que se unen a carbohidratos (fucosilados y sialilados) presentes en sus ligandos, de forma dependiente de Ca^{+2}
- Pasos iniciales de la adhesión:
- Adhesiones de baja afinidad entre los leucocitos circulantes y células endoteliales de las vénulas post-capilares

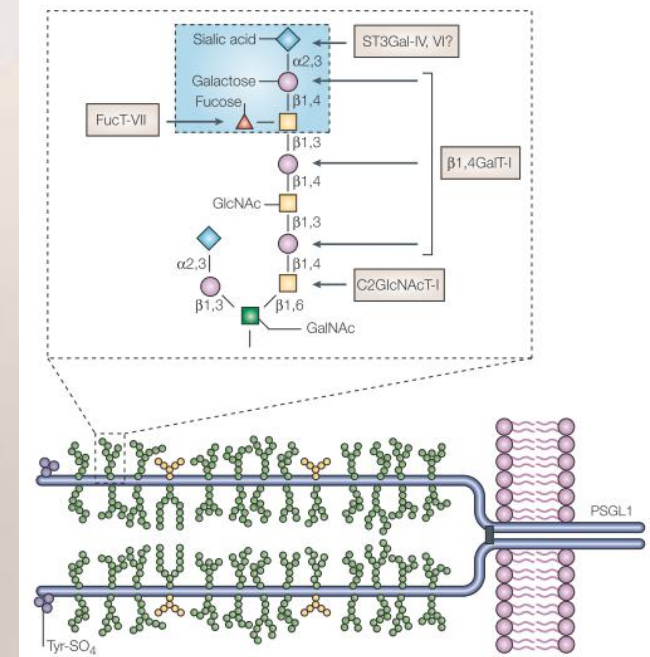


Table 1 | **Selectin expression**

Selectin	Cell/tissue	Expression pattern
L-selectin	Myeloid cells	Constitutive
	Naive T cells	Constitutive
	Effector T cells	Low/negative
	Effector memory T cells	Absent
	Central memory T cells	Re-expressed or retained
E-selectin	Skin endothelium	Constitutive
	Inflamed endothelium	Inducible in most organs
P-selectin	Choroid plexus	Constitutive
	Lung endothelium	Constitutive
	Platelets	After activation
	Platelet-derived microparticles	Constitutive
	Peritoneal macrophages	Constitutive
	Inflamed endothelium	Inducible in most organs

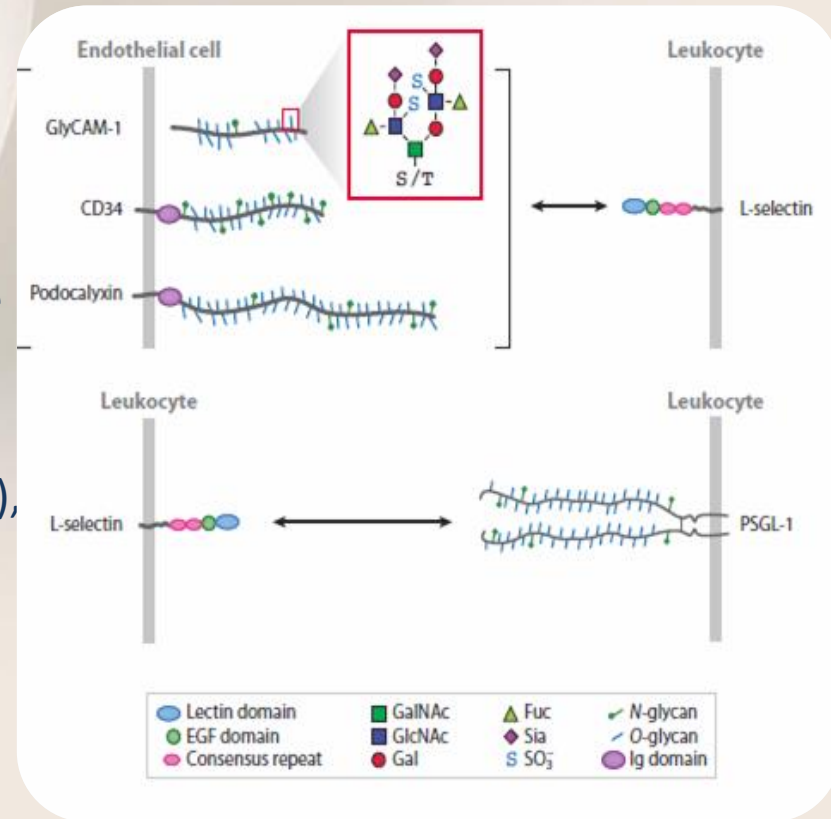
Moléculas de adhesión endotelial

Selectinas

Tipos:

– Selectina-L (CD62-L):

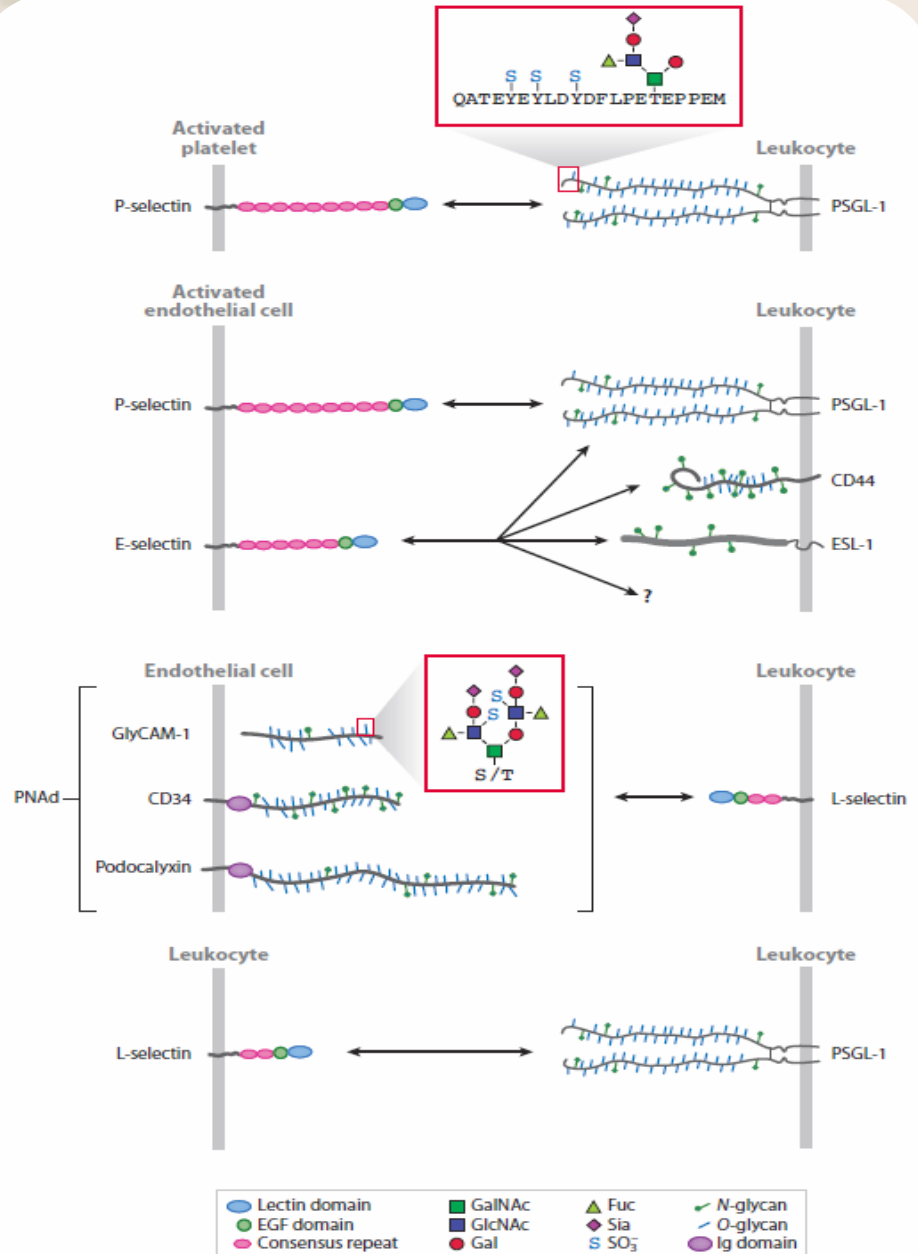
- Células T “naive”, todas las células mieloides, Treg y algunas poblaciones de T de memoria
- No en células endoteliales
- Ligando: PSGL1 (ligando 1 de P-selectina), adhesinas endotelial de los nódulos linfáticos periféricos (PNADs) o mucinas (CD34 (HEV) , MadCAM-1 y podocalyxin
- Entrecruzamiento induce incremento de ARNm para IL-8, TNF- α y β 2 integrina



Moléculas de adhesión endotelial

Selectinas

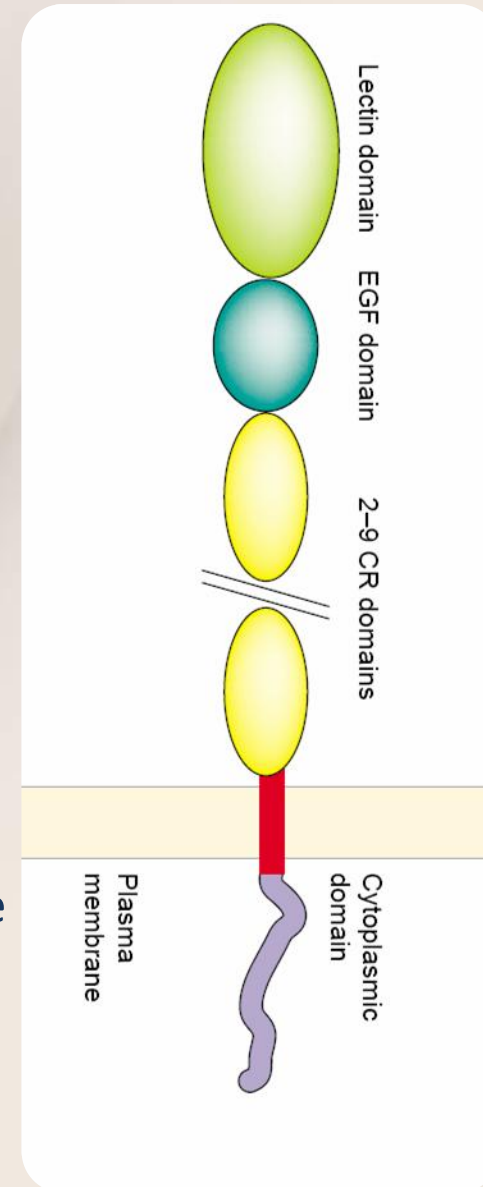
- Tipos:
 - Selectina-E (CD62-E):
 - Endotelio activado y endotelio de la piel en reposo
 - Ligando Ag LewisX, Ag linfocitos cutáneos (CLA) (T-memoria/efectores), Ligando 1 de e-selectina (ESL-1)
 - Acumulo de células al sitio de la inflamación
 - Selectina-P (CD62-P):
 - Gránulos en las plaquetas, endotelio pulmonar y plexos coroideos
 - Ligando Ag LewisX, PSGL (ligando glicoproteico de P-selectina)
 - Recluta PMN y Mo



Moléculas de adhesión endotelial

Selectinas

- Dominios de unión a Lectinas o CDR
 - Expresadas exclusivamente en las células derivadas de la médula ósea y células endoteliales
 - Permite la adhesión de leucocitos y plaquetas a la superficie vascular
- Interacción reversible y bajo condiciones de flujo
 - Participan en el “rolling”
- Ligandos glicoconjugados específicos
 - Para la unión de selectina con su ligando se requiere de:
 - Sulfatación por sulfotransferasas (LSST) para activar la unión con su ligando



