



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

“Expresión de CRTAM en linfocitos NKT y su asociación con la producción  
de IFN $\gamma$  en individuos sanos y pacientes con diabetes tipo 1”

Tesis que presenta  
Nonantzin Alicia Beristain Covarrubias

Para obtener el Grado de  
Doctora en Ciencias

en la Especialidad de  
Biomedicina Molecular

Director de Tesis:  
Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

México, D.F., Julio 2015.

**Director de tesis:**

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

**Asesores de Tesis**

Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Dra. Ma. Carmen Sánchez Torres

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Agradezco a CONACYT por el apoyo económico brindado a través de la beca número 233357 durante la realización de este trabajo.

Agradezco al Dr. Vianney Ortiz Navarrete por aceptarme como parte de su equipo de laboratorio, por su instrucción que fomenta el pensamiento y el trabajo libre y autocrítico.

*A mi madre, Araceli Beristain Covarrubias, la persona que me dio la vida y con ella, la libertad de decidir y la fuerza para enfrentar las consecuencias de mis decisiones.*

*A Nayeli, mi hermana, mi ejemplo en todo momento, la persona que me ha enseñado que la batalla más difícil es la que se libra día a día por ser mejor.*

*A toda mi familia por su comprensión, sus buenos deseos, sus palabras de aliento y su apoyo incondicional.*

*A Cristina, mi hermana por elección, quien me ha enseñado a ver la luz hasta en los momentos de mayor oscuridad.*

*A Juan Carlos, por coincidir.*

*A mis amigos y compañeros de laboratorio por el apoyo y la tolerancia.*

*Al laboratorio del Dr. Leopoldo Flores Romo por ser un complemento importante*

# Índice

|   |     |
|---|-----|
| Abreviaturas.....   | i   |
| Resumen .....   | iii |
| Abstract.....   | iv  |
| 1. Introducción.....  | 1   |
| 1.1 Antecedentes Generales.....   | 1   |
| 1.1.1 Linfocitos iNKT. ....   | 1   |
| 1.1.2 CRTAM (Class I-Restricted T cell Associated Molecule).....  | 6   |
| 1.1.3 Diabetes mellitus tipo 1 .....  | 8   |
| 1.2 Antecedentes directos.....  | 11  |
| 2. Planteamiento del problema .....   | 13  |
| 3. Hipótesis .....  | 14  |
| 4. Objetivos.....   | 14  |
| 5. Objetivos particulares: .....  | 14  |
| 6. Metodología.....   | 15  |
| 6.1 Población de estudio:.....  | 15  |
| 6.2 Material y Métodos: .....   | 15  |
| a) Muestras de sangre periférica. ....  | 15  |
| b) Obtención de células mononucleares de sangre periférica.....   | 15  |
| c) Obtención de células dendríticas a partir de células CD14+: .....  | 15  |
| d) Co-cultivo de linfocitos de sangre periférica con células dendríticas maduras pulsadas con $\alpha$ Galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer): ..... | 16  |
| e) Bloqueo de moléculas co-estimuladoras: .....   | 16  |
| f) Estimulación de linfocitos iNKT de sangre periférica de pacientes con diabetes tipo 1 y controles .....  | 16  |

