

*ESTRUCTURACIÓ DE LA RESPOSTA B A LES
MALALTIES AUTOIMMUNITÀRIES DE LA TIROIDE*

*MEMÒRIA DE LA TESI PRESENTADA PER A OBTENIR EL GRAU DE DOCTOR EN
CIÈNCIES BIOLÒGIQUES PER LA UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA.
BELLATERRA, GENER 2004*

Ma del Pilar Armengol i Barnils



Universitat Autònoma de
Barcelona

Servei Català de la Salut
Serveis Sanitaris de Referència -Centre Transfusió Banc Teixits (CTBT)
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Crtra. del Canyet s/n, 08916 Badalona
tel. 93 4978892/3

Ricardo Pujol Borrell, Catedràtic d'Immunologia de la Universitat Autònoma
de Barcelona,

Certifiqua:

que la tesi titulada "Estructuració de la Resposta B a les malalties
autoimmunitàries de la tiroide" ha estat realitzada per Maria del Pilar Armengol i
Barnils sota la seva direcció i considera que és apta per a ser presentada i
optar al grau de Doctor en Ciències Biològiques per la Universitat Autònoma
de Barcelona.

I per tal que en quedi constància signa la present certificació a Badalona 13 de
Gener del 2004

Dr. Ricardo Pujol Borrell

ÍNDEX

ÍNDIX	i
ÍNDIX FIGURES.....	iv
ÍNDIX TAULES I ÍNDIX TAULES ANNEXES	vii

1. INTRODUCCIÓ

1.1 La recirculació limfocitària	1
1.1.1 Molècules involucrades en la recirculació limfocitària i en l'estructuració dels teixits limfoides	1
1.2 Tolerància immunològica. Generalitats	13
1.2.1 Ontogènia i tolerància T central	13
1.2.2 Tolerància T perifèrica	14
1.2.3 Ontogènia i tolerància B central	15
1.2.4 Tolerància B perifèrica	18
1 ^{er} punt de control: selecció per especificitat antigènica	36
2 ^{on} punt de control: selecció per afinitat del receptor	38
3 ^{er} punt de control: selecció per canvi d'isotip i maduració	40
1.3 Autoimmunitat	47
1.3.1 Mecanismes relacionats amb el trencament de la tolerància perifèrica	48
1.3.2 Predisposició genètica	51
1.4 Malalties autoimmunitàries i no autoimmunitàries de la tiroide	53
1.4.1 Tiroiditis de Hashimoto	53
1.4.2 Malaltia de Graves-Basedow	54
1.4.3 Mixedema primari	54
1.4.4 Altres patologies tiroïdals	54
1.4.5 Models animals d'autoimmunitat tiroïdal	55
1.4.6 Elements i mecanismes involucrats en el desenvolupament de les AITDs	56

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

2.1 Hipòtesis concretes i objectius	61
---	----

3. PROTOCOLS

3.1 Mostres	64
3.2 Processament del teixit	64
3.3 Processament de les mostres de sang perifèrica	65
3.4 Producció de línies limfoblàstiques transformades amb el virus d'Epstein barr	67
3.5 Altres línies cel·lulars	67
3.6 Obtenció i criatge de línies i clons de cèl·lules B	68
3.7 Antígens	69
3.8 Estimulacions amb citocines	69
3.9 Tinció per immunofluorescència i immunohistoquímica i anàlisi de les imatges	69
3.10 Identificació i caracterització fenotípica dels centres germinals	72
3.11 Detecció de cèl·lules B i plasmàtiques específiques per Tg i TPO	72
3.12 Morfometria dels fol·licles limfoides intratiroïdals	73
3.13 Separació cel·lular amb citòmetre de fluxe	73

3.14 ELISA	73
3.15 Assajos de quimiotaxi	75
3.16 Reacció de TUNEL	75
3.17 Obtenció de DNA genòmic	76
3.18 Obtenció d'RNA total i retrotranscripció	77
3.18.1 Microdissecció dels fol·licles limfoides tiroïdals	77
3.19 PCR, hibridació amb oligosondes específiques i semiquantificació	79
3.20 PCR quantitativa en temps real	82
3.21 Anàlisi de la longitud del CDR3	84
3.22 Seqüenciació dels amplímers del CDR3	86
3.23 Obtenció de cèl·lules eucariotes transfectants que expressin la porció extracel·lular del TSHR humà	86
3.24 Anàlisi estadística	88
4. RESULTATS	
4.1 Descripció de les tiroïdes estudiades i de les glàndules controls	90
4.1.1 Estructura de l'epiteli i de l'endoteli glandulars	90
4.1.2 Descripció de l'endoteli, percentatge d'infiltració limfocitària, composició de l'infiltrat leucocitari i distribució cel·lular	92
4.1.3 Les cèl·lules B infiltrants són majoritàriament B-2 i expressen CD23, CD50 i CD54	95
4.2 Presència i estructura dels fol·licles limfoides ectòpics a la tiroide	98
4.2.1 La presència de fol·licles limfoides secundaris és un fenomen extès a les tiroïdes amb autoimmunitat	98
4.2.2 El desenvolupament de LFs intratiroïdals correlaciona amb el grau d'infiltració	98
4.2.3 Els fol·licles limfoides ectòpics estan formats per un mantell fol·licular i un centre germinal	98
4.2.4 Els fol·licles limfoides dels GD són similars als del ganglis limfàtic mentre que els de HT són semblants als de les amígdals	100
4.3 L'estructura i la composició dels fol·licles limfoides terciaris són idèntiques a les dels canònics	101
4.3.1 Les cèl·lules B, T, dendrítiques i dendrítiques fol·liculars formen majoritàriament els fol·licles limfoides tiroïdals	101
4.4 A les tiroïdes autoimmunitàries tenen lloc els processos típics dels fol·licles limfoides secundaris	102
4.4.1 Proliferació	102
4.4.2 Reordenaments secundaris	103
4.4.3 Apoptosi	104
4.4.4 Canvi d'isotip	104
4.5 A les tiroïdes amb centres germinals ectòpics es detecten IgGs i IgMs	107
4.6 Les cèl·lules B i les cèl·lules plasmàtiques intratiroïdals estan predestinades a reconèixer autoantígens tiroïdals	108
4.6.1 El desenvolupament de LFs intratiroïdals s'associa amb el títol sèric d'autoanticossos específics d'antígens tiroïdals	108
4.6.2 Les cèl·lules B intratiroïdals són capaces de reconèixer Tg i TPO	109
4.6.3 Les cèl·lules B intratiroïdals són capaces de produir anticossos anti-Tg i anti-TPO <i>in vitro</i>	111
4.7 Les cèl·lules B intratiroïdals són oligoclonals	113

4.8 Els reordenaments dels gens de les Igs de les cèl·lules B intratiroïdals presenten una selecció dirigida per antigen	114
4.9 Als fol·licles limfoides intratiroïdals s'expressen molècules d'adhesió i endotelials involucrades en l'estructuració dels teixits limfoides 3 ^{ris}	115
4.10 A les tiroïdes es produeixen les citocines LT α , LT β , IFN γ , el receptor LTbetaR i les quimiocines CCL21, CXCL12 i CXCL13	116
4.10.1 Expressió de citocines i receptors	116
4.10.2 Expressió de quimiocines	118
4.11 Les glàndules amb autoimmunitat tiroïdal hiperexpressen LT α , IFN γ , CXCL12, CXCL13 i CCL22	121
4.12 Les tiroïdes on es desenvolupen fol·licles limfoides hiperexpressen IFN γ , CXCL12, CXCL13 i CCL22	121
4.12.1 La hiperexpressió de les quimiocines CXCL13 i CCL22 correlaciona amb el grau d'infiltració limfocitària	124
4.12.2 La combinació "grau d'infiltració limfocitària-expressió de CXCL13 i de CCL22" prediu el desenvolupament de LFs intratiroïdals	124
4.13 Els tiròcits són les principals cèl·lules productores de CXCL12	125
4.13.1 La producció de CXCL12 per la línia cel·lular HT93 segueix el mateix comportament que els tiròcits	126
4.14 El CXCL12 secretat pels tiròcits i per les HT93 té activitat quimiotàctica pels limfòcits	127
4.15 Els leucòcits que infiltren les tiroïdes expressen els receptors de quimiocines corresponents	128
4.16 Els receptors de quimiocines intratiroïdals són funcionals	134
4.17 L'expressió de CXCR4 i de CXCR5 incrementa després de cultiu	135
4.18 Distribució asimètrica dels receptors de quimiocines als malalts amb AITD	137
4.19 Els malalts amb centres germinals intratiroïdals presenten una reducció perifèrica dels nivells de CD3 ⁺ CCR7 ⁺ , CD19 ⁺ CCR7 ⁺ i CD3 ⁺ CXCR4 ⁺	139
5. TAULES ANNEXES	143
6. DISCUSSIÓ	150
7. CONCLUSIONS	157
8. ABREVIATURES	158
9. BIBLIOGRAFIA	161
10. ANNEX PUBLICACIONS	177

Fig. 1 Mecanismes de tolerància perifèrica a les cèl·lules T.