Recirculación y alojamiento

- Las quimiocinas y moléculas de adhesión son los responsables de la migración
- Durante el “rolling”, si no ocurre activación mediada por quimiocinas (receptores acoplados a proteína G), las integrinas ($\beta 2$) no se activan (conformación de alta afinidad) y no ocurre el arresto

“Rolling”: Permite evaluación de señales antes de comisionarse a la entrada a un tejido

Table 1 | **Multi-step adhesion cascades in lymph-node HEVs determine homing specificity**

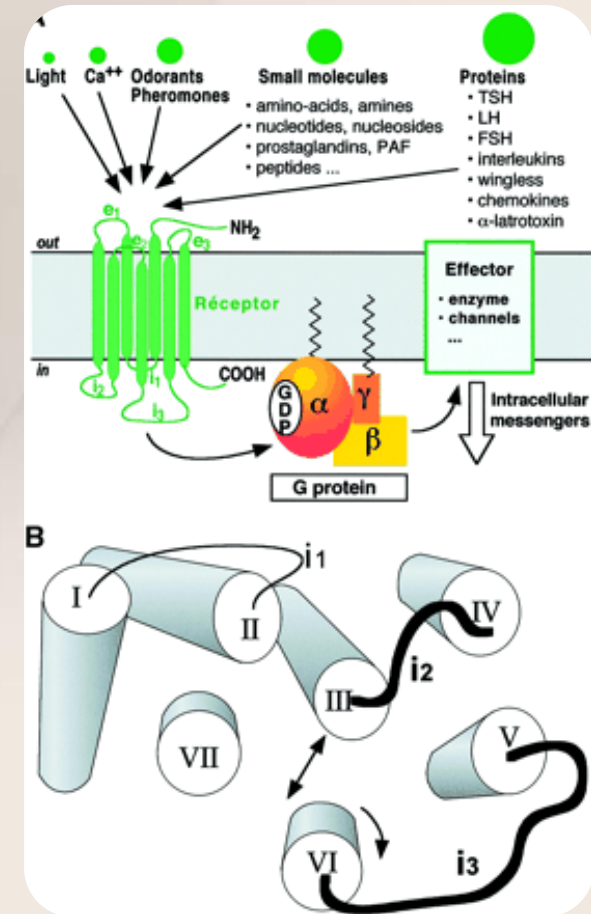
	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
	Rolling	Activation	Adhesion	Transmigration
Naive B cells	Yes	Yes	Yes	Yes
Naive or central memory T cells	Yes	Yes	Yes	Yes
Monocytes/Neutrophils	Yes	No	No	No
Effector memory or effector T cells	No	No	No	No

En las células T naive y de memoria las integrinas son activadas por CCL21 (expresado por HEV), ligando de CCR7

Dinámica del proceso de recirculación y alojamiento

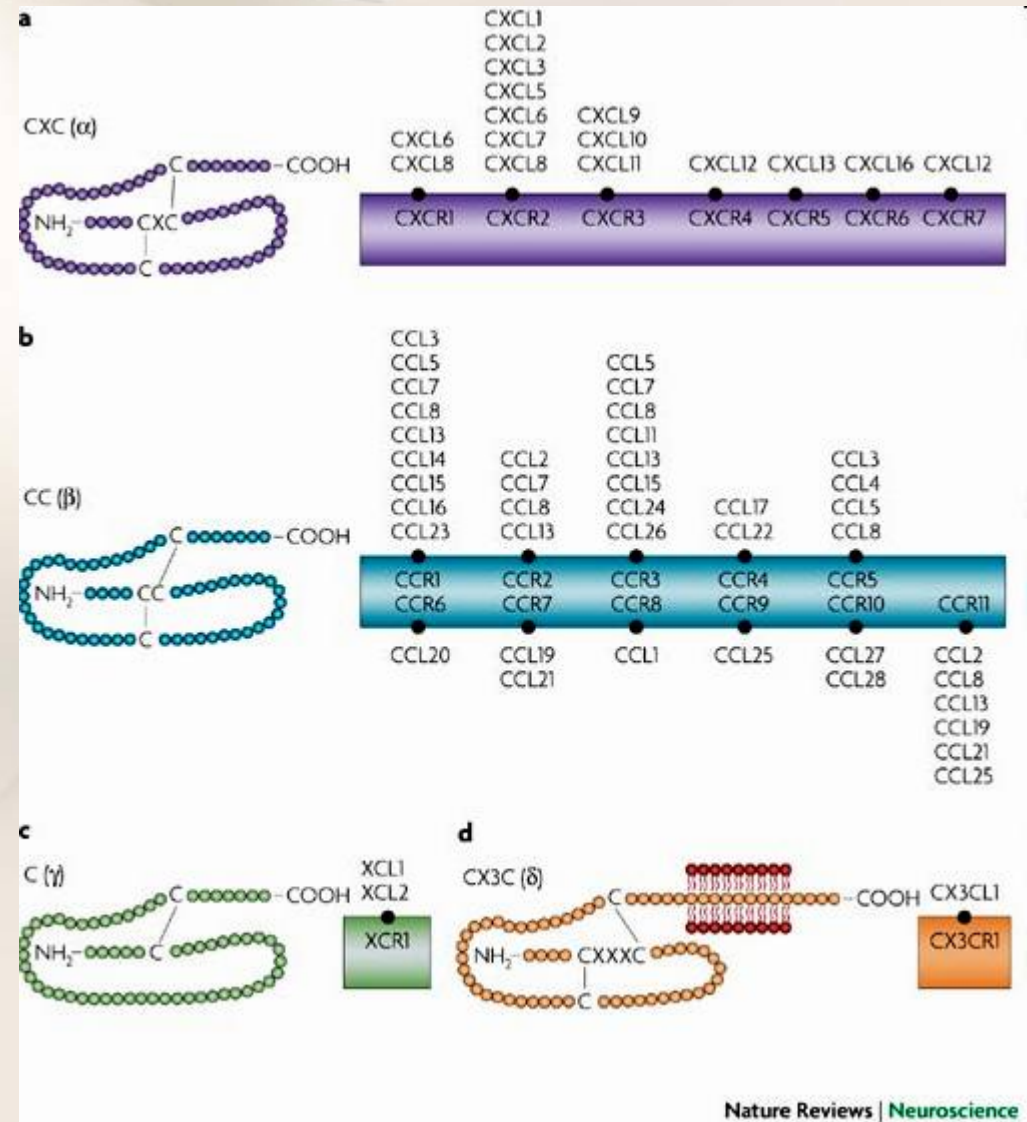
Fases de la migración:

- Fase de activación:
 - Mediada por moléculas producidas por el hospedador o microorganismos: fragmentos de fibrina, colágeno, C5a, fMLP, quimiocinas, PAF, LTB4, PGD2
- Quimiocinas
 - Casi todos los receptores pertenecen a flia. que atraviesan 7 veces la membrana
 - Acoplados a proteína G



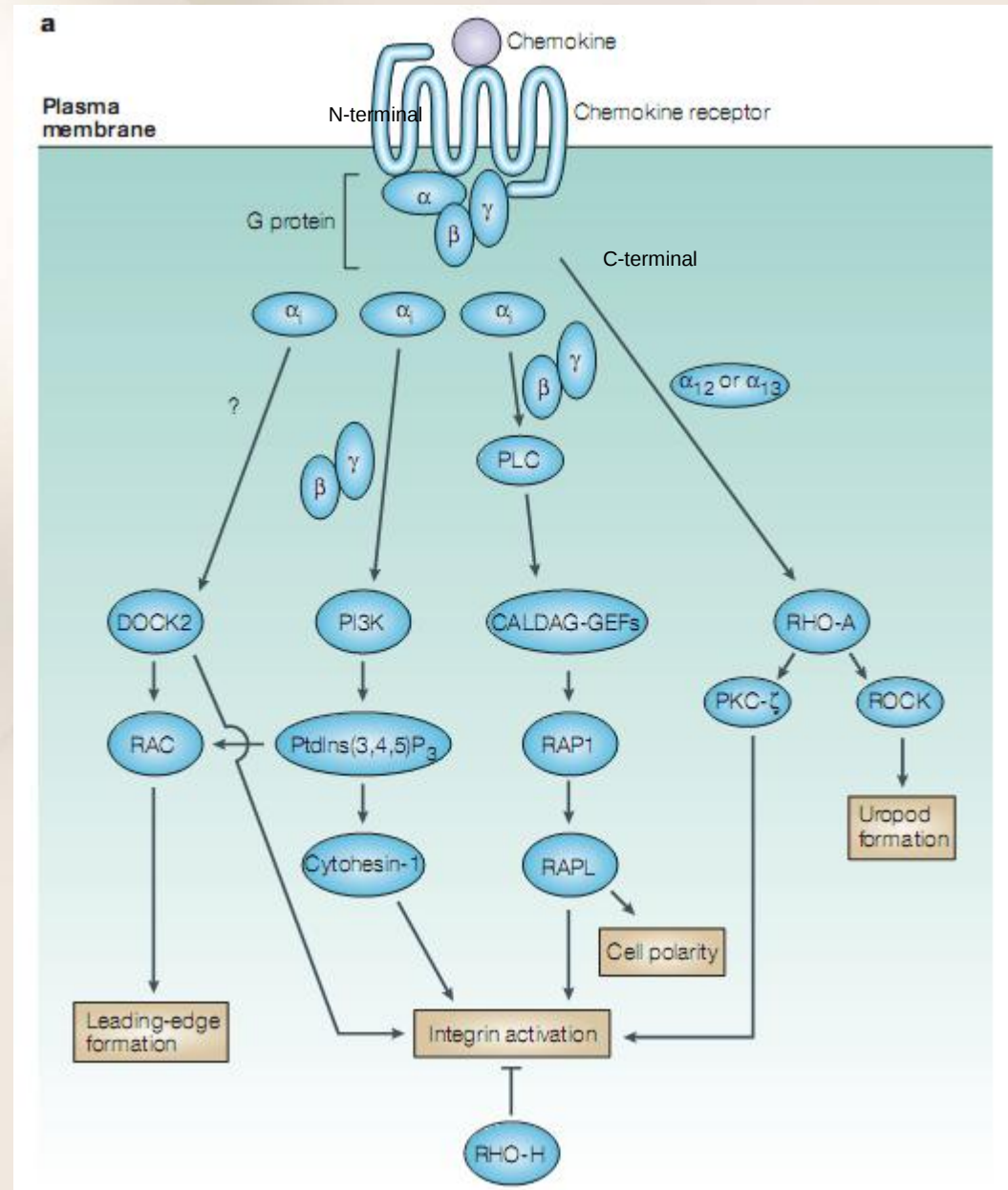
Quimiocinas

- Familia de proteínas de bajo peso molecular (8-14 KDa)
- Alto grado de homología
- Capacidad quimioatrayente y proinflamatoria
- Unión ligando-receptor
 - Alto grado de promiscuidad
 - Sin embargo, también hay parejas específicas de quimiocina-receptor
 - CXCL13-CXCR5