|  |    |
|--|----|
| g) Citometría de flujo:.....   | 17 |
| h) Análisis de datos:.....   | 18 |
| i) Análisis estadístico:.....  | 18 |
| 7. Resultados.....   | 19 |
| 7.1 Identificar la expresión de CRTAM en linfocitos iNKT de sangre periférica de individuos sanos bajo condiciones de estimulación antígeno-específica. .... | 19 |
| Figura 1. Expresión de CRTAM en linfocitos iNKT en respuesta a estímulo antígeno específico. ....  | 20 |
| Figura 2. La expresión de CRTAM identifica a los linfocitos iNKT productores de IFN $\gamma$ en individuos sanos.....  | 21 |
| 7.2 Determinar la participación de moléculas de co-estimulación en la expresión de CRTAM en linfocitos iNKT de individuos sanos. ....                        | 22 |
| Figura 3. La expresión de CRTAM es independiente de las moléculas de co-estimulación.....  | 23 |
| 7.3 Evaluar la participación de CRTAM en la producción de citocinas (IFN $\gamma$ e IL-4) por linfocitos NKT de individuos sanos. ....                       | 24 |
| Figura 4. La expresión de CRTAM no es suficiente para generar células productoras de IFN $\gamma$ en ausencia de co-estímulo. ....                           | 25 |
| 7.4 Evaluar la expresión <i>ex vivo</i> de CRTAM en linfocitos iNKT en una cohorte de pacientes con diabetes tipo 1 y sus familiares de primer grado.....    | 26 |
| 7.4.1 Disminución en los números de linfocitos iNKT en familias con DT1. ....  | 26 |
| 7.4.2 Pacientes con diabetes tipo 1 presentan dos subpoblaciones de linfocitos iNKT. ....  | 28 |
| Figura 6. Presencia de linfocitos iNKT con baja expresión del iTCR en pacientes con DT1 y sus familiares de primer grado .....                               | 29 |
| 7.4.3 Los linfocitos iNKT <sup>lo</sup> son una subpoblación activada.....   | 30 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 7. Los linfocitos iNKT <sup>lo</sup> expresan CRTAM.....   | 31 |
| Figura 8. Los linfocitos iNKT <sup>lo</sup> expresan CD69. ....   | 32 |
| 7.5 Determinar la expresión de CRTAM en linfocitos iNKT de sangre periférica de pacientes con DT1, tras un estímulo antígeno-específico. .... | 33 |
| Figura 9. El estímulo con $\alpha$ GalCer induce la expresión de CRTAM y CD69 en pacientes con diabetes tipo 1. ....                          | 34 |
| Figura 10. Linfocitos iNKT de pacientes con diabetes tipo 1 presentan un perfil efector Th1.....  | 35 |
| Figura 11. CRTAM identifica a linfocitos iNKT productores de IFN $\gamma$ en pacientes con diabetes tipo 1 y controles sanos.....             | 36 |
| 8. Discusión .....  | 37 |
| 9. Conclusiones.....  | 44 |
| 10. Perspectivas .....  | 45 |
| 9. Bibliografía.....  | 46 |

## Abreviaturas

|                  |   |
|------------------|---|
| $\alpha$ -Galcer | Alfa Galactosil Ceramida, antígeno específico de las células NKT  |
| CD25             | Cadena $\alpha$ de alta afinidad del receptor de IL-2   |
| CD3              | Complejo proteico que forma parte del TCR   |
| CD4              | Correceptor de linfocitos T cooperadores.   |
| CD69             | Molécula de activación temprana de linfocitos y plaquetas.  |
| CD8              | Correceptor de linfocitos T citotóxicos.  |
| CRTAM            | Class-I Restricted T cell Associated Molecule   |
| CPA              | Célula Presentadora de Antígeno (Linfocitos B, Monocitos, Células Dendríticas)  |
| DC               | Dendritic Cells (Células Dendríticas)   |
| DMSO             | Dimetil sulfoxido   |
| DT1              | Diabetes Tipo 1   |
| GAD65            | Descarboxilasa de ácido glutámico isoforma de 65kDa   |
| GM-CSF           | Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)            |
| HLA              | Antígeno Leucocitario Humano. Equivalente genético del MHC en ratón.  |
| IFN              | Interferón  |
| IL               | Interleucina  |
| IMF              | Intensidad Media de Fluorescencia   |
| LCMV             | Virus de la linfocoriomeningitis  |
| MHC              | Complejo Principal de Histocompatibilidad   |
| NK               | Natural Killer. Linfocitos asesinos naturales.  |
| iNKT             | Células que expresan un receptor invariante de linfocitos T y marcadores de células NK (CD161 en humano, NK 1.1 en ratón) |
| NOD              | Ratón Diabético No Obeso  |
| PBMC             | Células mononucleares de sangre periférica  |

|      |  |
|------|--|
| PBS  | Phosphate Buffer Saline. Amortiguador salino de fosfato                                    |
| PMA  | Phorbol-12 Miristate Acetate   |
| SFB  | Suero Fetal Bovino   |
| iTCR | Invariant T cell Receptor. Receptor invariante de células T ( $V\alpha 24^+/V\beta 11^+$ ) |
| Th   | T helper. Células T cooperadoras.  |
| TNF  | Tumor necrosis factor (Factor de necrosis tumoral)   |