Fig. 2 Esquema dels estats de diferenciació de les cèl·lules B.

Fig. 3 Aspecte exterior i estructura interna de melsa, gangli limfàtic mesentèric i plaques de Peyer humans.

Fig. 4 Patró d'expressió diferencial d'algunes molècules d'adhesió involucrades en l'arribada dels limfòcits T pre-immunes i T memòria o efectors a les vècules d'endoteli alt (HEV) dels nòduls limfàtics perifèrics, mesentèrics i Plaques de Peyer.

Fig. 5 Passos seqüencials classificats en rodolament i activació, reforç, aturada i transmigració que determinen la transmigració dels limfòcits.

Fig. 6 Esquema dels subgrups de cèl·lules B que s'observen a l'amígdala palatina i als ganglis establerts tant en ratolins com en humans en funció de marcadors de superfície cel·lular.

Fig. 7 Molècules d'adhesió i receptors involucrats en el reconeixement entre les cèl·lules B, cèl·lules T i cèl·lules dendrítiques fol·liculars als fol·licles limfoides secundaris.

Fig. 8 Quimiocines, citocines i receptors involucrats en el reconeixement entre les cèl·lules B, cèl·lules T, cèl·lules dendrítiques madures, dendrítiques fol·liculars i cèl·lules de l'estroma als fol·licles limfoides secundaris.

Fig. 9 1^{er} punt de control o selecció per especificitat antigènica en la maduració perifèrica de les cèl·lules B que té lloc en la zona rica en cèl·lules T.

Fig. 10 Mecanismes que tenen lloc a la "reacció de centre germinal".

Fig. 11 2^{on} punt de control o selecció per afinitat ja en el centre germinal.

Fig. 12 Mecanismes que tenen lloc en la revisió del receptor

Fig. 13 3^{er} punt de control o selecció per maduració.

Fig. 14 Canvi d'isotip de les cadenes pesades de les immunoglobulines humanes.

Fig. 15 Reconeixements que determinen el balanç entre els senyals de supervivència i de mort cel·lular de les cèl·lules B en la reacció de centre germinal.

Fig. 16 Comparació dels mecanismes patogènics per explicar el desenvolupament de la tiroïditis de Hashimoto i la malaltia de Graves-Basedow.

Fig. 17 Estructures moleculars de la tiroglobulina, la peroxidasa tiroïdal i el receptor de la tirotropina.

Fig. 18 Corbes d'amplificació i corbes de melting dels estàndards per a les quimiocines CCL21, CXCL12, CXCL13 i CCL22.

Fig. 19 Optimització de les condicions d'amplificació del CDR3 mitjançant anàlisi de les corbes de melting.

Fig. 20 Estructura cel·lular tiroïdal de les glàndules amb tiroïdopaties autoimmunitàries.

Fig. 21 Estructura endotelial, infiltració limfocitària i descripció de les poblacions leucocitàries a les tiroïdes autoimmunitàries.

Fig. 22 Expressió de CD5, HLA DR, CD50, CD23 i CD54 a limfòcits B intratiroïdals.

Fig. 23 Representació gràfica de l'expressió de CD5, HLA DR, CD23, CD50 i CD54 a limfòcits B intratiroïdals i perifèrics.

Fig. 24 Aspecte del teixit limfoide intratiroïdal estructurat.

Fig. 25 Morfometria dels fol·licles limfoides intratiroïdals.

Fig. 26 Composició i distribució cel·lulars del fol·licles limfoides intratiroïdals.

Fig. 27 Proliferació i reordenaments en els fol·licles limfoides de les tiroïdes.

Fig. 28 Expressió de molècules involucrades en l'apoptosi i demostració de cèl·lules TUNEL⁺ en els fol·licles limfoides de les tiroïdes.

Fig. 29 Presència de cèl·lules B amb immunoglobulines dels diferents isotips.

Fig. 30 Relació entre la formació de fol·licles limfoides ectòpics i títols sèrics d'autoanticossos tiroïdals.

Fig. 31 Distribució de les cèl·lules B i plasmàtiques que reconeixen específicament tiroglobulina i peroxidasa tiroïdal.

Fig. 32 Especificitat antigènica de les cèl·lules B intratiroïdals.

Fig. 33 Especificitat antigènica de les línies de cèl·lules B generades per fusió.

Fig. 34 Especificitat antigènica dels clons de cèl·lules B generades per fusió.

Fig. 35 Anàlisi de la clonalitat de les cèl·lules B infiltrants de la tiroide.

Fig. 36 Presència de vècules d'endoteli alt i expressió de molècules d'adhesió als fol·licles limfoides de les tiroïdes.

Fig. 37 Expressió de citocines a les tiroïdes autoimmunitàries.

Fig. 38 Síntesi de quimiocines als fol·licles intratiroïdals.

Fig. 39 Quantificació de l'expressió de citocines i receptors a les tiroïdes autoimmunitàries.

Fig. 40 Quantificació de quimiocines a les tiroïdes autoimmunitàries.

Fig. 41 Relació entre el percentatge d'infiltració limfocitària i la transcripció de les quimiocines CXCL13 i CCL22.

Fig. 42 Regulació de l'expressió i secreció de CXCL12 en cultius primaris de tiròcits:

Fig. 43 Regulació de l'expressió i secreció de CXCL12 a la línia cel·lular tiroïdal HT93.

Fig. 44 Funcionalitat del CXCL12 α produït pels tiròcits i per la línia tiroïdal HT93.

Fig. 45 Expressió de CCR7 als limfòcits intratiroïdals.

Fig. 46 Expressió de CXCR4 als limfòcits T i B intratiroïdals.

Fig. 47 Expressió de CXCR5 als limfòcits T i B intratiroïdals.

Fig. 48 Funcionalitat del CXCR4 expressat als limfòcits intratiroïdals

Fig. 49 Increment de l'expressió de CXCR4 als limfòcits T intratiroïdals després de cultiu.

Fig. 50 Increment de l'expressió de CXCR5 als limfòcits T i B infiltrants de la tiroide després de cultiu.

Fig. 51 Expressió dels receptors de quimiocines als limfòcits infiltrants de la tiroide i comparació amb els perifèrics dels malalts amb AITD.

Fig. 52 Comparació de l'expressió de CCR7 als limfòcits perifèrics dels malalts amb AITD amb els limfòcits perifèrics de controls sans.

Fig. 53 Comparació de l'expressió de CXCR4 als limfòcits perifèrics dels malalts amb AITD amb els limfòcits perifèrics de controls sans.

Fig. 54 Comparació de l'expressió de CXCR5 als limfòcits perifèrics dels malalts amb AITD amb els limfòcits perifèrics de controls sans.

Fig. 55 Hipòtesi del desenvolupament dels fol·licles limfoides intratiroïdals.

Taula I. Relació de les principals citocines i característiques fonamentals, que inclouen els receptors que les reconeixen, els tipus cel·lulars o els teixits que les sintetitzen i les principals funcions o efectes que desencadenen.

Taula II. Llistat de quimiocines classificades en funció de la seva estructura, distribució tissular/cel·lular on es produeixen majoritàriament, receptors i paper fisiològic principal que desenvolupen.

Taula III. Alguns receptors de quimiocines i patró d'expressió en les principals subpoblacions leucocitàries.

Taula IV. Subgrups de cèl·lules dendrítiques humanes presents a l'amígdala.

Taula V. Models animals amb desenvolupament alterat del teixit limfoide.

Taula VI. Llistat de les malalties autoimmunitàries associades a un increment o una disminució en l'expressió de determinades molècules.

Taula VII. Classificació de les malalties autoimmunitàries humanes en funció de la distribució dels teixits afectats.

Taula VIII. Dades clíniques dels pacients inclosos a l'estudi.

Taula IX. Llistat d'anticossos utilitzats.

Taula X. Seqüències dels encebadors i de les oligosondes usats, condicions d'amplificació per PCR de les diverses molècules d'estudi i mida de l'amplímer obtingut.

Taula XI. Glàndules utilitzades en la que s'indiquen tant els títols d'anticossos com el percentatge de fol·licles limfoides que reconeixen específicament dos dels autoantígens relacionats amb l'autoimmunitat tiroïdal.

Taula XII. Resultats de l'anàlisi discriminant.

TAULES ANNEXES

Taula IIa, IIb, IIc, IIId. Dades morfomètriques dels fol·licles limfoides intratiroïdals.

Taula III. Quantificació del nombre de cèl·lules apoptòtiques en els fol·licles limfoides ectòpics.

Taula IV. Quantificació de l'expressió de quimiocines i citocines en tiroïdes autoimmunitàries.

Taula V. Quantificació de l'expressió dels receptors de quimiocines CCR7, CXCR4 i CXCR5 als limfòcits intratiroïdals de malalts amb autoimmunitat.

Taula VI. Expressió dels receptors de quimiocines CCR7, CXCR4 i CXCR5 als limfòcits intratiroïdals de malalts amb autoimmunitat amb els corresponents de sang perifèrica.