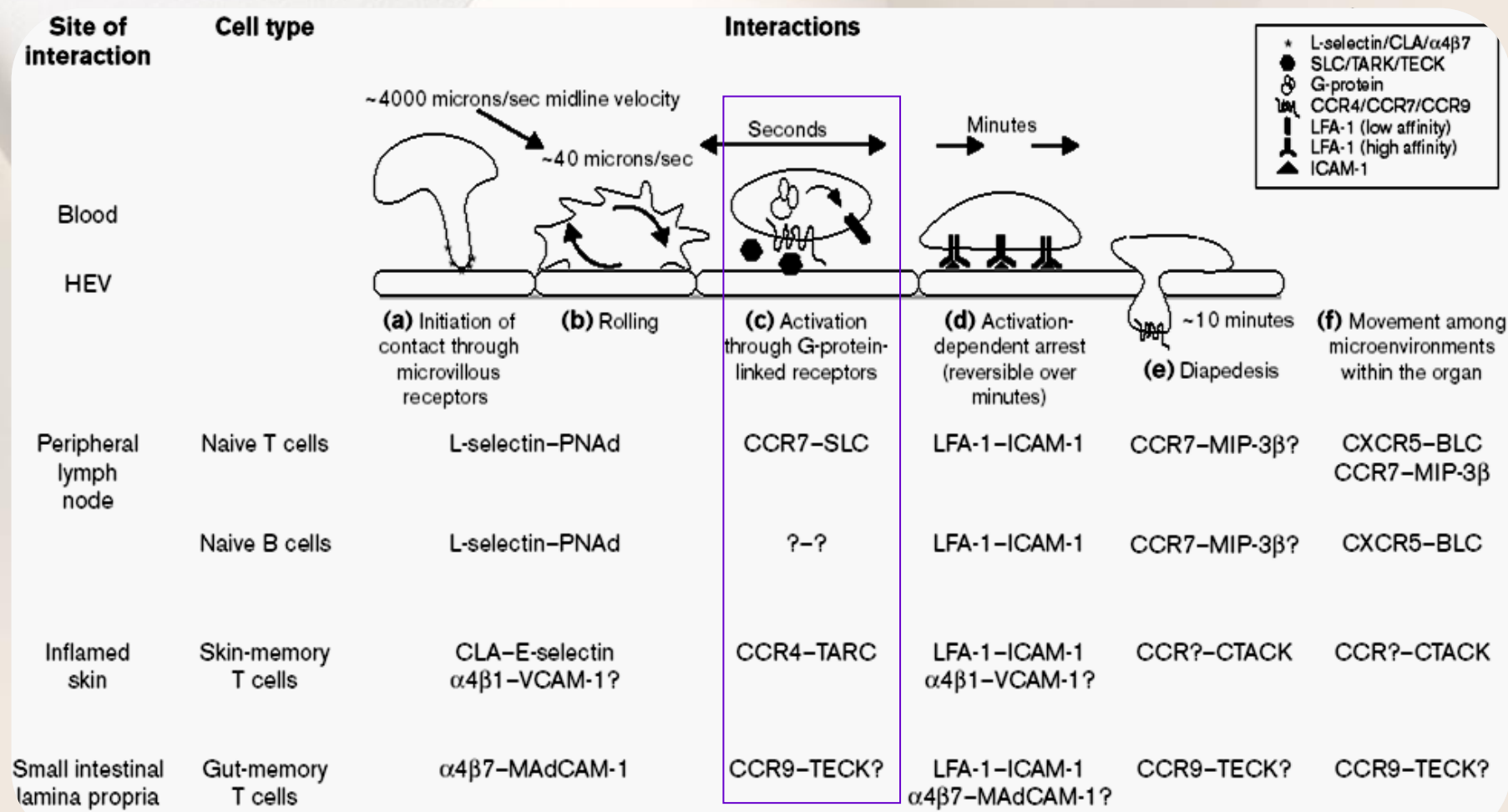


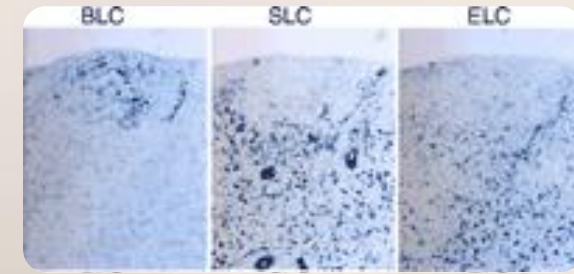
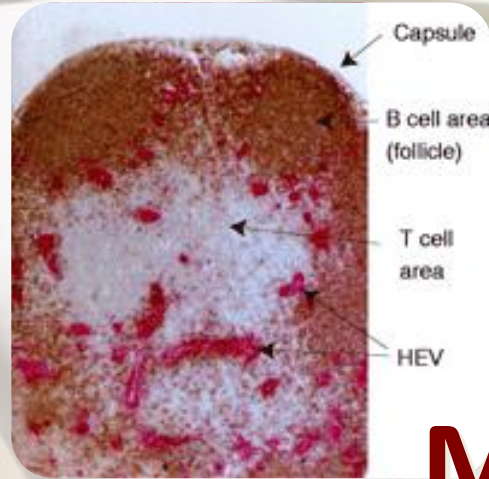
Quimiocinas

- Receptores
 - Pertenecen a la familia de receptores de 7 dominios transmembrana
 - Acoplados a proteínas G



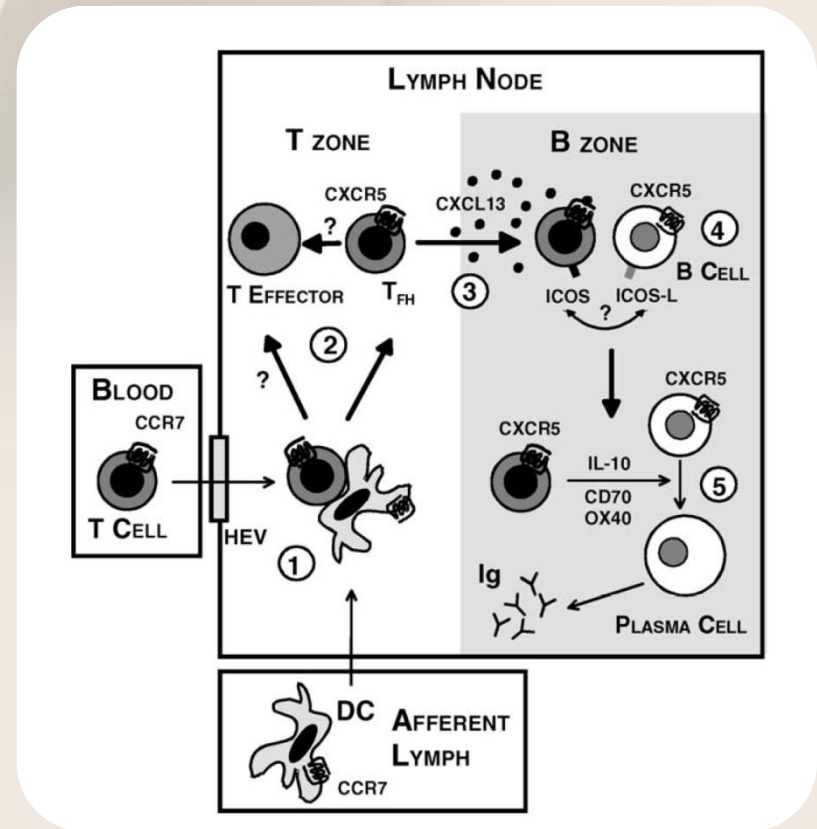
Migración de leucocitos: Quimiocinas

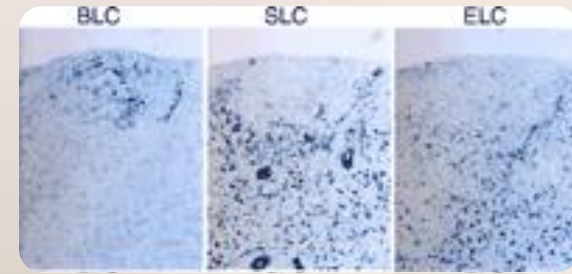
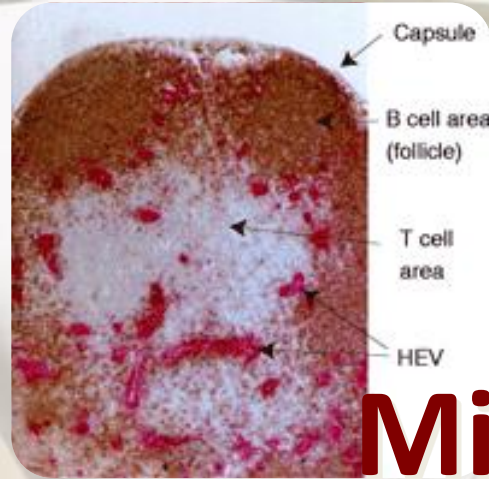




Migración celular: Quimiocinas

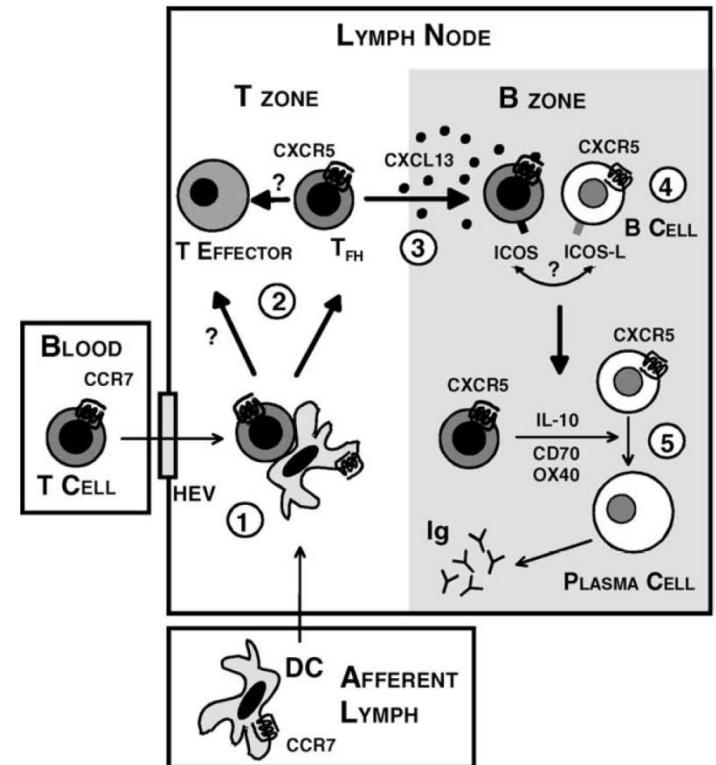
- CXCR5 es expresado por poblaciones de células T efectoras (T_{FH}) activadas y permite su interacción con linfocitos B
 - Expresado además en linfocitos B de PP y NL y es crítico para su migración a estos microambientes
- CCR9 y CCR10 reclutamiento a la mucosas (Linfocitos B productores de IgA y linfocitos T al intestino delgado)
- La regulación de la acción de las quimiocinas : proteasas (CD26), metaloproteasas, cathepsin D, D6





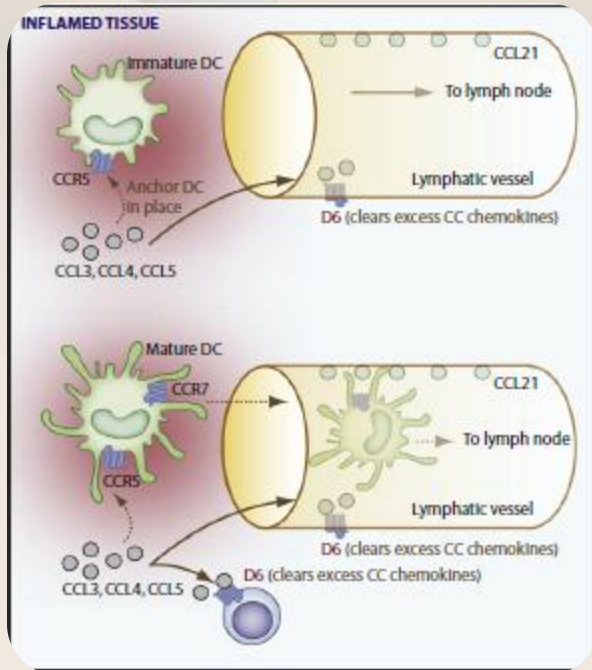
Migración celular: Quimiocinas

- CCR7
 - Sus ligandos CCL21 y CCL19 activan a las integrinas en las células T naïve y células T de memoria central
 - CCL21 y CCL19 son constitutivamente mantenidos en la superficie de HEV, por proteoglicanos
 - Crítico para la entrada de linfocitos T naïve a los NL
 - CCL19 permite la atracción de T-APC en NL