## Resumen

CRTAM (Class-I MHC-Restricted T-cell Associated Molecule) es una proteína transmembranal que participa en procesos de adhesión, polarización, proliferación y diferenciación celular. Esta molécula se encuentra expresada de forma transitoria en la superficie de linfocitos iNKT, T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> y NK tanto de ratón como de humano, posterior a estímulos policlonales *in vitro* y se ha relacionado con un perfil pro-inflamatorio. Por lo que se ha propuesto a CRTAM como un marcador de activación de estas poblaciones celulares, asociado a la producción de citocinas como IFN $\gamma$ , IL-22 e IL-17, particularmente en linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Además, al participar en adhesión, CRTAM se requiere para establecer la polaridad de la célula T durante la fase tardía de la activación, siendo importante para la retención de estos linfocitos en ganglio linfático conduciendo a su adecuada activación y diferenciación. Sin embargo, la expresión de CRTAM en células humanas y su función, tanto en homeostasis como en contexto de una patología, está pobremente evaluada. Por lo tanto, este trabajo se enfocó en evaluar la expresión de CRTAM en linfocitos iNKT, en respuesta a un estímulo antígeno específico; además de analizar la participación del co-estímulo en dicha expresión; y si es que CRTAM está asociada al perfil efector de las células estudiadas, tanto de donadores sanos como de pacientes con diabetes tipo 1. Los resultados demuestran que basta con la señal recibida a través del iTCR en los linfocitos iNKT para inducir la expresión de CRTAM y que, a pesar de la relativa independencia del co-estímulo para la expresión de esta molécula, CRTAM no es suficiente para inducir la producción de IFN $\gamma$  en las células iNKT en ausencia de dicho co-estímulo. No obstante, se observó una clara asociación de CRTAM con la producción de IFN $\gamma$  tanto en individuos sanos como en pacientes con DT1. Observando un mayor porcentaje de células IFN $\gamma$ <sup>+</sup> en aquellos linfocitos iNKT que expresaron CRTAM en comparación con los que no expresaron dicha molécula, independientemente del estado de salud de los individuos; lo que sugiere fuertemente el papel de esta proteína en la diferenciación hacia un perfil pro-inflamatorio productor de IFN $\gamma$ .

## Abstract

CRTAM (Class-I MHC-Restricted T-cell Associated Molecule) is a transmembrane protein that takes part in adhesion, polarity, proliferation and cellular differentiation processes. This molecule is transiently expressed on the surface of mouse and human iNKT, T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> y NK cells, after being polyclonal stimulated *in vitro*. CRTAM expression identifies activated cell populations with a pro-inflammatory profile. Thus, CRTAM has been proposed as an activation marker for cellular T CD4<sup>+</sup> populations that produce cytokines such as IFN $\gamma$ , IL-22 e IL-17. Also, being an adhesion molecule, CRTAM maintains stable polarity during the late phase of activation, playing an important role retaining cells inside the lymph node leading to a successful activation and differentiation. The expression of CRTAM on human cells as well as its role, not only under homeostatic conditions but in a pathologic context; has been poorly evaluated. Thereafter, this work was focused to evaluate CRTAM expression on iNKT lymphocytes, after an antigen-specific stimulus. Also, we analyzed the co-stimulus participation in that expression, and if such expression is associated to a specific effector profile on iNKT cells from healthy donors and type 1 diabetes patients. Our results show that signal given by the iTTCR engagement is enough to trigger the CRTAM expression on iNKT cells, with apparently no need of co-stimulation. Nonetheless, this apparently co-stimulatory-independence to express CRTAM, this expression is not sufficient to induce iNKT cells to produce IFN $\gamma$ . However, we observed a clear association between CRTAM expression and IFN $\gamma$  production, not just in healthy subjects but in T1D patients. Due to this, we found a higher frequency of iNKT IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells among those lymphocytes that expressed CRTAM in comparison with those that does not express that molecule. This association was independent of the subjects' health state; strongly suggesting a role of this protein in the differentiation to a pro-inflammatory IFN $\gamma$ -producer profile.