Taula VII. Quantificació de l'expressió dels receptors de quimiocines CCR7, CXCR4 i CXCR5 als limfòcits de sang perifèrica de malalts amb autoimmunitat amb els de controls sans.

1. INTRODUCCIÓ



1.1 LA RECIRCULACIÓ LEUCOCITÀRIA

La protecció dels organismes enfront agents externs potencialment patògens la duu a terme el sistema immunològic constituït per una gran varietat de cèl·lules i de molècules. El sistema immunològic en els humans està organitzat en diferents nivells en funció de l'especificitat de la resposta que desencadenen. En la immunitat innata, les barreres anatòmiques, el sistema del complement, les cèl·lules NK i l'activitat de cèl·lules fagocítiques com macròfags, cèl·lules dendrítiques i leucòcits polimorfonuclears juguen un paper important donat que la resposta és independent de l'antigen que l'ha originada. La immunitat adquirida, en canvi, és específica d'antigen i es duu a terme per les cèl·lules que expressen en la seva superfície cel·lular receptors que reconeixen un antigen determinat (cèl·lules T i B)¹. Les cèl·lules T són responsables de la immunitat cel·lular mentre que les B ho són de la humoral, encara que la col·laboració d'ambdues és necessària per a que tingui lloc una resposta completa. A diferència de la immunitat innata, l'adquirida genera memòria immunològica.

Per tal de protegir eficientment l'organisme de les infeccions, els leucòcits i els seus precursors es mouen i circulen com a cèl·lules no adherents per la sang i per la limfa on resideixen de manera normal i sovint, després del reconeixement d'estímuls inflamatoris, poden aturar-se, migrar cap als teixits diana de la resposta immunitària i retornar al torrent sanguini. Els circuits de localització leucocitària estan altament regulats per proporcionar selectivament als diferents subgrups de cèl·lules un microambient concret. Encara que hi ha diverses molècules involucrades en la direcció dels leucòcits al seu destí final, s'ha demostrat que el paper de les molècules d'adhesió, les citocines i les quimiocines és fonamental. Per tal de facilitar i d'agilitzar la lectura del treball, aquestes molècules seran descrites inicialment en els següents apartats.

1.1.1 Molècules involucrades en la recirculació limfocitària i en l'estructuració dels teixits limfoides

És sabut que tots els limfòcits no tenen la mateixa capacitat migratòria i, en general, es pot distingir entre migració diferencial de limfòcits verges preimmunes (naïve)/memòria i efectors/memòria. Així, els limfòcits naïve estan programats per migrar cap als òrgans limfoides secundaris on esdevindran cèl·lules memòria, mentre que els memòria tenen més capacitat d'arribada als òrgans limfoides terciaris². Com a conseqüència, el patró de molècules expressades pels limfòcits efectors no és el mateix que l'expressat pel limfòcits memòria^{3,2,4}.

1.1.1.1 Molècules d'adhesió

La localització (*homing*) dels leucòcits té lloc en múltiples passos seqüencials i està regulada, entre d'altres, per les molècules d'adhesió cel·lular (CAMs) presents als endotelis vasculars. Són proteïnes de membrana expressades constitutivament o induïdes durant una resposta inflamatòria, la presència de les quals pot variar depenent dels tipus cel·lulars presents en un microambient, del propi microambient i de les relacions amb la matriu extracel·lular. Les molècules d'adhesió poden induir-se en funció d'estímuls com citocines locals i s'expressen diferencialment en els limfòcits en trànsit cap als fol·licles limfoides secundaris i en els limfòcits ja residents. Pel que fa als estímuls inductors, una gran varietat d'estudis amb cèl·lules endotelials cultivades indiquen que la majoria de molècules d'adhesió (ICAM-1, VCAM-1, E-selectines i MadCAM-1) es poden modular per citocines com IL-1, TNF i IL-4^{5,6}.

1.1.1.1.1 Classificació de les molècules d'adhesió

Les molècules d'adhesió cel·lular involucrades en l'arribada i amb la interacció dels limfòcits amb les vècules d'endoteli alt (HEVs) presents en els òrgans limfoides secundaris (OL2^{ris}) i terciaris (OL3^{ris}) pertanyen a les següents famílies⁷: selectines,

molècules tipus mucina, integrines, superfamília de les immunoglobulines (Igs) i cadherines.

- **Selectines:** Glucoproteïnes de membrana tipus I dependents de Ca^{2+} amb un domini lectina distal que els permet interaccionar amb grups de carbohidrats sialitzats. S'han descrit L-selectina, E-selectina i P-selectina. Estructuralment estan formades per un domini lectina NH_2 -terminal que juga un paper important en el reconeixement; un domini EGF format per diversos dominis consens repetits; una zona transmembrana i una petita cua citoplasmàtica⁸. La diferència estructural entre elles és el nombre de dominis CR.

- *P-selectina* (CD62P, PECAM-3) és una proteïna de 140kDa present constitutivament en grànuls secretoris de plaquetes i endoteli, l'expressió de la qual es pot regular positivament per IL-4, IL-13 i oncostatina M. Un cop present a la superfície de l'endoteli, pot recircular per endocitosi. Els lligands que reconeix són PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) en cèl·lules limfoides, mieloides i dendrítiques i CD34.

- *L-selectina* (CD62L, LECAM-1) és present en la majoria de leucòcits i és l'única selectina involucrada en el homing dels limfòcits als teixits limfàtics. Encara que s'expressa constitutivament, s'acumula en zones després de l'activació cel·lular i en alguns models d'inflamació es considera com un mediador important del reclutament dels leucòcits en estadis tardans de la resposta inflamatòria. És reconeguda per lligands glicoproteïcs múltiples en l'endoteli (PNAds, adressines de nòdul limfàtic perifèric) o GlyCAMs (*glycosilation-dependent cell adhesion molecule*), CD34 i MadCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule*) present en l'endoteli de les mucoses.

- *E-selectina* (CD62E, ELAM-1, LECAM-2) expressada predominantment en cèl·lules endotelials, utilitza com a lligands ESL-1 (*E-selectin ligand-1*), PSGL-1 i L-selectines del leucòcits. La seva expressió es regula transcripcionalment per $\text{TNF}\alpha$ i IL-1 i un cop present a la superfície cel·lular és lentament internalitzada i dirigida cap els lisosomes per degradar-se.

Alguns estudis *in vitro* i *in vivo* amb ratolins genèticament deficientes en P-, L- i E-selectina han demostrat que el paper de les selectines, mitjançant el rodolament (*rolling*) dels leucòcits en l'endoteli, és fonamental per l'extravassació i l'arribada als teixits inflamats⁹. El ratolí KO amb el fenotip més modificat és el deficient en L-selectina¹⁰, en el que els limfòcits no s'adhereixen a les HEVs, presenten els nòduls limfàtics perifèrics reduïts i amb menys cel·lularitat i una reducció en el reclutament cap els llocs d'inflamació.

- **Molècules tipus mucina (o syndecans):** són molècules transmembrana tipus I altament glicosilades que funcionen sovint com a lligands de les selectines. Els dominis extracel·lulars dels membres d'aquesta família són força variables, mentre que els dominis transmembrana i citoplasmàtic són molt conservats. GlyCAM-1 és una mucina lligand de l'L-selectina expressada en les estructures ganglionars.

- **Integrines:** són proteïnes transmembrana heterodimèriques (formades per una cadena α i una cadena β) amb un domini extracel·lular molt llarg i un domini citoplasmàtic curt (excepte la $\beta 4$). S'expressen als leucòcits i altres i medien l'adhesió entre cèl·lules, l'adherència a l'endoteli vascular i a la matriu extracel·lular i són importants en l'organització tissular i en la migració durant el desenvolupament. S'uneixen als diferents CAMs que s'expressen a l'endoteli vascular. Algunes integrines a destacar d'entre les que estableixen unions als diferents CAMs són:

- LFA-1 (*lymphocyte-associated molecule 1*) interacciona amb ICAM-1 (*intercel·lular adhesion molecule-1*), -2 o -3¹¹ de l'endoteli alt dels nòduls limfàtics i de les plaques de Peyer¹²,

- VLA-4, $\alpha 4\beta 1$ amb VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*),
- $\alpha 4\beta 7$ (present a nivells intermitjos a les cèl·lules T preimmunes i de forma bimodal en les T efectores¹³) interacciona amb MadCAM-1.
- Superfamília de les immunoglobulines: són molècules d'adhesió d'entre 70-110 aa, que contenen un nombre variable de dominis extracel·lulars tipus immunoglobulina. En aquest grup s'inclouen com a més estudiades:
 - ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), -2, -3 i VCAM-1, que són expressades per leucòcits i per cèl·lules endotelials vasculars i s'uneixen a diverses integrines,
 - MAdCAM-1, que s'expressa a l'endoteli de mucoses, presenta tant dominis tipus Ig (a través dels quals s'uneix a integrines) com dominis tipus mucina (que medien la seva unió a selectines).