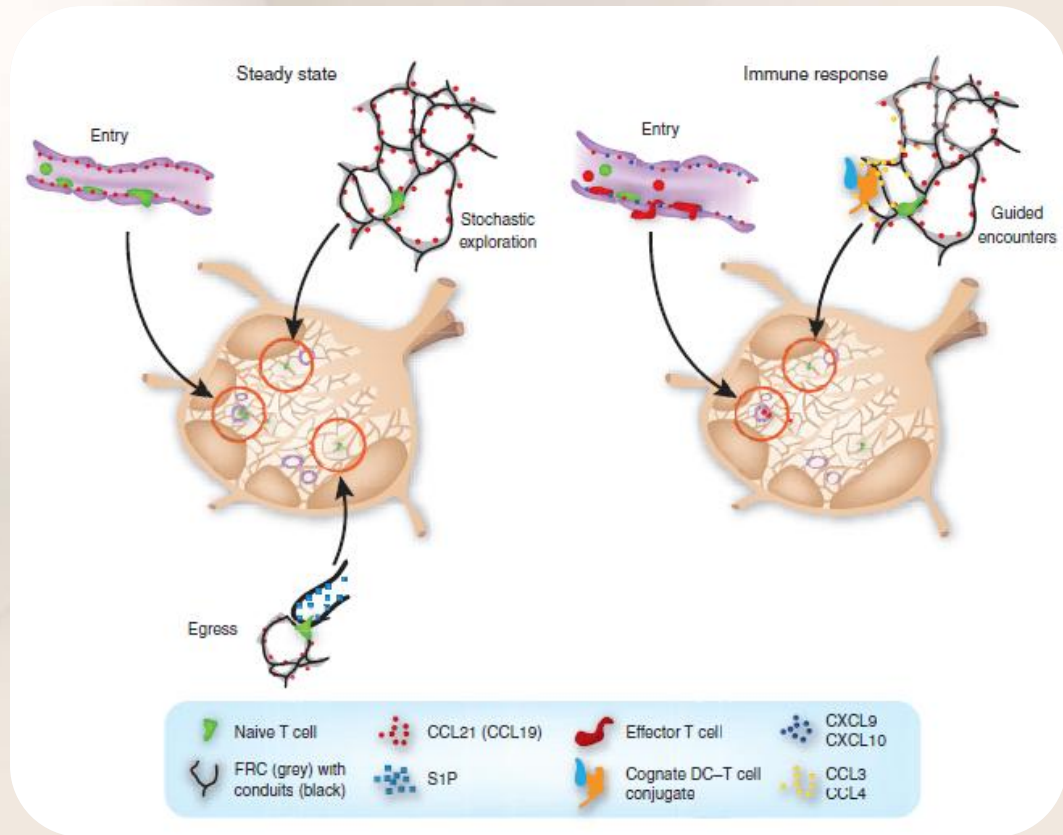


Migración celular: Quimiocinas

- Las quimiocinas coordinan la entrada a los nódulos linfáticos, mientras que agonistas de esfingosina (receptores de lípidos acoplados a proteína G), coordinan el egreso



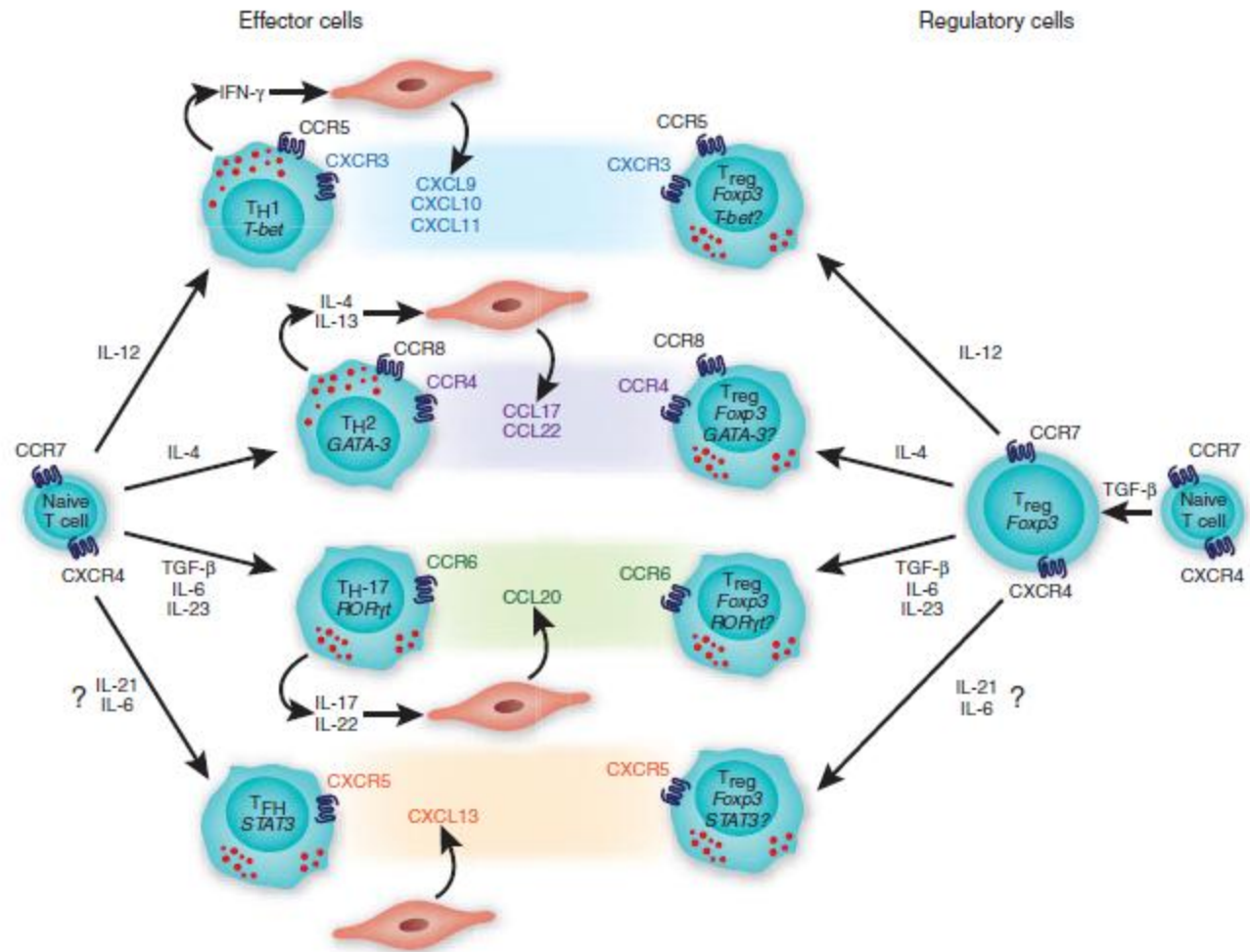
LT, promueve la liberación de quimiocinas (CCR7 ligando) por FRC y VEH (no inflamación)
IFN- γ media CXCL3 durante inflamación



D6: scavenger de quimiocinas soluble, considerada receptor de quimiocina no funcional

Migración celular: Quimiocinas

- Expresión dependiente de las poblaciones efectoras



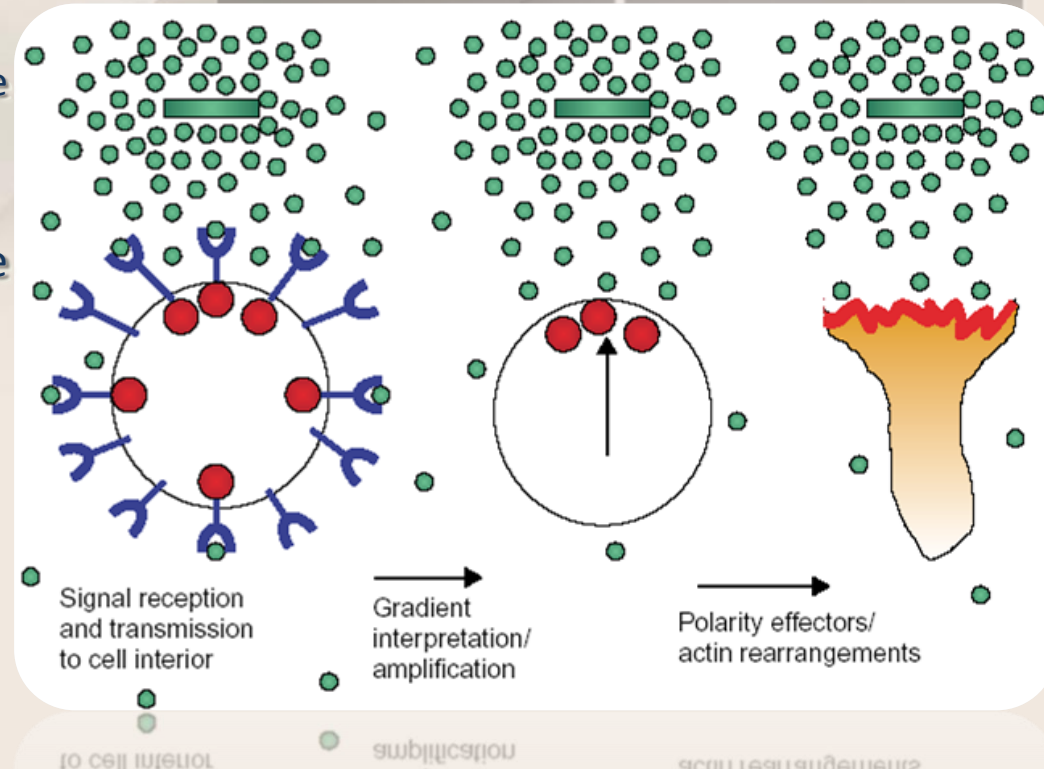
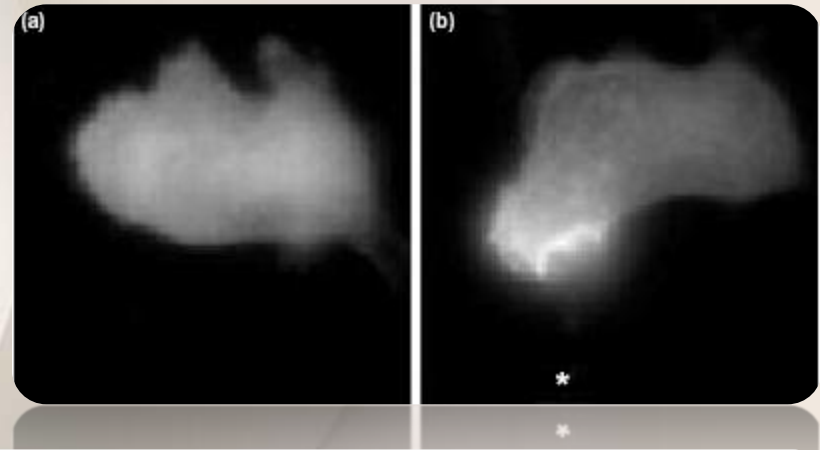
Migración de leucocitos: Quimiocinas

Responsables del cambio de forma de la célula y arresto

— Polarización

- Frente de migración
 - Polimerización de actina
 - Concentran receptores que intervienen en la adhesión firme
- Uropodo
 - Retracción del citoesqueleto

- Uno de los efectos mas importante de las quimiocinas es la activación de integrinas



Moléculas de adhesión endotelial

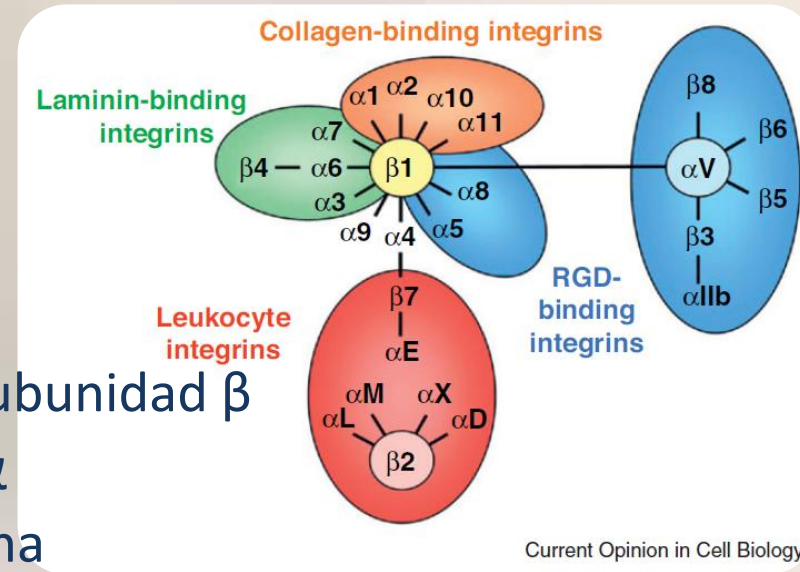
Integrinas

- Terminología usada desde 1987
- Grupo de receptores heterodiméricos cuya función específica es integrar la matriz extracelular con el citoesqueleto intracelular, para mediar funciones: **de adhesión, migración, crecimiento, supervivencia, diferenciación.**
- Median adhesión de las células a la matriz extracelular y organización de los tejidos y representan la interface entre el exterior e interior celular.