# 1. Introducción

## 1.1 Antecedentes Generales.

### 1.1.1 Linfocitos iNKT.

El sistema inmunológico es un conjunto de respuestas que el organismo es capaz de establecer en consecuencia a un estímulo antigénico o inmunogénico dado, generando resultados que pueden ser tanto fisiológicos como patológicos. Dichas respuestas están coordinadas por una muy amplia variedad de células que poseen la capacidad de sintetizar componentes o moléculas que participan, directa e indirectamente, en la generación de estas respuestas [1, 2]. Estas células pueden clasificarse muy ampliamente; de acuerdo a la capacidad que tienen de reaccionar ante el ya mencionado estímulo antigénico, en células del sistema innato y células del sistema adaptativo. Entre las primeras podemos mencionar a los granulocitos (Neutrófilos, Basófilos, Eosinófilos), macrófagos, mastocitos y células NK; y cuya respuesta se caracteriza por ser rápida e inespecífica. Mientras que, formando parte del sistema adaptativo, encontramos tanto a los linfocitos T como a los linfocitos B, cuya respuesta es más específica y eficiente contra el estímulo que desencadenó la respuesta. Más allá de esta muy general clasificación; existen células que participan en establecer una comunicación directa entre ambos sistemas, con el fin de optimizar y amplificar la respuesta efectora iniciada por la inmunidad innata y favorecer que la adaptativa se desarrolle de forma eficiente. Entre estas células encontramos a las células dendríticas, a las NKT, y a los denominados “Linfocitos Innatos”; cuya contribución a la generación de un eficiente sistema inmunológico ha cobrado relevancia, de tal forma que ha sido objeto de estudio recientemente.

Los linfocitos NKT (Natural Killer T cells) son células de linaje T, que presentan funciones inmnomoduladoras y que fueron descritos en el año de 1987 [3]. Estos linfocitos co-expresan en su superficie un receptor de células T (TCR) junto con moléculas características de las células NK, rasgo que les valió el nombre de NKT. Dicho TCR, a diferencia de los linfocitos T convencionales, está compuesto, en el humano, por un rearrreglo invariante (semi-invariante en el ratón) de cadenas  $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$ / $V\beta 11$  (iTCR), que le otorga la capacidad de reconocer antígenos de origen glicolípido presentados por una

molécula con una estructura similar al MHC-clase I, monomórfica, denominada CD1d; por lo que también se les conoce como células iNKT [4]. Entre los receptores, característicos de células NK, que presentan los linfocitos iNKT podemos mencionar al CD161, CD122, CD16, CD56. Más allá del fenotipo que presentan estas células, uno de sus principales rasgos es el perfil “pre-activado” o “de memoria” que poseen [5]. Dicho perfil las dota de la capacidad de responder en cuestión de “horas”, de una forma similar a la inmunidad innata, ante un estímulo, el cual no se limita únicamente al recibido a través de su iTCR, ya que también pueden ser activadas por citocinas o vía otros receptores (TLRs) [4, 6]. Además, los linfocitos iNKT comparten cierta identidad transcripcional tanto con células inmunes innatas como adaptativas [4]. De esta forma el iTCR de las células iNKT puede reconocer antígenos lipídicos, ya sea de microorganismos o endógenos; señalar y producir citocinas pro-inflamatorias que sinergicen para una activación “tipo innata” y dicha activación traducirse en un amplio espectro de funciones efectoras que orquestan ambas respuestas [4].

La frecuencia con la que se encuentran estas células en sangre periférica humana, en promedio, es del 0.1-0.2% de los linfocitos T totales, pero cabe mencionar que esta proporción es ampliamente variable entre individuos, encontrándose en rangos desde no detectables, hasta por arriba del 1%, habiendo reportes de casos muy particulares con porcentajes aún mayores [7, 8]. Los antígenos que son capaces de activar a las células iNKT identificados hasta ahora se pueden clasificar en dos categorías: los glicolípidos con base ceramida (glicoesfingolípidos) y los de base glicerol (fosfolípidos de membrana). Entre los primeros encontramos los provenientes de microorganismos como *Streptococcus pneumoniae*, *Borrelia Burdogferi*, *Sphingomonas* spp., etc [9, 10]. Además de la activación por antígenos lipídicos asociados a patógenos presentados por la molécula CD1d, las células iNKT se pueden activar mediante el reconocimiento de antígenos lipídicos propios y la presencia de un microambiente de citocinas que las estimulen (durante la ontogenia, infecciones virales, cáncer y autoinmunidades) [11]. Los antígenos endógenos que se han descrito a la fecha que son reconocidos por los linfocitos iNKT son antígenos provenientes de membranas y metabolismo celular como, glicofosfolípidos, glicolípidos con base glicerol y lisofosfolípidos [12, 13], sin embargo se ha observado que ninguno de estos antígenos endógenos son capaces de evocar una respuesta tan evidente como los