Existeixen altres molècules d'adhesió no incloses a les quatre famílies esmentades, com les cadherines (que són una família de glicoproteïnes de membrana algunes de les quals són molècules d'adhesió dependents del calci) i d'altres no agrupables (com les VAPs, *Vascular Adhesion Protein*) que també són importants en determinades interaccions adhesives. Altres, com CD44, no estan incloses en l'anterior classificació, però juguen un paper fonamental en la tolerància central de les cèl·lules B.

1.1.1.2 Citocines i receptors de citocines

Sota el terme de "citocina" s'engloben diverses petites molècules (generalment proteïnes o glicoproteïnes) que actuen com a mediadors solubles entre les cèl·lules que les secreten (en alguns casos es mostren ancorades a membrana) i les cèl·lules que responen, degut a la presència de receptors específics en la seva membrana cel·lular. En alguns casos la seva síntesi és induïble i, en general, els mRNAs que les codifiquen solen ser de vida mitja curta. Intervenien en funcions tan diverses en l'organisme com la morfogènesi i la defensa de l'organisme (especialment en la regulació de la resposta immunitària) mitjançant diversos mecanismes que controlen la mitogènesi o la funció cel·lular. Quan les citocines són secretades en excés o de forma perllongada aquestes funcions fisiològiques es transformen en patològiques i contribueixen a l'expansió de malalties invasives i a la cronificació de determinades respostes immunitàries o autoimmunitàries. Inversament, la seva absència o reducció pot contribuir a l'establiment de malalties infeccioses cròniques (immunodeficiències) o malalties limfoproliferatives. Les citocines produïdes pels leucòcits (molt especialment pels limfòcits T) es coneixen com a interleucines (IL-s). Dins del grup de les citocines s'inclouen aquelles amb capacitat quimiotàctica que es coneixen com a "quimiocines" (secció 1.1.1.3). Les seves peculiaritats fan que es valorin com un grup amb entitat pròpia i, per tant, fora de la classificació que es detalla a continuació.

1.1.1.2.1 Classificació de les citocines

Classificació per estructura

Estructuralment, les citocines són molècules diverses de classificació difícil. Encara que es poden classificar segons diferents criteris, en general s'agrupen en funció de l'estructura i la seqüència dels receptors de superfície que les reconeixen, la majoria dels quals són glicoproteïnes de membrana de tipus I amb un únic domini transmembrana. El receptor funcional sol estar format per dues o més subunitats, una de les quals és específica de citocina, mentre que l'altra és compartida amb la resta de citocines relacionades, fet que explica la redundància funcional d'algunes citocines.

- Superfamília de les hematopietines: composta per aquelles que els seus lligands presenten una homologia estructural d'uns 200aa de llarg. Hi pertanyen la IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) i GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) i M-CSF

(*macrophage colony-stimulating factor*). De manera general podem dir que regulen les respostes en la immunitat natural adquirida.

- Família dels factors de necrosi tumoral: inclou el TNF α (*factor de necrosi tumoral alfa*), TNF β (també anomenada LT α , limfotoxina) i LT β . Gran part de citocines d'aquest grup estan directament involucrades en l'organització dels fol·licles limfoides secundaris, per tant, seran tractades àmpliament a l'apartat corresponent.
- Altres citocines i interferons: inclou els IFNs, la IL-1 i el TGF- β (*transforming growth factor β*).

Classificacions funcionals

- Citocines inflamatòries: existeix un nombre elevat de citocines considerades pro-inflamatòries que intervenen en les respostes agudes o cròniques. Algunes pro-inflamatòries clàssiques són IL-1 (α i β , secretades per macròfags), el TNF α (secretat per macròfags) i el TNF β (secretat per cèl·lules T activades). Són molt similars pel que fa als efectes que produeixen i la diferència més gran entre elles és que el TNF és una molècula relacionada amb processos apoptòtics via el domini de mort (*death domain*) del seu receptor TNFR-I. L'efecte immediat que produeixen és l'increment en l'expressió de molècules d'adhesió com E-selectines, ICAM-1 i VCAM en l'endoteli i l'estimulació de l'expressió de quimiocines com IL-8 i MCP-1. La producció perllongada d'IL-1 o de TNF dona lloc a la destrucció del teixit connectiu associada a la producció de metal·loproteases que disgreguen la matriu i impedeixen la síntesi d'algunes proteïnes com els proteoglicans i el col·lagen. En aquest mateix grup es poden incloure la IL-6, la IL-12, el GM-CSF i l'IFN γ , aquelles que produeixen modificacions de la vasculatura com VEGF (*vascular endothelial growth factor*)¹⁴ i les derivades de cèl·lules T com la IL-2, la LT, la IL-4 i la IL-10¹⁵.

El grup de citocines anti-inflamatòries és molt menor, però no menys important, i inclou la IL-4, la IL-10, la IL-13 i el TGF β ¹⁶ i en alguns casos la IL-11, que actuen en part reduint la producció de citocines inflamatòries derivades de macròfags i suprimint la producció de citocines per part de les cèl·lules T.

- Citocines de la immunitat natural: són produïdes principalment per macròfags, cèl·lules presentadores d'antigen i cèl·lules en situació d'estrés. Algunes tenen activitat antiviral (IFNs i TNFs); d'altres participen en l'activació dels endotelis en els processos de transmigració leucocitària. La IL-1 és la responsable de la febre i la IL-6 és la citocina més relacionada amb la reacció de fase aguda.
- Citocines activadores dels limfòcits: són bàsicament produïdes pels mateixos limfòcits i es poden subdividir a la vegada en: *citocines inductores de la proliferació de les cèl·lules T*, com la IL-2 i la IL-15 (que comparteixen la cadena γ del seu receptor amb la IL-4, IL-7 i IL-9) que, a la vegada activen les cèl·lules NK; citocines que juguen un paper fonamental en l'expansió de les cèl·lules B i del canvi d'isotip, com la IL-4 i la IL-13, que seran comentades àmpliament en el corresponent apartat; la IL-7 relacionada amb la proliferació de cèl·lules B i de timòcits i la reordenació gènica del seu TCR; el TGF β que inhibeix l'activació i regula el creixement.
- Citocines reguladores de la resposta immunitària: les més estudiades són els interferons i, especialment l'IFN γ per la seva activitat antiviral, la capacitat activadora de macròfags i l'augment de l'expressió o la inducció *de novo* de molècules d'MHC, CAMs i molècules co-estimulatòries; també formen part d'aquest grup les limfotoxines, la IL-5, la IL-10 i la IL-12.

Dicotomia Th1/Th2: L'activació de les cèl·lules T CD4⁺ preimmunes per reconeixement d'antigen indueix la diferenciació d'aquests limfòcits en cèl·lules efectores que es poden dividir en els grups funcionals Th1 i Th2. Les citocines produïdes per un subgrup tenen

efecte autocrí i regulen negativament el funcionament de la resta dels grups. Les cèl·lules Th1 secreten IL-2 i IFN γ , TNF α o TNF β i IL-12 i són les responsables de la resposta immunològica cel·lular. Activen macròfags i provoquen reaccions d'hipersensibilitat retardada (DTH). La col·laboració entre cèl·lules Th1 productores d'IFN i macròfags provoca un augment de la capacitat anti-microbiana i l'estimulació de la producció d'IgG per part de les cèl·lules B. En ratolins, l'IFN γ promou el canvi d'isotip d'IgG2a i d'IgG3 i en humans probablement la producció d'IgG1 i d'IgG3. Les cèl·lules T CD4⁺ Th2 secreten majoritàriament IL-4 i IL-5 però també IL-6 i IL-13 i es consideren importants per la producció d'IgE. Són les col·laboradores de les cèl·lules B per excel·lència i estimulen la secreció d'IgA i d'IgE i dels isotips d'IgG que no fixen complement (IgG1 a ratolí i IgG4 a l'home). Són responsables de la immunitat humoral i suprimeixen la immunitat mediada per cèl·lules. La IL-10 inicialment es va considerar com un producte dels limfòcits T CD4⁺ Th2 però també s'ha demostrat en Th1 (especialment en humans) en macròfags activats¹⁷. El paper de la IL-4 és l'estimulació dels limfòcits B i el canvi d'isotip a IgE (involucrat en fenòmens d'hipersensibilitat immediata i immunitat a paràsits). La IL-5 és produïda per eosinòfils. Les anomenades cèl·lules Th3, secreten TGF β i probablement actuen com a reguladores.

La diferenciació de les cèl·lules T CD4⁺ a Th1 està influïda per diferents factors, el més important dels quals és la IL-12 (produïda per cèl·lules dendrítiques i monòcits). La diferenciació cap a efectores Th2 està determinada per l'exposició de les cèl·lules T CD4⁺ a IL-4 de la que no s'ha definit l'origen. D'aquesta manera, l'antigen (tipus d'antigen i concentració), els senyals de coestimulació i el microambient en el que té lloc la resposta immunitària actuen com a factors que poden influir en la diferenciació cap a una d'aquestes poblacions. Se suposa que, en condicions normals, existeix un balanç Th1/Th2 i l'alteració del balanç pot polaritzar la resposta immunitària cap a un fenotip determinat i pot contribuir al desenvolupament d'autoimmunitat.