Moléculas de adhesión endotelial

Integrinas

- Más de 30 tipos de integrinas
- Todas poseen una estructura básica
 - Compuestos por 1 subunidad α y 1 subunidad β
- Descritos 8 tipos de cadena β y 19 α
 - $\beta 1$, αV y $\alpha 5$ receptores de fibronectina
 - $\alpha 1$ -7 unión laminina
 - $\alpha 1$ -3 unión al colágeno
 - $\alpha 9\beta 1$ unión Tenascin C
- Más importantes en RI:
 - $\alpha L\beta 2$: unión a ICAM1 e ICAM2: tráfico de linfocitos y formación de la sinapsis
 - $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$: VCAM y MadCAM: migración a mucosas y tejido inflamado



Current Opinion in Cell Biology

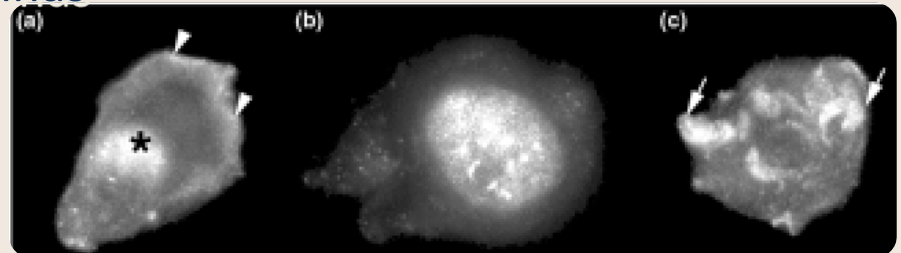
Current Opinion in Cell Biology

Moléculas de adhesión endotelial

Integrinas

- Funciones:
 - Durante la recirculación estabilizan las uniones con las células endoteliales y favorecen la trans migración
 - Mediar la sinapsis inmunológica
 - Durante el alojamiento interactúan con la matriz extracelular
 - Reclutan receptores factores de crecimiento (GFR)
 - GFR recluta kinasa de adhesión focal y actúa sinérgicamente con integrinas

Mutantes de FAK, afecta formación de lamelopodia y la dirección de la migración



Distribución de FAK

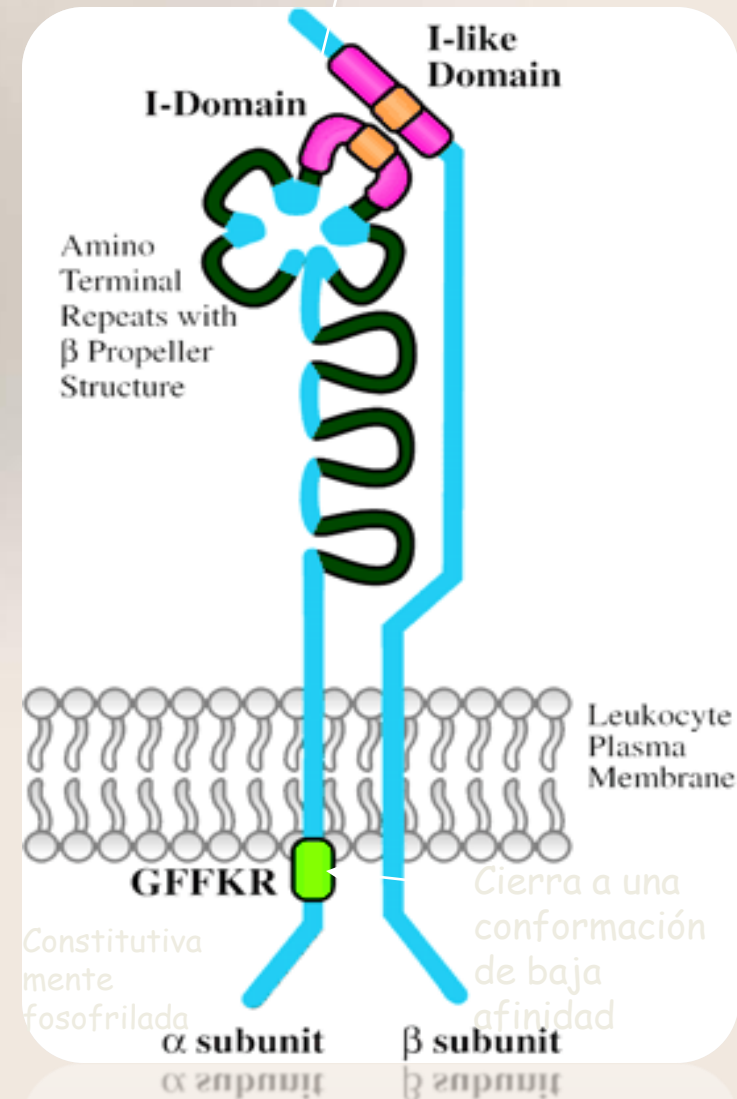
Moléculas de adhesión celular:

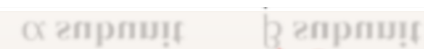
Integrinas

Señales “inside-out”: apertura del sitio de unión al ligando (afinidad y valencia (avidez) y reclutamiento al punto de contacto:

- En superficie y almacenadas en gránulos
- Reconoce a 1 o mas miembros de la familia ICAM
 - Agrupamiento y ubicación en rafts le confiere asociación a ICAM
- Asociación con proteínas del citoesqueleto celular :
 - Talina y α -actina, vimentina
 - Vinculina, paxillina y tensina

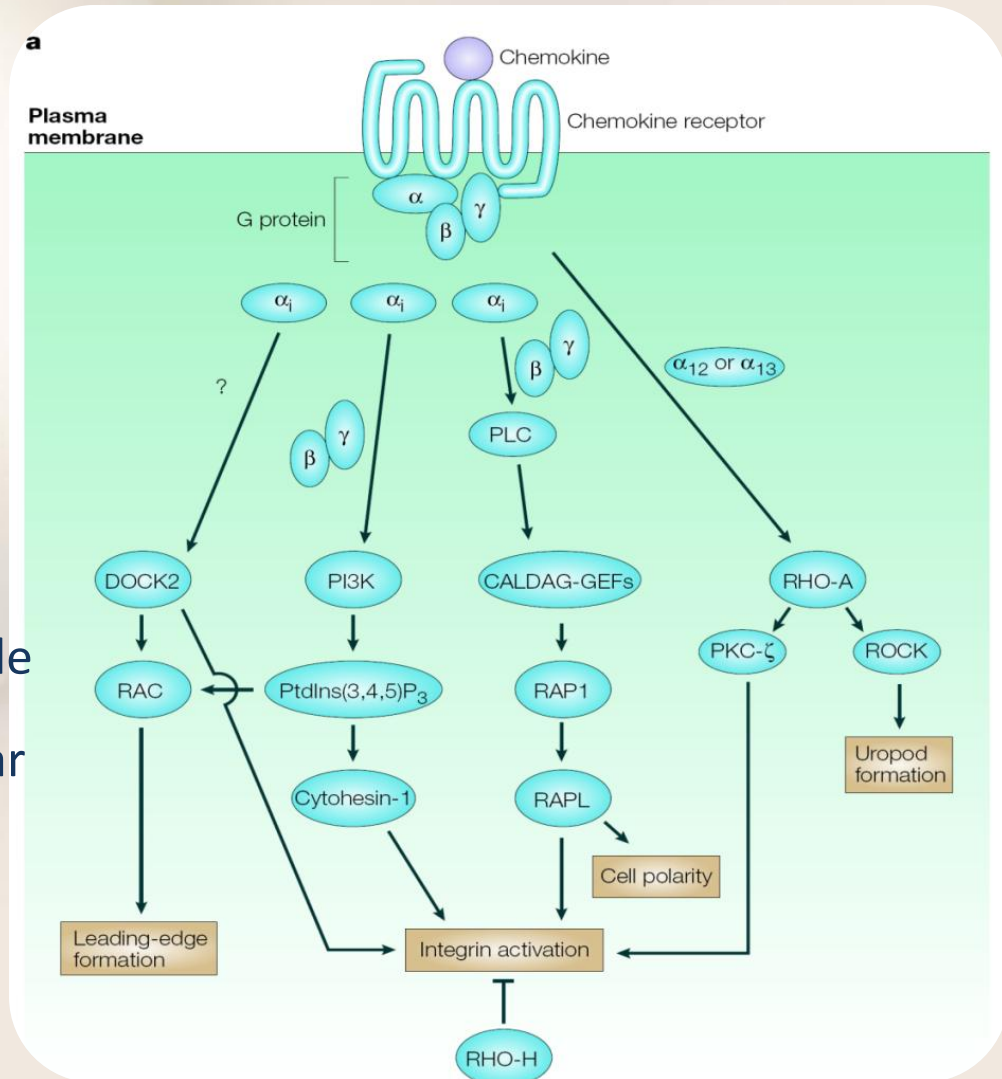
Requerido para reconocimiento de ICAM



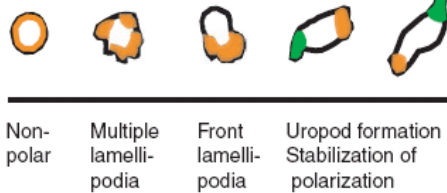


Migración de leucocitos: Señales activadas por las quimiocinas

- Activación de las Integrinas
- Polaridad celular
- Formación del frente de migración (lamelopodia/filopodia)
 - Relocalización y polarización de integrinas en el frente de migración (transporte vesicular mediado por RAP1 y RAPL)
- Formación del urópodo