provenientes de microorganismos o como el propio  $\alpha$ -galactosil ceramida ( $\alpha$ GalCer). Los linfocitos iNKT reconocen antígenos glicolípidicos como el  $\alpha$ GalCer, un potente antígeno lipídico identificado en una muestra de una esponja marina, probablemente originado de una bacteria presente en la muestra, y que ha contribuido de forma muy importante a la caracterización y comprensión de la biología de estas células [14, 15]. Existen diferentes compuestos sintéticos que han buscado estudiar y modular la respuesta generada en las células iNKT con el objetivo de polarizarla hacia diferentes perfiles de citocinas [16]. No obstante, es importante mencionar, que ante un estímulo de activación los linfocitos iNKT generan una rápida y potente respuesta efectora con una alta producción de una gran variedad de citocinas como lo son IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, TNF, GM-CSF, por mencionar algunas. Esto se debe, en parte, a que las células iNKT contienen en su citoplasma mRNA preformado que codifica para varias de las citocinas mencionadas (IFN $\gamma$ , IL-4, IL-13) así como también gránulos de granzima y perforina [6, 17]. Esta versatilidad, por llamarla de algún modo, en la producción de citocinas ha llevado a los estudiosos en el área a intentar clasificar a estos linfocitos de forma similar a como se ha hecho con las células T convencionales. De tal forma que se han denominado subpoblaciones iNKT tipo-Th1 caracterizadas por la producción, principalmente, de IFN $\gamma$ ; no obstante, también producen citocinas del tipo Th2 de forma conjunta y expresan de forma simultánea los factores de transcripción GATA3 y T-bet, controladores maestros de estos perfiles. La subpoblación iNKT tipo-Th2 producen IL-4, IL-9, IL-10 y IL-13 posterior al estímulo y expresan igualmente a GATA3. Finalmente, la población iNKT tipo Th17, produce citocinas como IL-17A, IL-21 e IL-22 además de expresar el factor de transcripción ROR $\gamma$ t para su desarrollo conjuntamente con GATA3. Es importante mencionar que las células iNKT tipo Th17, se desarrolla como una población distinta en timo y se caracteriza por no expresar la molécula NK1.1 en el ratón [18-21]. Debemos resaltar que, muy a pesar de la clasificación en la que se quiere encajonar también a los linfocitos iNKT; y a los múltiples intentos por polarizar la respuesta de estos hacia perfiles muy definidos (Th1, Th2, TH17) los resultados obtenidos hasta la fecha demuestran que estas células son menos manipulables al respecto, en comparación con los linfocitos T convencionales, ya que conservan la capacidad de producir más de una citocina a la vez [16]. Los trabajos que se han realizado con este objetivo lo han hecho mediante el empleo

de diversos compuestos químicos con variaciones estructurales en sus cadenas acilares o sus porciones polares y, aunque han mostrado, *in vitro*, sesgos en la respuesta de los linfocitos iNKT hacia la producción preferente de una u otra citocina, dependiendo de la afinidad y la estabilidad de la unión entre el iTCR y la molécula CD1d. Este comportamiento no se ha podido reproducir, de forma absoluta, en los modelos *in vivo*, muy probablemente debido al complejo microambiente de interacciones moleculares y celulares que impera en un organismo vivo [16].