Les cèl·lules T CD8⁺ també secreten citocines seguint patrons que s'han definit com Tc1 i Tc2. Les T CD8⁺ Tc1 serien les citotòxiques efectores de la resposta, mentre que la funció de les Tc2 no s'ha determinat però s'ha suggerit que podrien estar implicades en la resposta humoral com a ajud a les cèl·lules B o com una població de cèl·lules T reguladores que limitarien la resposta inflamatòria.

Donat que, tal com hem comentat, la classificació de les citocines no és senzilla, la *taula I* inclou un recull de les més citades al llarg del text per tal de facilitar-ne la lectura.

<p><i>Taula I.</i> Relació de les principals citocines i característiques fonamentals, que inclouen els receptors que les reconeixen, els tipus cel·lulars o els teixits que les sintetitzen i les principals funcions o efectes que desencadenen). NK, cèl·lules natural killer; DCs, cèl·lules dendrítiques; ag, antigen; NO, òxid nítric.</p>
--

nom	cèl·lula productora	receptor	efectes
IL-2	cèls. T activades	IL-2R β	promou la proliferació, diferenciació i supervivència de cèls. T i NK
IL-4	cèls. T activades, mastòcits i basòfils	IL-4R α	regulació de la diferenciació a resposta Th2 i regulació de producció d'IgE i d'IgG1 per cèls. B
IL-7	cèls. epitelials (queratinòcits, moll d'os i timus)	IL-7R	promou la supervivència i proliferació dels precursors de cèls. T i B i T madures
IL-9	cèls T Th2 activades	IL-9R	per definir en la proliferació de cèls. T
IL-10	cèls. T preimmunes i memòria, monòcits activats, cèls. B	IL-10R α i IL-10R β	modula l'angiogènesi, tumorigènesi, infecció, indueix cèls. T reguladores
IL-12	APCs (DCs i macròfags)	IL-12R (β 1 i β 2)	citocina proinflamatòria que indueix IFN γ . Promou les respostes Th1
IL-13	cèls. Th2, mastòcits i cèls. NK	IL-13R α 1, IL-13R α 2, IL-4R α	regulació de secreció d'IgE per les cèls. B
IL-15	placenta, ronyó, pulmó, DCs, monòcits, múscle esq, cor, fibroblastes,	IL-2/IL-15R β /IL-15R α	desenvolupament, supervivència i funció de les cèls. NK
IL-16	majoritària en òrgans limfoides, menys a pàncrees, pulmó i cervell	CD4	atrau cèls. T CD4+, monòcits CD4+, eosinòfils i DCs
IL-17	cèls. T CD4+ memòria activades	IL-17R	indueix secreció d'IL-6 a pell i als fibroblastes de pulmó i producció d'NO als condrocits articulars. Estimula la producció de quimiocines
IL-3	cèls. T activades, eosinòfils i mastòcits	IL-3R	estimula el creixement, diferenciació i supervivència de derivats hematopoètics
IL-5	cèls. T, mastòcits, cèls. B (baix nivell) i eosinòfils	IL-5R α	controla la producció, activació i localització d'eosinòfils
GM-CSF	cèls. T activades, fibroblastes, endoteli, macròfags i estroma	GM-CSF cadenes α i β	potent activitat estimuladora en progenitors de neutròfils, eosinòfils, macròfags. Estimula presentació antigènica de DCs
G-CSF	macròfags activats, endoteli i fibroblastes	G-CSFR	producció de neutròfils
IL-1α	constitutiva a monòcits cèls epitelials, alguns fibroblastes i macròfags,	IL-1R1	proinflamatòria. important en la proliferació cel.lular
IL-1β	monòcits, NK, cèls. B, DCs, macròfags	IL-1 β R	proinflamatòria. Important en la proliferació cel.lular
IL-18	macròfags activats, DCs cèls. mononuclears, queratinòcits, epiteli intestinal, osteoblastes		defensa contra tumors i infeccions. Indueixen IFN γ a cèls. T CD8, en cèls. NK (augmenten la citotoxicitat) i cèls. B
IL-6	pleiotròpica	IL-6R	reacció fase aguda, proinflamatòria, hematopoiesi
IL-11	fibroblastes, epitelials, condrocits, sinòvia, endoteli, osteoblastes	IL-11 α	activitat hematopoètica, protecció i restauració de mucosa gastrointestinal. Immunomodulador
TNFα	macròfags, limfòcits, queratinòcits	TNFR-I	indueix apoptosi
LTα	cèls. T, B i NK madures	TNFR-I i TNFR-II	organització teixit limfoide, inici de la resposta immunitat adquirida i innata
LTβ	cèls. T(CD4+ i CD8+) activades Th1, cèls. B	LT β R	organització teixit limfoide, inici de la resposta immunitat adquirida i innata
IFNα	cèls. origen limfoide	IFN α R, IFN α β R o IFN α R1	antivirals, inhibició del creixement, inducció apoptosi, modulació antígens MHC, activació macròfags
IFNβ	molts tipus cel.lulars (fetge, ronyó, melsa, limfòcits perifèrics)	IFN α R, IFN α β R o IFN β R	antivirals, inhibició del creixement, inducció apoptosi, modulació antígens MHC, activació macròfags
IFNω		IFN α R, IFN α β R o IFN β R	antivirals, inhibició del creixement, inducció apoptosi, activació macròfags
IFNγ	limfòcits activats Th1, cèls. NK	IFN γ R α , i IFN γ R β	activació macròfags i endoteli, augmenta l'expressió d'MHC, regula resposta immunitària específica d'antigen
TGFβ		TGF β R	

1.1.1.3 Quimiocines i receptors de quimiocines

La superfamília de les quimiocines està formada per polipèptids amb un pes molecular d'entre 8 i 14kDa, altament glicosilats amb capacitat d'estimular la motilitat dels leucòcits (quimioquinesi) i el seu moviment dirigit (quimiotaxi) mitjançant l'establiment d'un gradient. Són els principals reguladors del trànsit leucocitari donat que controlen selectivament l'adhesió, la quimiotaxi i l'activació de moltes poblacions i subpoblacions leucocitàries. Poden ser produïdes per una gran varietat de teixits limfoides i no limfoides de diferents orígens. Durant les darreres dues dècades les quimiocines han estat un camp d'estudi en expansió i se n'ha descrit un nombre elevat. Per tal de facilitar-ne la identificació es va establir una nomenclatura general que consisteix a identificar les quimiocines amb un número d'ordre seguit per la lletra "L" de "ligand" mentre que els receptors de quimiocines mantenen també un número d'ordre seguit de la lletra "R" de "receptor"¹⁸.

1.1.1.3.1 Classificació estructural i funcional de les quimiocines

Classificació estructural

La majoria presenten en la seva seqüència aminoacídica quatre cisteïnes conservades entre les quals s'estableixen dos ponts disulfur que estableixen el plegament de la molècula. La classificació es basa en la posició dels dos primers residus cisteïnics de la proteïna madura¹⁸. Així s'agrupen en famílies designades *CXC* (α), *CC* (β), *C* (γ) i *CX3C* (δ) en funció del nombre d'aa no conservats que separen els dos primers residus cisteïna¹⁹. Totes les descrites fins el moment, excepte tres, pertanyen als subgrups CXC i CC. Estan formades bàsicament per 3 dominis: a) una zona N-terminal, anterior a la primera cisteïna, sense una estructura ordenada (excepte CCL5, que té una petita regió en forma de làmina- β ²⁰, b) una zona central, amb 3 làmines- β antiparal·leles unides per nances no plegades i que forma una base sobre la que es disposa c) un extrem C-terminal, plegat com a hèlix- α hidrofòbica. L'extrem N-terminal, les làmines- β i l'hèlix- α es mantenen unides per dos ponts disulfur que defineixen la compactació globular de la molècula. La funció del domini N-terminal és la unió als receptors cel·lulars de membrana²¹. L'hèlix- α C-terminal d'algunes quimiocines interacciona amb baixa afinitat ($K_d=10^{-5}M$) amb els glucosaminoglicans (GAGs) presents a la superfície cel·lular i a la matriu extracel·lular²². La capacitat de les quimiocines d'unir-se a GAGs no és essencial per la seva funció, però optimitza la interacció amb el receptor, el manteniment del gradient i la migració quimiotàctica de les cèl·lules que expressen els receptors. Les quimiocines són madures i actives després de la proteolisi N-terminal. Algunes quimiocines presenten estructures lleugerament modificades respecte el patró descrit fins ara:

- El grup *C* només consta de dues quimiocines (les limfotactines)²³, que tot i que només disposen d'un únic pont disulfur, mantenen les característiques funcionals bàsiques.
- La família *CX3C* té un membre, la fractalquina²⁴, que s'expressa ancorada a la membrana cel·lular, però de la que també se n'ha descrit una forma soluble funcional.
- Dins del grup de *CC* quimiocines se n'han descrit algunes amb dos residus cisteïna addicionals (CCL1 (I-309)²⁵, CCL15 (Leucotactina-1 o HCC-2)²⁶, CCL23 (MPIF1)²⁷ i CCL21 (SLC)²⁸) i una altra quimiocina, CCL24 (Eotaxina-2), presenta una cinquena cisteïna no aparellada a l'extrem C-terminal.