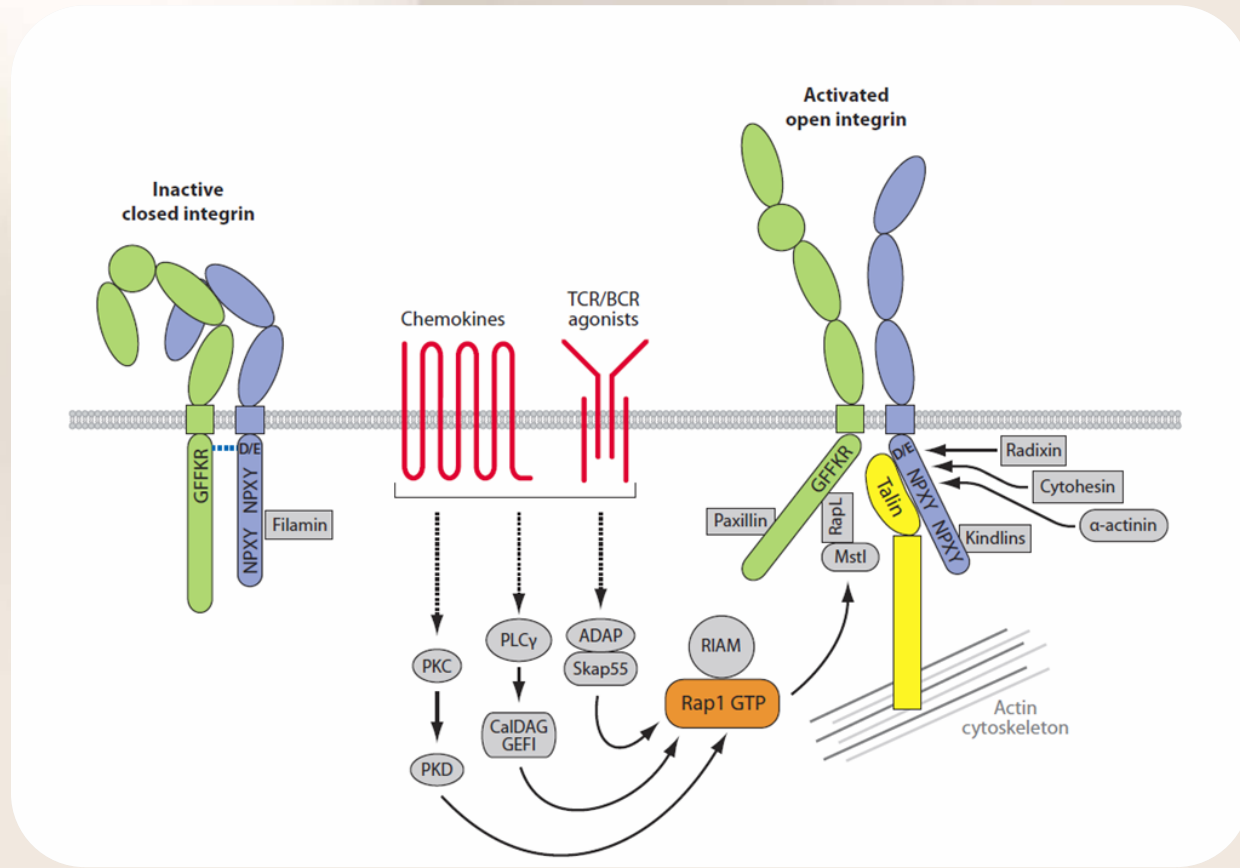


Time after CCL19 addition (s)



Moléculas de adhesión celular: Activación de Integrinas

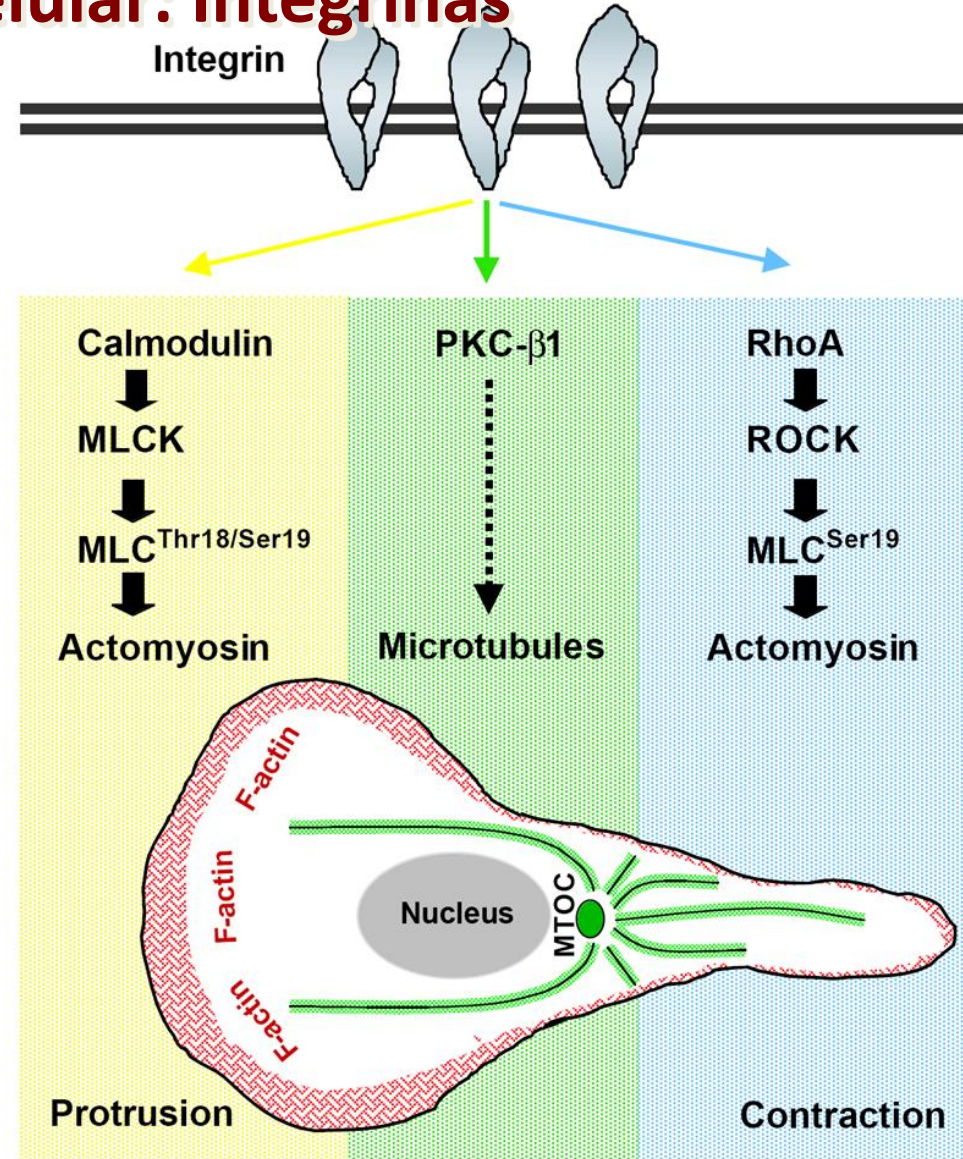
- La combinación de proteínas asociadas a las integrinas incrementa la afinidad
 - Rap1-RapL incrementan la movilidad lateral
 - Talin y kindlin favorecen la asociación con el citoesqueleto



Liberación de Jab-1 y activación de señal outside-in a nivel génico

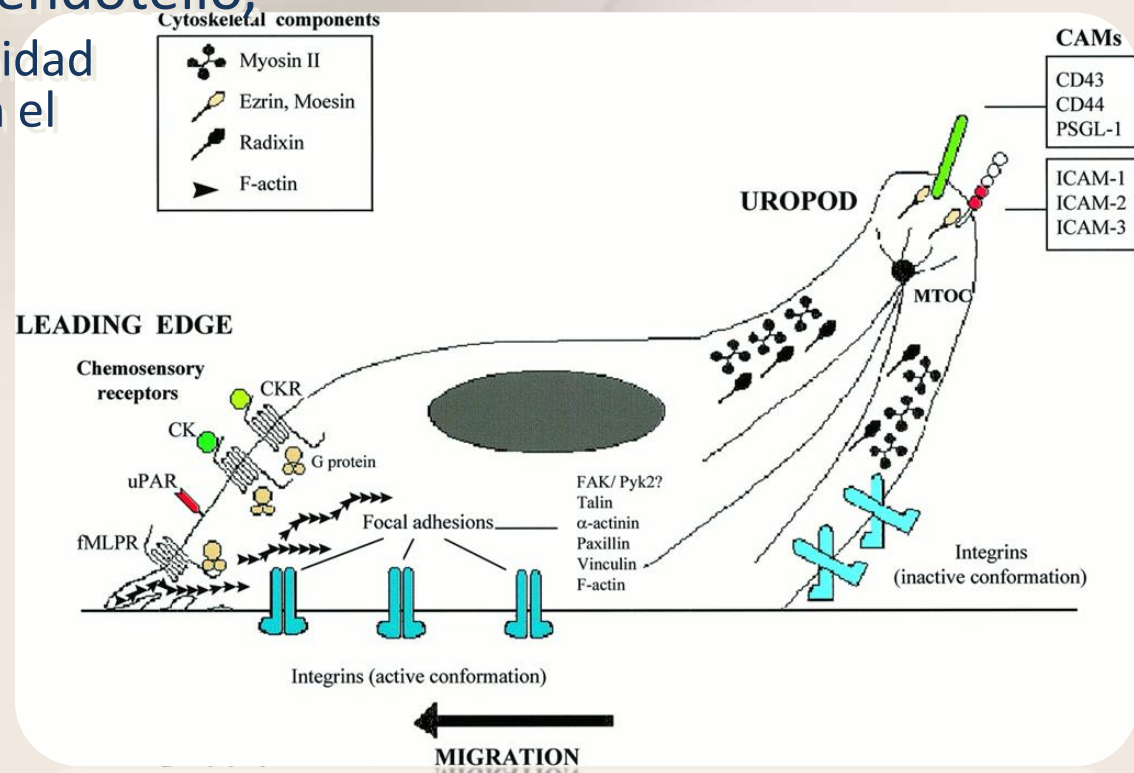
Moléculas de adhesión celular: Integrinas

- Señales outside-in (media señales de supervivencia, proliferación y crecimiento)
 - Mediada por Rac, CDC42 y Kinasa de la cadena liviana de miosina (MLCK)
 - Regula lamelopodia y filopodia
 - Polimerización de actina
- Mediada por Rho y la kinasa de Rho (ROCK)
 - Regula la contracción
 - Separación de las uniones en el urópodo
- Contractilidad y transmisión de tensión



Migración de leucocitos: POLARIDAD CELULAR

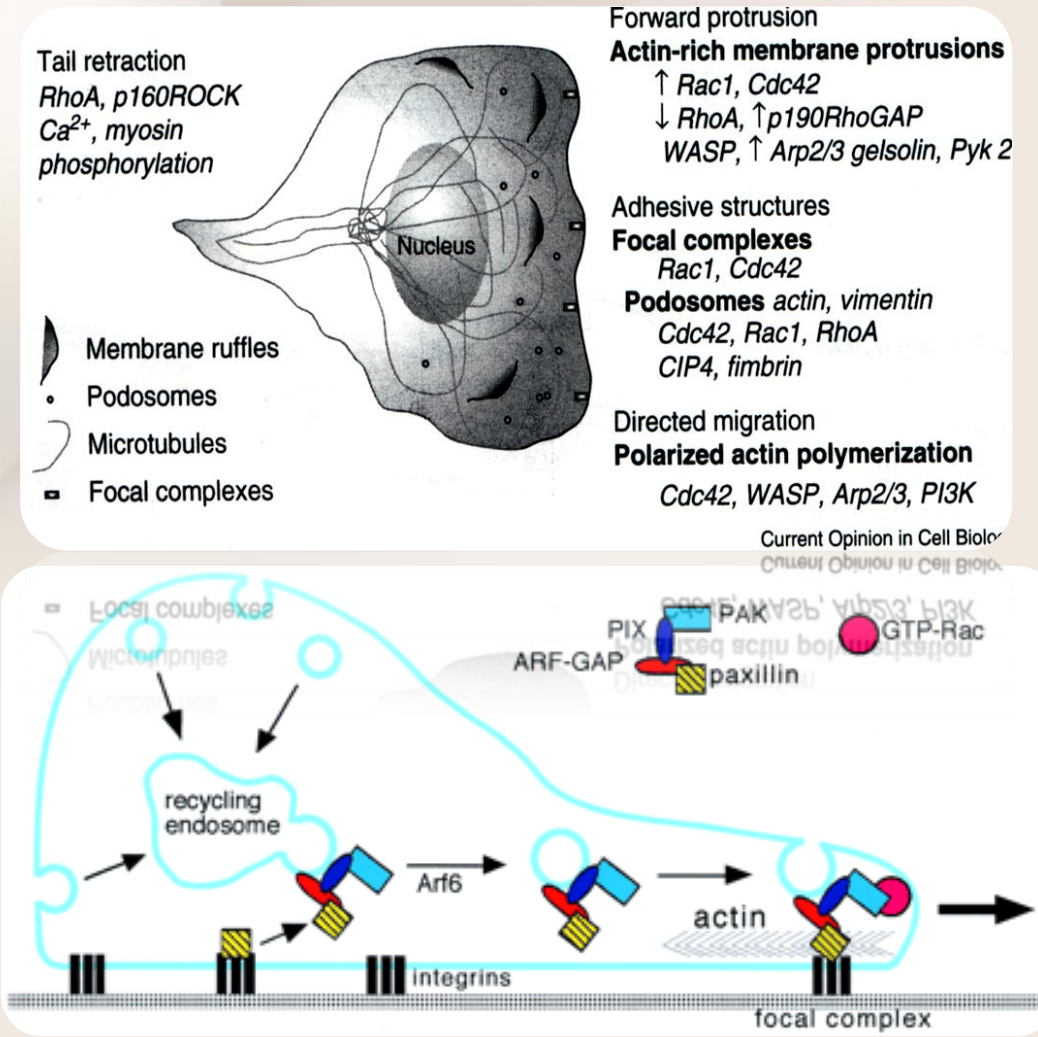
- Regulación del citoesqueleto celular
 - Microfilamentos (actina) controla plasticidad de la membrana y motilidad
- Reorganización de la membrana y relocalización de receptores
- Quimiocinas adheridas al endotelio,
 - Incrementan la aidez/afinidad de las integrinas, resulta en el arresto de linfocitos