Algunes quimiocines (com CCL5, CXCL6, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CCL11, CCL22, CCL3 i CCL4) un cop secretades, poden ser modificades per diversos enzims dels quals el CD26 és el més abundant. Les conseqüències funcionals d'aquesta proteòlisi són variades^{29,30,31} i en alguns casos (com CCL3 i CCL4) generen quimiocines amb més afinitat pel receptor^{32,33}.

Classificació funcional

- Quimiocines amb funció inflamatòria: són quimiocines, tant CC com CXC, típicament induïdes per citocines pro-inflamatòries (IL-1, TNF α o IFN γ) en monòcits, macròfags, cèl·lules epitelials, endotelials i en fibroblastes, tant en respostes tipus Th1 com Th2.

Dins del subgrup d' α -quimiocines (CXCL8 (IL-8), CXCL7 (NAP-2), CXCL5 (ENA-78), CXCL1 (GRO α), CXCL2 (GRO β), CXCL3 (GRO γ) i CXCL6 (GCP-2)) algunes presenten com a característica un motiu tripeptídic (ELR; àcid glutàmic, leucina i arginina) a l'extrem N-terminal que usen per unir-se amb alta afinitat a CXCR2^{34,35}. Són quimiocines induïbles, produïdes per una gran varietat de cèl·lules en resposta a diversos estímuls, que es troben bàsicament a les zones d'inflamació. La seva acció principal és promoure l'adhesió dels neutròfils a les cèl·lules endotelials, la seva extravassació i la migració al llarg del gradient de quimiocines associades a la matriu extracel·lular fins al lloc d'inflamació i poden actuar com angiogèniques i com angiostàtiques.

Algunes quimiocines CC també tenen funcions proinflamatòries, en general sobre cèl·lules mononuclears i es poden dividir en tres grups: grup MCP (macrophage-derived factor)/eotaxina, grup RANTES/MIP i grup HCC. 1) El grup MCP/eotaxina³⁶ és d'especial interès en els fenòmens d'hipersensibilitat de tipus I ja que entre els seus components trobem alguns potents quimioattractors d'eosinòfils³⁷. CCL2 (MCP-1) va ser primer descrit en monòcits induït per la IL-1³⁸. Comparteix un 65% de la seqüència aminoacídica amb CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3) i CCL13 (MCP-4) i, mentre totes elles utilitzen el receptor CCR2, la CCL8, la CCL7 i la CCL13 també utilitzen CCR1 i CCR3 i, a més a més, CCL8 també utilitza CCR5. Aquestes 4 quimiocines atrauen basòfils i mastòcits i poden induir-ne ràpidament la degranulació. CCL11 (Eotaxina-1) utilitza únicament el receptor CCR3 i, igual com la CCL13, atrau fortament eosinòfils i basòfils; CCL24 (Eotaxina-2 o MPIF2), que també forma part de les quimiocines al·lèrgiques ja que s'uneix al receptor CCR3³⁹. Els membres d'aquest grup també mostren altres activitats proinflamatòries com l'activitat quimioattractant per monòcits i cèl·lules de les quimiocines CCL2,8,7 i 13 (MCP-1,-2,-3,-4) que participen en les reaccions inflamatòries cròniques. 2) Un segon subgrup de quimiocines CC proinflamatòries homòlogues inclou CCL5 (RANTES), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) i CCL18 (PARC). Atrauen basòfils i també exerceixen quimioatracció sobre eosinòfils (igual que CCL3 en certes ocasions). CCL5 participa en respostes inflamatòries cròniques immunològicament regulades. CCL3 i CCL4 són dues quimiocines estructuralment i funcionalment relacionades però amb característiques que els permeten regular independentment aspectes específics de la resposta inflamatòria. L'aspecte més ben caracteritzat de CCL3 i CCL4 és la seva capacitat de regular el trànsit leucocitari. 3) En el grup HCC estan incloses CCL14 (HCC-1), CCL15 (HCC-2), CCL16 (HCC-4) i CCL23 (CK β 8-1/MPIF1). Tot i que no és un fet habitual entre les quimiocines del grup CC, CCL14 és d'expressió constitutiva en diversos teixits en els que no hi ha hagut una activació prèvia i es pot detectar al plasma humà a concentracions nanomolars. És quimioattractant per monòcits encara que el receptor a través del qual actua (CCR1) no és específic d'aquest tipus cel·lular. CCL15 mostra una expressió molt més restringida i utilitza el receptor CCR1 de forma similar a CCL3 (amb efectes potents sobre monòcits i limfòcits, i modestos sobre eosinòfils). CCL16 presenta una característica inusual ja que la seva expressió per part de monòcits augmenta per la IL-10, una citocina que disminueix l'expressió de moltes altres quimiocines i citocines.

- Quimiocines amb funció homeostàtica: es consideren quimiocines homeostàtiques les que s'expressen en teixits i òrgans en els que aparentment hi ha una absència d'estímuls inflamatoris o que són produïdes per cèl·lules que típicament no participen com a inductors actius de la inflamació. Les funcions principals en les que estan involucrades les quimiocines homeostàtiques són la recirculació limfocitària, el

desenvolupament de les cèl·lules T i B i la compartimentalització dels teixits limfoides. En el grup de les CC-quimiocines, CCL17 (TARC), CCL19 (ELC o MIP-3 β), CCL20 (LARC), CCL21 (SLC o 6CKine), CCL22 (STCP-1/ABCD-1/MDC) i CCL25 (TECK), són les que formen part del grup d'homeostàtiques. CCL17 (TARC) té un paper de guia en la migració de timòcits CD4⁺ positivament seleccionats des de l'escorça a la medul·la per a la seva selecció negativa. CCL19 (ELC), CCL20 (LARC) i CCL21 (SLC) són peculiars perquè es produeixen constitutivament en teixits limfoides i també perquè estan localitzades en el cromosoma 9 (CCL21 i CCL19) o 2 (CCL20) enlloc del 17, que és on es troben els altres gens de quimiocines CC proinflamatòries. CCL22 (MDC) s'ha relacionat amb la formació d'agrupacions de cèl·lules dendrítiques en timus i en òrgans limfoides secundaris. CCL25 (TECK) està altament expressada en el timus adult i està involucrada en el trànsit limfoide interior (s'ha proposat que CCL25 pot induir la migració de timòcits des de l'escorça tímica a la medul·la via l'expressió de CCR9 i pot ser important en la repoblació del timus post-irradiació). Els representats de les quimiocines homeostàtiques dins del grup de les CXC són principalment CXCL12 (SDF-1) i CXCL13 (BCA-1). CXCL12 és quimioatracent pel timòcits en funció de l'estat maduratiu. Així, les cèl·lules T doble negatives (DN) i doble positives (DP) responen a CXCL12 en l'escorça tímica (mentre que els limfòcits madurs CD4⁺ o CD8⁺ responen a CCL19, que s'expressa a la medul·la). CXCL12 és produïda al moll de l'os per les cèl·lules estromals⁴⁰ i sembla essencial per la maduració de les cèl·lules B. CXCL13 està constitutivament expressada a alts nivells als ganglis limfàtics, melsa, fetge i als fol·licles limfoides de les plaques de Peyer però no en moll d'os. La seves funcions principals inclouen el *homing* de cèl·lules B i el desenvolupament normal del teixit limfoide^{41,42}.

Funcions angiogèniques/angiostàtiques: Com s'ha comentat, les quimiocines CXC ELR⁺ promouen la neovascularització *in vivo* tal com s'ha demostrat en còrneas de conills i en membranes corioalantoïques de pollastres. Aquesta qualitat s'ha aprofitat per reduir el creixement i la capacitat de metastasi de tumors que les expressen constitutivament mitjançant tractament amb anticossos neutralitzants⁴³. Per contra, algunes quimiocines ELR⁻ com CXCL4 (PF4), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) i CXCL11 (I-TAC) són angiostàtiques i aquesta característica ha estat també aprofitada en el tractament de tumors en l'home^{44,45,46,43}. L'expressió d'IFN α , - β i - γ (que tenen efectes angiostàtics) suprimeixen la producció de les quimiocines angiogèniques i estimulen la secreció d'IP-10 i MIG que són angiostàtiques ELR⁻. Encara que aquest és el criteri general, hi ha excepcions: s'han descrit que les dues variants de CXCL12 (SDF-1 α i SDF-1 β) poden actuar com a quimiocines angiogèniques ELR⁻⁴⁷.

Donada la contribució d'algunes quimiocines en l'organització i compartimentalització dels òrgans limfoides, les comentarem àmpliament en propers apartats. La *taula II* resumeix les quimiocines ordenades per estructura, els teixits i tipus cel·lulars que les expressen i les seves funcions principals⁴⁸.

Taula II: Llistat de quimiocines classificades en funció de la seva estructura, distribució tissular/cel·lular on es produeixen majoritàriament, receptors i paper fisiològic principal que desenvolupen. NK, cèl·lules natural killer; DCs, cèl·lules dendrítiques.

nom	cèl·lules productores	estímuls inductors	receptors	efectes
CCL1 (I-309)	cèls. T activades, monòcits	IgG, LPS	CCR8	atrau monòcits i limfòcits Th2
CCL2 (MCP-1)	fibroblasts, cèls. epitelials i endotelials, eosinòfils, monòcits, astròcits	IFN γ , IL-1, TNF, IL-6, IL-13, IL-15	CCR2	atrau monòcits, limf. T memòria activats i basòfils (histamina) polarització Th2
CCL3 (MIP-1 α)	monòcits, cèls. T i B, microglia, DCs i NKs, fibroblastes	LPS, IL1 β , TNF α , IL2, IL6	CCR1/CCR4 CCR5	atrau neutròfils, monòcits i cèls. T CD8+. Polarització Th1. Inhibeix l'hematopoesi
CCL4 (MIP-1 β)	monòcits, cèls. T i B, microglia, DCs i NKs, fibroblastes	LPS, IL-1 β , TNF α	CCR5/CCR8	atrau neutròfils, monòcits i cèls. T CD4+. Polarització Th1.
CCL5 (RANTES)	fibroblastes, endotelials i epitelials, monòcits, cèls. T	IL-1 β , TNF α , angio-tensina II	CCR1/CCR3 -/CCR5	atracció i activació basòfils, eosinòfils i limfòcits T (també monòcits i DCs)
CCL7 (MCP-3)	monòcits, endotelials, fibroblastes, astròcits	IL-4, IL-13	CCR2/CCR1 CCR3	atrau monòcits, limf. T memòria activats i basòfils (histamina)
CCL8 (MCP-2)	fibroblastes, neutròfils, cor, pulmó, timus, pàncreas, intestí	IL-1 β , IFN γ	CCR2/CCR3 CCR1/CCR5	atrau monòcits, limf. T memòria activats, basòfils (histamina) i mastòcits
CCL11 (Eotaxina)	cèls. epitelials i endotelials, monòcits	IL-4, TNF α	CCR3	atrau eosinòfils (acció principal) basòfils i cèls. Th2
CCL13 (MCP-4)	macròfags, budell prim, colon, cèls. endotelials	IL-1, TNF, IFN γ	CCR2 CCR3	atrau eosinòfils, basòfils i mastòcits
CCL14 (HCC-1)	àmplia distribució, teixits limfoides	constitutiva	CCR1	proliferació de progenitors de medul·la òssia
CCL15 (HCC-2)	monòcits, fetge, intestí prim, colon	TNF α , IFN γ , LPS, IL-4	CCR1 CCR3	atrau monòcits i cèls. T, inhibeix la proliferació de progenitors de medul·la òssia
CCL16 (HCC-4)	monòcits, fetge	IL-10	CCR1	atrau monòcits i cèls. T, inhibeix la proliferació de progenitors de medul·la òssia
CCL17 (TARC)	timus, pulmó, intestí prim, colon	PHA	CCR4	atrau limfòcits Th2
CCL18 (PARC)	macròfags, DCs, pulmó, òrgans limfoides	LPS, IL-4, IL-13, IL-10	no definit	atrau cèls. T CD45RA ⁺
CCL19 (ELC)	timus, ganglis limfàtics, amígdala	constitutiva	CCR7	adhesió i homing de cèls. T pre-immunes a les àrees parafol·liculars
CCL20 (LARC)	teixits limfoides, amígdala, fetge, timus, monòcits i DCs	constitutiva	CCR6	inhibeix proliferació de progenitors de medul·la òssia Tràfic de cèls. T i DCs
CCL21 (SLC)	ganglis limfàtics, melsa, tiroides, timus, monòcits i DCs	constitutiva augmenta per la IL-10	CCR7	homing de cèls. T i DCs en teixits limfoides
CCL22 (MDC)	ganglis limfàtics, timus, macròfags, DCs	constitutiva	CCR4 CCR8	atrau cèl·lules NK, DCs i cèls. Th2
CCL23 (MPIF1)	pulmó, fetge, medul·la òssia, placenta	IFN β i IFN γ	CCR1	inhibeix la proliferació de progenitors de medul·la òssia
CCL24 (eotaxin-2)	cèls. T activades, macròfags	GM-CSF anti-CD3/IL-2	CCR3	atrau eosinòfils i basòfils Inhibeix la proliferació de progenitors de medul·la òssia
CCL25 (TECK)	timus (DCs i estromals tímiques)	LPS	CCR9 CCR10	atrau monòcits, DCs, tímòcits. Desenvolupament tímic de cèls. T
CXCL1 (GRO- α)	melanòcits, queratinòcits, monòcits, macròfags, cèls. epitelials	LPS, IL-1, TNF	CXCR2	atracció i activació de neutròfils, limfòcits i monòcits (també basòfils i eosinòfils)

CXCL2 (GRO- β)	<i>melanòcits, queratinòcits, monòcits, macròfags, cèls. epitelials</i>	<i>LPS, IL-1, TNF</i>	<i>CXCR2/CXC R1/DARC</i>	<i>atracció i activació de neutròfils, limfòcits i monòcits (també basòfils i eosinòfils)</i>
CXCL3 (GRO- γ)	<i>melanòcits, queratinòcits, monòcits, macròfags, cèls. epitelials</i>	<i>LPS, IL-1, TNF</i>	<i>CXCR2/CXC R1/DARC</i>	<i>atracció i activació de neutròfils, limfòcits i monòcits (també basòfils i eosinòfils)</i>
CXCL4	<i>megacariòcits</i>		<i>no definit</i>	<i>inhibidor de l'angiogènesi. Pot actuar com a procoagulant i anticoagulant. No quimiotàctic.</i>
CXCL5	<i>molts tipus cel.lulars a nivells baixos i induïble en epiteli, endoteli, monòcits, neutròfils i plaquetes</i>	<i>LPS, IL-1β, TNFα, IL-1α, fMLP</i>	<i>CXCR2</i>	<i>atracció i activació de neutròfils, regulació de l'angiogènesi, supressor de proliferació precursors mieloides, tumorigènesi, quimiotàctic per endoteli</i>
CXCL6 (GCP-2)	<i>cèls. osteosarcoma, fibroblastes i monocítiques</i>	<i>LPS, IL-1β</i>	<i>CXCR1 CXCR2</i>	<i>inflamació aguda, quimioatracient i activador de granulòcits</i>
CXCL7 (NAP-2)	<i>plaquetes, monòcits, leucòcits i neutròfils</i>	<i>LPS, PMA, PHA</i>	<i>CXCR2 CXCR1 DARC</i>	<i>activació neutròfils, degranulació enzims lisosomals, estimula fagocitosi, quimiotaxi, increment molècules d'adhesió</i>
CXCL8 (IL8)	<i>monòcits, neutròfils, fibroblastes, cèls endoteli, queratinòcits, cèls. NK, cèls. T, cèls. musculars</i>	<i>LPS, virus, bacteris, IL-1, TNF, IL-3, IL-13, -7</i>	<i>CXCR1 CXCR2</i>	<i>mobilitza neutròfils de moll d'os, angiogènesi, modulació hematopoiesi, promou replicació viral, promou proliferació endoteli</i>
CXCL9 (MIG)	<i>monòcits</i>	<i>IFNγ</i>	<i>CXCR3</i>	<i>quimiotàctic per cèls. T CD4 i NK. Angiostàtica</i>
CXCL10 (IP-10)	<i>monòcits, cèls. endotelials, queratinòcits, cèls. T i fibroblastes</i>	<i>IFNα, IFNβ, IFNγ, TNFα, LPS</i>	<i>CXCR3</i>	<i>immunoestimulant, angiostàtica i col.labora en la immunitat antitumor. Atraiu cèls. T activ, NK i monòcits</i>
CXCL11 (I-TAC)	<i>astròcits, neutròfils, monòcits, queratinòcits</i>	<i>IFNβ, IL-1</i>	<i>CXCR3</i>	<i>atrau cèls. T activades (CD4 i CD8). Antagonista de CCR3.</i>
CXCL12 (SDF-1)	<i>cèls de l'estroma de moll d'os, línies epitelials</i>	<i>constitutiva</i>	<i>CXCR4</i>	<i>atrau cèls. T naïve però també memòria, CD34+, endotelials, progenitores, B, megacariòcits. Relacionada amb desenvolupament de cèls. B i l'angiogènesi</i>
CXCL13 (BCA-1)	<i>cèls. melsa, nòdul limfàtic, fetge i apèndix</i>	<i>constitutiva</i>	<i>CXCR5</i>	<i>atrau cèls. B i cèls. T CD45RO+, IL2Rα+. Implicat en homing de cèls. B</i>
CXCL14 (BMAC)	<i>constitutiva en teixits normals i absent en tumorals</i>	<i>constitutiva</i>	<i>no descrit</i>	<i>atrau monòcits</i>
CXCL15	<i>cèls. epitelials pulmonars en ratolí</i>		<i>no descrit</i>	<i>atracció de neutròfils a pulmó</i>
CXCL16	<i>DCs (zona T dels òrgans limfoides) i cèls de la polpa vermella</i>		<i>CXCR6</i>	<i>interacció entre cèls. T i dendrítiques a melsa i a teixits perifèrics</i>
XCL1 (limfot- α)	<i>cèls. T CD8 activades, NK, NKT, mastòcits, T $\alpha\beta$ epidèrmiques</i>		<i>XCR1</i>	<i>quimioatracient per cèls. T i per cèls. NK</i>
XCL2 (limfot- β)	<i>CD8>CD4, cèls T, mastòcits, cèls NKT1.1</i>		<i>XCR2</i>	<i>atrau timòcits, DCs, cèls. T i cèls NK. Tràfic de limfòcits.</i>
CX3CL1 (fractal- α)	<i>cèls. endotelials, epiteli, DCs intestinal, cèls. T i microglia</i>	<i>TNFα i IL-1</i>	<i>CX3CR1</i>	<i>transmigració cèls. mononuclears, adhesió a l'endoteli. Atraiu cèls. T i NK</i>