Dinámica del proceso de recirculación y alojamiento

Dirección del movimiento

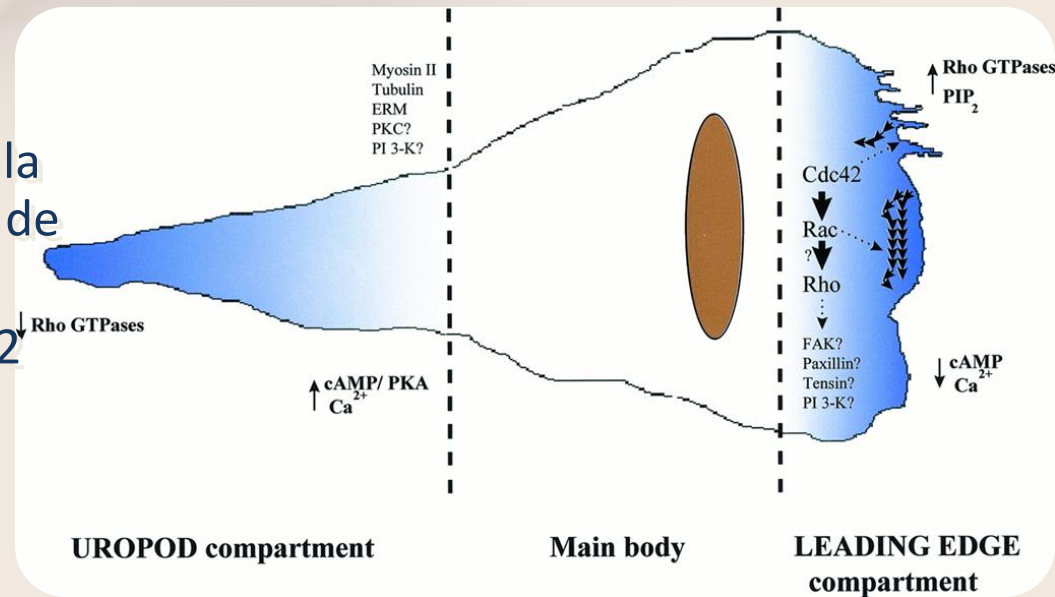
- Quimiocinas, inmovilizadas en la superficie de las células endoteliales
- Formación de la cola de retracción
 - Reciclaje de integrinas
 - Permite la trans migración
 - Requiere protrusión al frente y retracción posterior
 - Reciclaje de membrana en vesículas



Migración de leucocitos: Señalización Intracelular

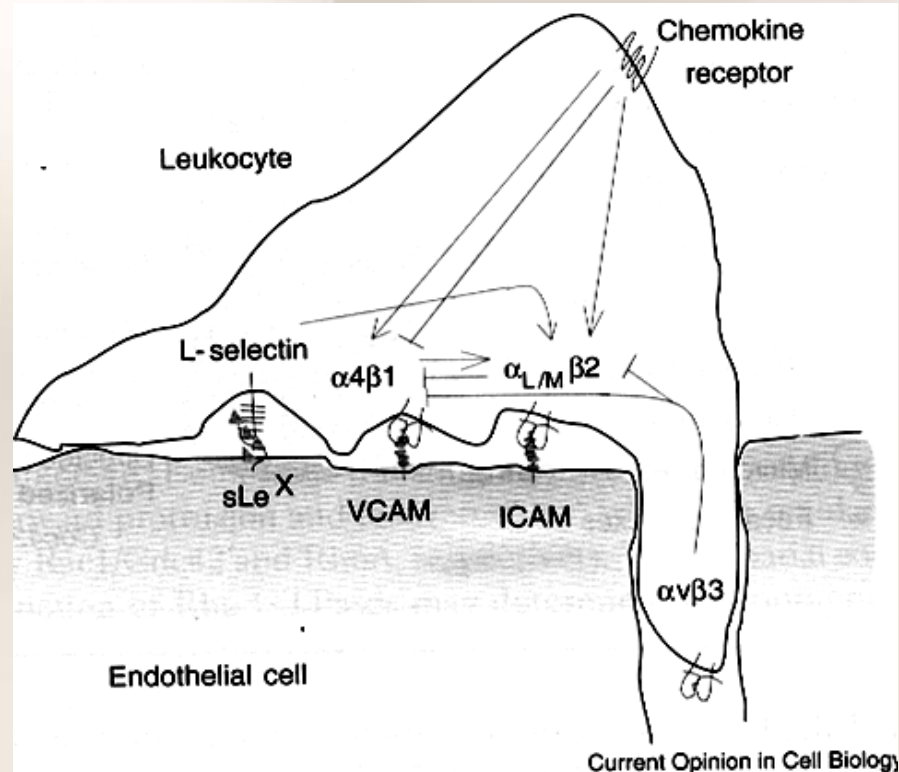
- Calcio:
 - Reabastece de MAC al frente de migración, por transporte de vesículas
- PI-3K:
 - Polarización mediada por quimiocinas
 - Activa Rac
- PTK:
 - Formación y estabilización de la unión y se ubican en el frente de migración.
 - FAK, paxilin, tenascin, Pyk2
- PKA
 - Requerida en la formación de uropodo

- Familia de GTPasa:
 - Regulan la polimerización de actina
 - Organiza las protrusiones y la adhesión focal
 - Filopodia y Lamelopodia (rac media el paso a través de las células endoteliales)
 - Rac, CDC42 (controla la dirección de la migración)
 - Rho-H favorece la separación de la cola



Recirculación de los leucocitos: Transmigración

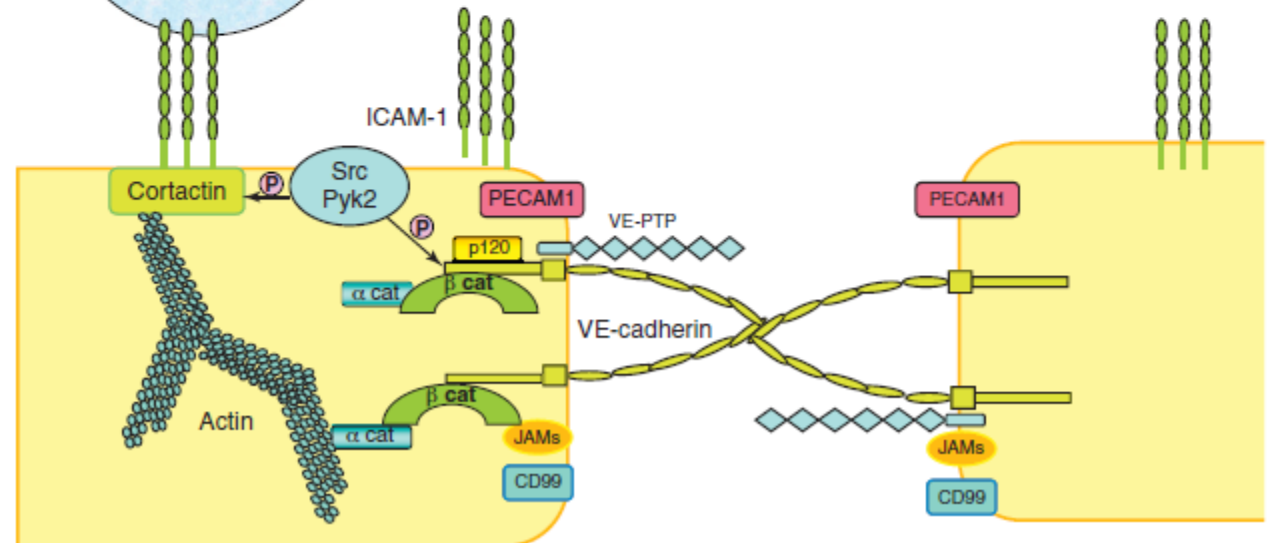
- Vencer la adhesión entre las células endoteliales
- Caderinas, establecen interacciones homofilicas y mantienen la unión endotelial
- PECAM-1 media la migración transendotelial (interacción homofílica)
- Las integrinas son el ligando de JAM (junctional adhesion molecule 1)



Recirculación de los leucocitos: Transmigración

- Vencer la adhesión entre las células endoteliales
- Caderinas, establecen interacciones homofilicas y mantienen la unión endotelial
- PECAM-1 media la migración transendotelial (interacción homofílica)
- Las integrinas son el ligando de JAM (junctional adhesion molecule 1)

(b)