1.1.1.3.2 Els receptors de quimiocines. Classificació.

Estructuralment són pèptids amb set dominis transmembrana acoblats a proteïnes G^{19,49,50,51,52}. Presenten una regió N-terminal extracel·lular, tres loops intracel·lulars i una regió C-terminal intracel·lular. Les seqüències aminoacídiques dels diferents receptors de quimiocines (que contenen de 340 a 370aa) tenen d'un 25% a un 80% d'identitat i deriven d'un ancestre comú. Funcionalment, el reconeixement d'una quimiocina per part del seu receptor resulta en una activació de les proteïnes G i la fosforilació de la fosfolipasa C que genera inositoltrifosfat i diacilglicerol que, a la vegada, indueix un increment del Ca²⁺ intracel·lular i l'activació de la proteïna quinasa C. Durant aquest temps, la cèl·lula varia la seva morfologia i és incapaç de respondre a la mateixa quimiocina a través del mateix receptor. Els receptors poden unir múltiples quimiocines i poden expressar-se en diferents tipus cel·lulars; a més, una cèl·lula determinada pot expressar diversos receptors i cèl·lules diferents poden expressar un mateix receptor. La distribució tissular i cel·lular dels receptors de quimiocines és variable en funció de l'estat de la cèl·lula considerada i en la *taula III* es resumeixen els principals receptors expressats en els diferents tipus cel·lulars. Aquesta certa redundància permet una regulació molt acurada de la principal funció dels receptors compartida amb les quimiocines que és la quimiotaxi dels leucòcits.

Els receptors de quimiocines exerceixen la seva funció principal en el desenvolupament del sistema immunitari, la defensa de l'hoste i la inflamació, encara que poden actuar circumstancialment com a factors pro-microbians^{53,54} resultat de l'explotació que en fan certs microorganismes com citomegalovirus⁵⁵ i herpesvirus VIII⁵⁶. Els receptors associats amb respostes Th1 són principalment CXCR3 i CCR5 mentre que els associats a un fenotip Th2 són CCR3, CCR4 i CCR8 però el grau d'associació no és igualment important perquè en molt casos depèn de l'estat d'activació cel·lular.

	<i>neutr</i>	<i>T repòs</i>	<i>T activades</i>	<i>NK</i>	<i>B</i>	<i>monòc</i>	<i>imDC</i>	<i>mDC</i>	<i>bas</i>	<i>eosin</i>
CXCR1	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
CXCR2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CXCR3		-	+ Th1>>Th2	+	+	+	-	-	-	+
CXCR4	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
CXCR5	-	-	+ RO+, IL-2R α	-	+	-	-	-	-	-
CX3CR1	+	-	+ CD8	+	-	+	-	-	-	-
CCR1	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
CCR2	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
CCR3	-	-	+ Th2	+	-	+	-	-	+	+
CCR4	-	-	+ Th2, RO+	+	-	-	-	-	-	-
CCR5	-	-	+ Th1>Th2	+	-	+	+	-	-	-
CCR6	-	+ CD4	-	-	+	-	+	-	-	-
CCR7	-	+ Th1, CD4, CD8	+ Th1, CD4, CD8	-	+	-	-	-	-	-
CCR8	-	-	+ Th2	-	+	+	+	-	-	-
XCR1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

Taula III: Alguns receptors de quimiocines i patró d'expressió en les principals subpoblacions leucocitàries. neutr, neutròfils; monòc, monòcits; imDCs, cèl·lules dendrítiques immadures; mDCs, cèl·lules dendrítiques madures; bas, basòfils; eosin, eosinòfils.

1.2 TOLERÀNCIA IMMUNOLÒGICA. GENERALITATS

La flexibilitat d'una resposta immunitària específica depèn de la capacitat de l'organisme de discriminar entre allò que li és propi i allò que li és aliè. Per a això ha desenvolupat diversos processos de selecció que tendeixen a eliminar les cèl·lules capaces de reaccionar contra l'organisme que les ha produït. **Tolerància immunològica** és el terme que s'utilitza per descriure l'absència activa de resposta enfront un antígen després d'una exposició i es pot aplicar tant a antígens aliens com a propis. El sistema immunitari dels mamífers aconsegueix d'establir tolerància, entre d'altres estratègies, distribuint les seves principals funcions en determinats teixits i òrgans que es mantenen funcionalment units per un sistema altament elaborat de tràfic i de recirculació⁵⁷. El fenomen de tolerància pot ser, doncs, central o perifèric en funció de l'òrgan on tingui lloc i en funció dels teixits limfoides (primaris, secundaris i terciaris) que intervinguin.

1.2.1 Ontogènia i tolerància T central

Fins a l'actualitat s'ha considerat que la finalitat de la tolerància central de les cèl·lules T és la delecció dels limfòcits T autoreactius al timus⁵⁸. Els precursors dels limfòcits T immadurs generats a partir de cèl·lules pluripotencials en el moll de l'os arriben a l'escorça tímica com a progenitors limfàtics tímics (TLPs) que no expressen TCR ni CD8 i tenen nivells molt baixos però detectables de CD4⁵⁹. Posteriorment proliferen i passen de l'etapa de cèl·lules pro-T (expressen la cadena alfa del receptor de la IL-2)⁶⁰ a cèl·lules pre-T primerenques (reordenen alternativament i successivament les cadenes β , γ i δ del receptor de la cèl·lula T (TCR) i pre-T α). Quan perden l'expressió de CD25 es consideren cèl·lules pre-T tardanes. En aquesta etapa en que les cèl·lules T expressen un TCR funcional (expressen tant CD4 com CD8 (cèl·lules doble positives, DP), té lloc la selecció positiva: reben un senyal de supervivència i, per tant, se seleccionen positivament aquelles cèl·lules T capaces de reconèixer el complex format per MHC propi+pèptid. Després d'aquest procés s'inhibirà l'expressió dels gens RAG1 i RAG2 i es detindrà el reordenament de la cadena alfa del TCR. Les que no reconeguin aquest complex moriran per apoptosi per manca de senyalització i també les que reconeguin l'MHC propi amb molta afinitat. Durant la selecció negativa, les cèl·lules T supervivents que reconeguin pèptid propi seran eliminades (potencialment autoreactives)⁶¹.

La inducció de tolerància central requereix la presència d'autoantígens al timus^{62,63,64}. Actualment s'accepta que les cèl·lules de l'estroma tímica involucrades en la selecció positiva són les epitelials corticals⁶⁵, mentre que la contribució de més d'un tipus cel·lular en la selecció negativa (cèl·lules epitelials medul·lars⁶⁶ i cèl·lules dendrítiques) està només clarament demostrada en ratolins⁶⁷. En aquests models fins i tot s'ha suggerit la possibilitat de que tingui lloc la transferència d'autoantígens entre diferents tipus cel·lulars amb diferent origen embrionari i, per tant, diferent patró d'expressió d'antígens. Actualment s'accepta que tant els antígens ubiquus com els perifèrics (circulants⁶⁸, segrestats⁶⁸ i restringits a teixits perifèrics^{62,63,69,70}) s'expressen al timus i indueixen tolerància a les cèl·lules T autoreactives. No obstant, no tots els autoantígens es transcriuen al timus i, probablement, els antígens perifèrics s'expressen al timus en concentracions molt baixes, de forma que només les cèl·lules T autoreactives d'elevada afinitat puguin ser eliminades. Les de mitjana i baixa afinitat podrien escapar a la selecció negativa i, per tant, es fan necessaris mecanismes de tolerància perifèrica que eliminin la possibilitat d'autoreactivitat. Darrerament, però, s'ha demostrat que l'expressió promíscua d'autoantígens al timus induiria la generació d'una població de cèl·lules T reguladores CD4⁺CD25⁺ que serien les responsables d'una bona part del manteniment en periferia de la tolerància. Aquest mecanisme seria complementari a la delecció clonal negativa al timus i serà comentat en l'apartat "tolerància perifèrica".