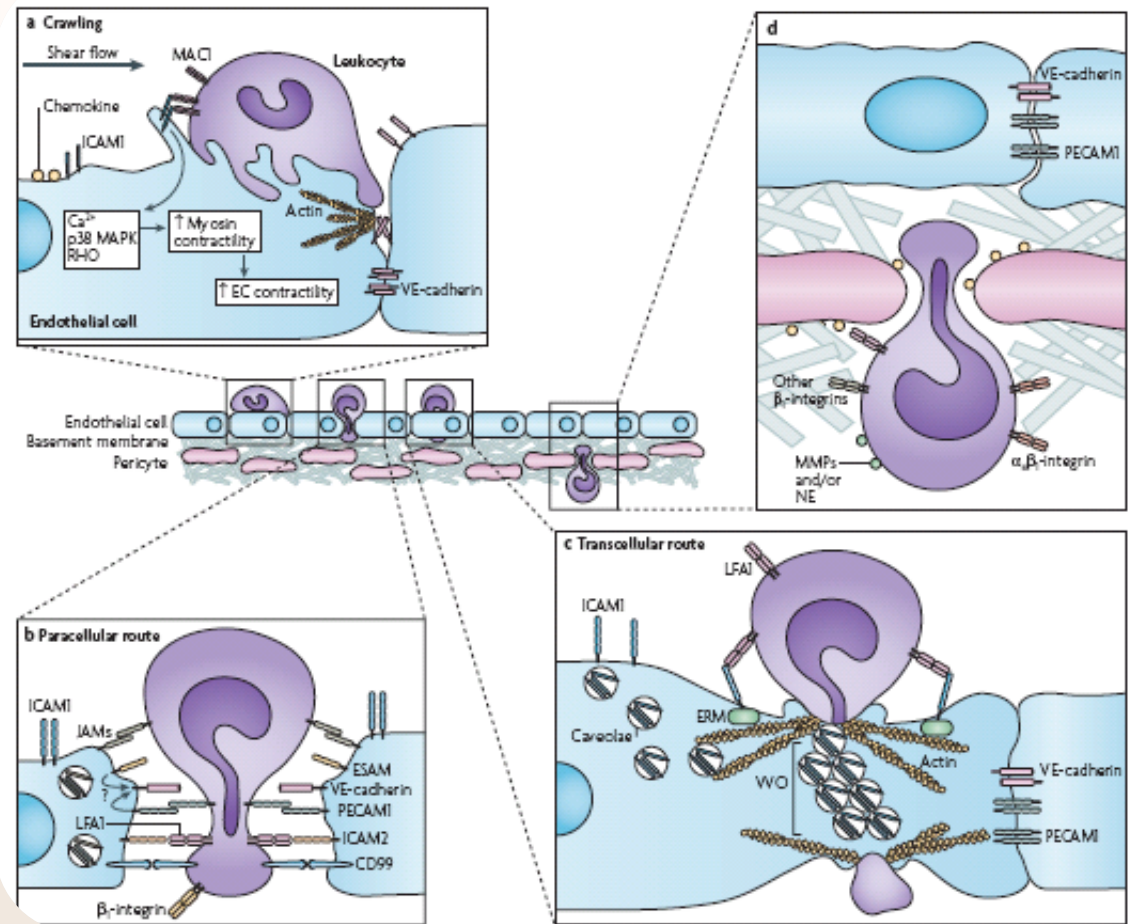


Recirculación de los leucocitos

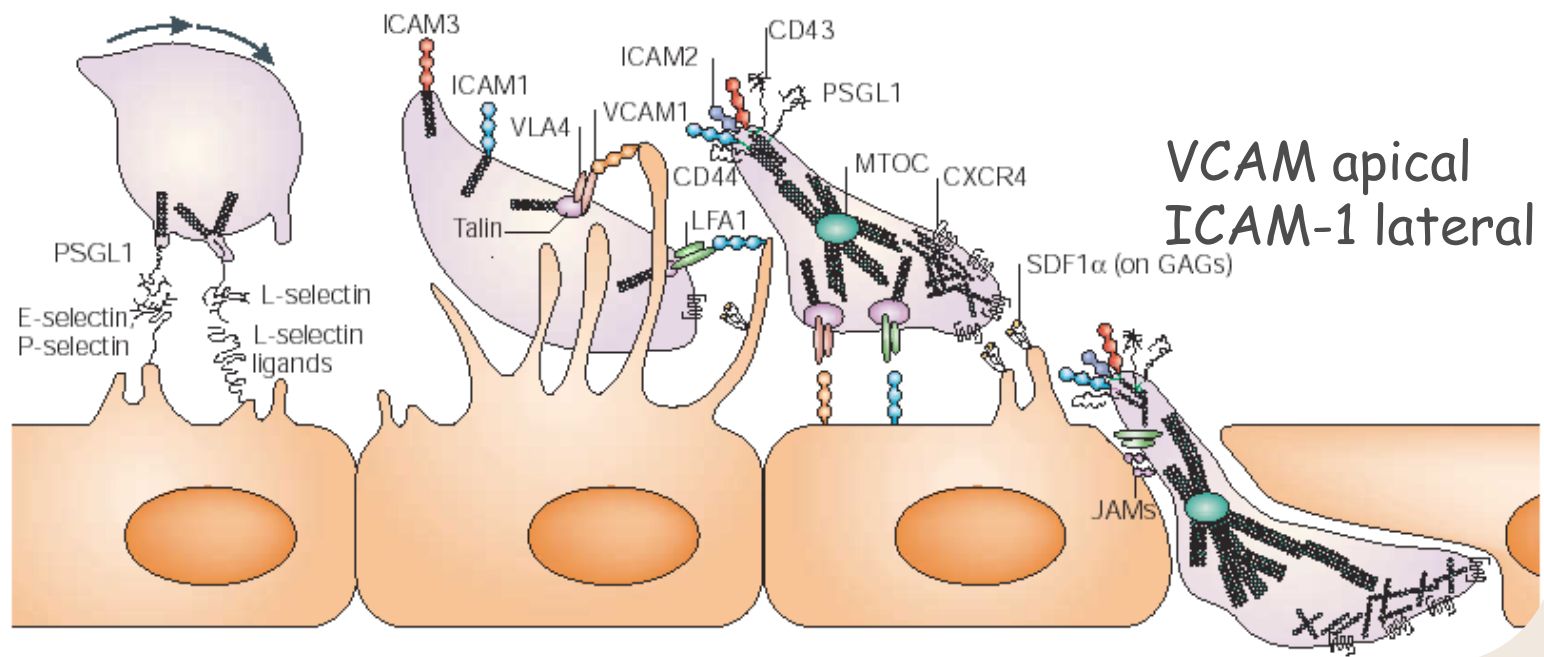
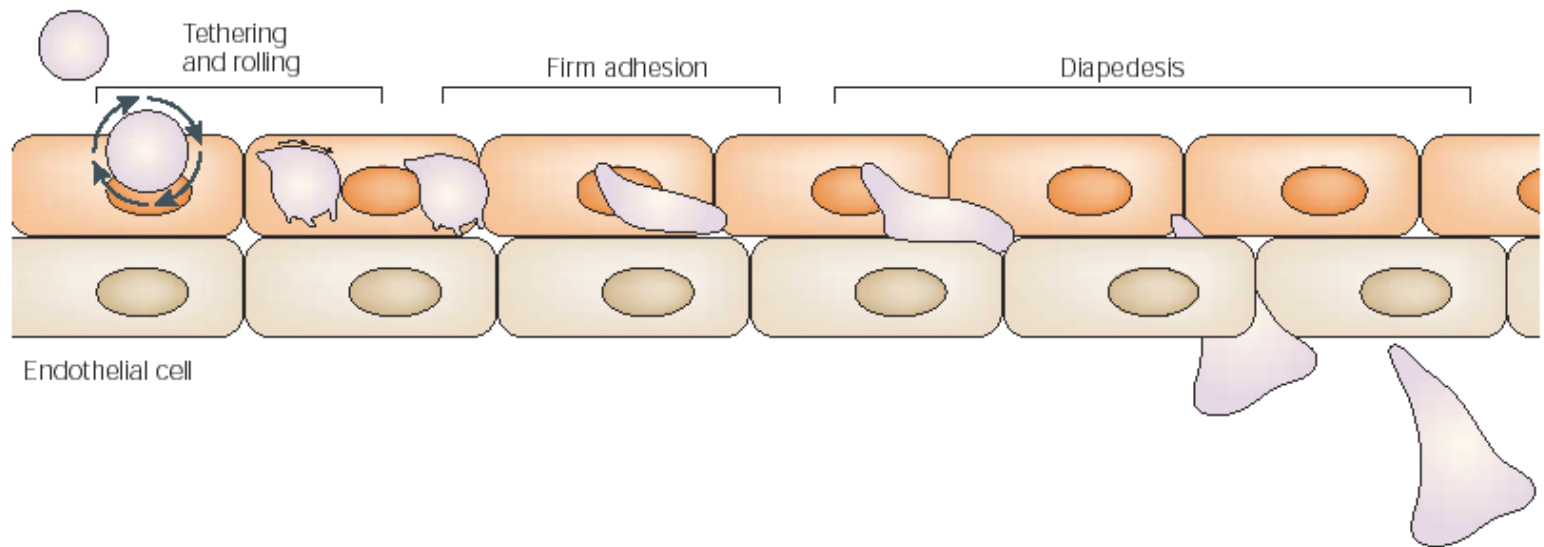
- JAM-A:
 - Participan en múltiples procesos fisiológicos, como la migración, proliferación, polaridad celular, permeabilidad paracelular
 - Tallo intracelular contiene dominio PDZ (dominio involucrado en la polaridad celular)

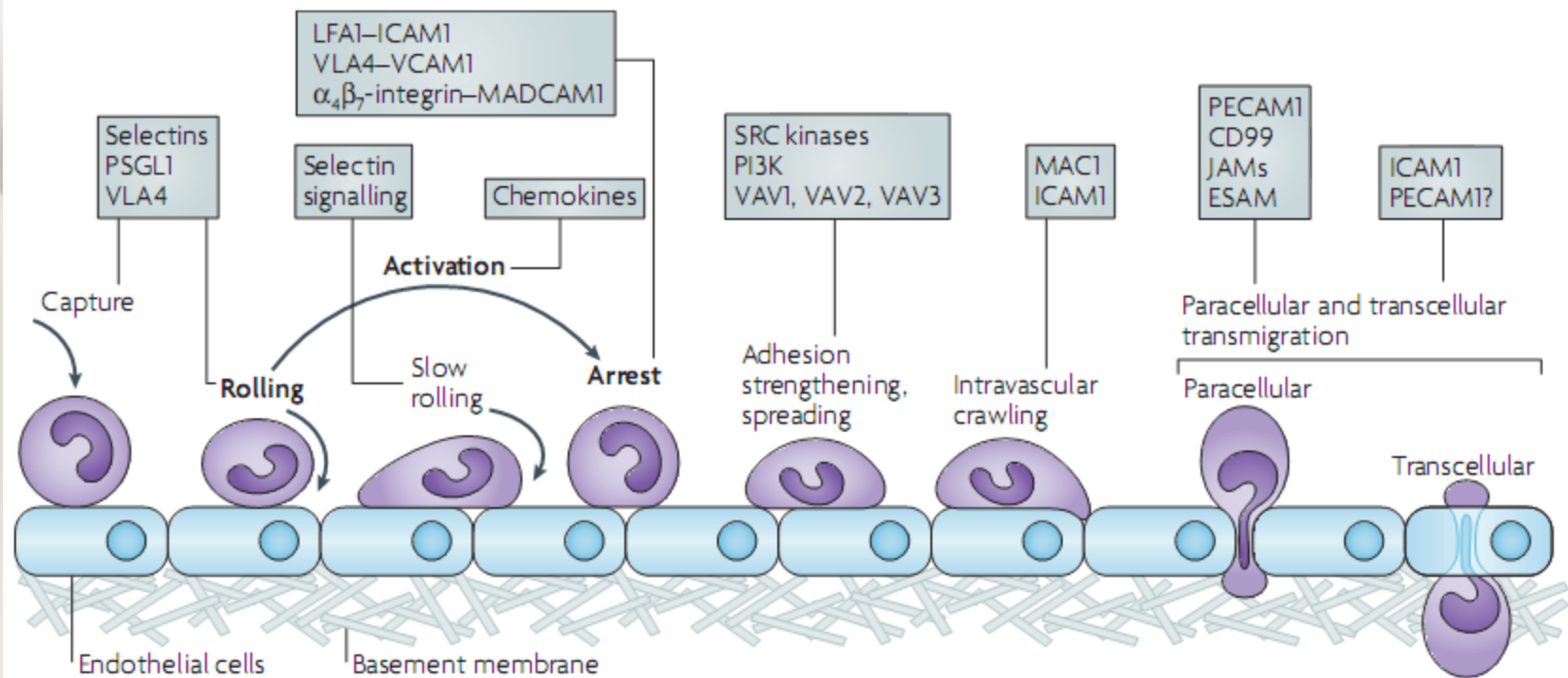
Recirculación de los leucocitos

- En monocitos y PMN, participa CX3CR1
- Depende de la interacción con las JAM
- Barreras de la migración:
 - Células endoteliales
 - Paracelular
 - Transcelular
 - Vesicular-vacuolar organellas (VVO s)
 - Células endoteliales de la membrana basal



PECAM1, ICAM1, ICAM2, JAM- A, JAM- B, JAM- C y endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM)





Bibliografía para consultar:

- Bases moleculares de las interacciones leucocito-endotelio durante la respuesta inflamatoria
 - Olga Barreiro, Francisco Sánchez-Madrid
- Modulación del tráfico leucocitario: Papel de las quimiocinas y de los opiodes
 - O.M. Pello, J.M. Rodríguez-Frade, L. Martínez-Muñoz, M. Mellado