En los linfocitos iNKT, al igual que en los T convencionales, se requiere de al menos dos señales para una adecuada activación que sea capaz de conducir a su proliferación, supervivencia, secreción de citocinas y diferenciación a células efectoras. La primera señal es la dada por la interacción iTCR-CD1d-glicolípido (vTCR-MHC-péptido para las T convencionales); lo cual, en el caso de las células T convencionales, iniciará una respuesta por parte de las células efectoras y de memoria. Pero dicha señal no es suficiente para una óptima activación de los linfocitos T naive, para ello se requiere de una segunda señal que está proporcionada por moléculas de co-estimulación presentes tanto en la célula T (CD28, CD40L) como en la CPA (CD80, CD86, CD40). La unión de las moléculas de co-estimulación lleva a una optimización de la sinapsis inmunológica, la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-xL, el incremento en la transcripción y estabilidad del mRNA de IL-12 así como el incremento en la captura de glucosa y en la glicólisis. Por otra parte, como mecanismo de regulación de esta señalización, se expresan varias proteínas de superficie con función inhibitoria con el fin de prevenir o frenar la respuesta de la célula T (CTLA-4, PD-1, BTLA) [6]. A pesar de que los linfocitos iNKT expresan varias de las moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras como lo hacen las células T convencionales, la unión de estas moléculas en ambos tipos celulares puede no generar los mismos resultados. El fenotipo pre-activado o “de memoria” que presentan las células iNKT, sugiere que tienen un umbral menor para la activación comparado con los linfocitos T naive. No obstante que la secreción de citocinas por las células iNKT activadas por  $\alpha$ GalCer muy probablemente depende del adecuado balance entre las señales co-estimuladoras y co-inhibidoras, aún se desconoce si la presencia de dichas señales durante el estímulo inicial con el glicolípido dicta el resultado y la duración de una subsecuente anergia [6].

Para fines de este trabajo es importante aunar un poco más en describir algunas de las moléculas de co-estimulación que expresan los linfocitos iNKT y su señalización, con el objetivo de comprender mejor como dichas moléculas podrían estar regulando la respuesta efectora de estas células.

*Vía CD28/CTLA4/CD80/86:* Trabajos en ratón han demostrado que el desarrollo de los linfocitos iNKT depende, en gran medida, de las interacciones entre CD28 y CD80/86. Estas interacciones son esenciales para la maduración intratímica en etapas posteriores a la selección positiva, asociados a la expresión de moléculas como NK1.1, CD44, CD69 y CD122, así como la expresión intracelular del factor de transcripción T-bet y su capacidad para sintetizar IFN $\gamma$ . La expresión de CD28 en la superficie de los linfocitos iNKT periféricos, es constitutiva y se ha demostrado, a través del uso de anticuerpos bloqueadores dirigidos contra CD80/86, que participa directamente en generar una respuesta tipo Th1 ante el estímulo con  $\alpha$ GalCer. Resultados similares se han evidenciado en modelos murinos de enfermedades mediadas por respuestas del tipo Th1 (EAE, DT1), en los que se observa una supresión de la respuesta inflamatoria y por ende en el desarrollo de la patología. A pesar de los trabajos antes mencionados, aún no queda claro cómo es que la unión de CD28 en células iNKT contribuye a esta respuesta ya que los trabajos *in vitro* difieren un poco de los realizados en sistemas *in vivo* [22, 23].

En cuanto a la expresión de CTLA4, los trabajos realizados hasta el momento no han detectado la expresión de ésta molécula en la superficie o en el citoplasma de los linfocitos iNKT en reposo o activadas.

*Vía ICOS/ICOSL:* A diferencia de las células T convencionales, los linfocitos iNKT en reposo expresan de manera constitutiva la molécula ICOS, la cual incrementa después del estímulo con  $\alpha$ GalCer. Dicha expresión es independiente de la señalización CD28 y viceversa. Esta vía de señalización participa de forma importante en la homeostasis normal de las células iNKT, ya que se requiere para su supervivencia en la periferia y para una óptima producción de citocinas. Lo anterior se demostró por varios grupos al bloquear con anticuerpos monoclonales contra ambas moléculas (ICOS/ICOSL) y observar una disminución marcada en la producción de IL-4, IL-10, IL-13, IL-5 e IFN $\gamma$ . También se ha

observado que la señalización a través de ICOS podría participar en patologías inducidas por linfocitos iNKT, como asma [24, 25].

*Vía CD40/CD40L:* Las células iNKT activadas expresan un CD40L funcional que provee de “ayuda innata” a los linfocitos B. Además, la interacción recíproca entre la célula iNKT y la célula dendrítica (DC) es un pre-requisito para la respuesta efectora inducida por  $\alpha$ GalCer. Ya que, la unión de CD40L expresado en el linfocito iNKT y CD40 expresado en la DC resulta en la producción de IL-12 por parte de la DC, lo cual estimula la secreción de IFN $\gamma$  por la célula iNKT. Aparentemente el co-estímulo de CD40 e IL-12 no es esencial para la producción de IL-4 mediada por  $\alpha$ GalCer. De tal forma que, no es de sorprender, que la interacción CD40-CD40L sesgue la respuesta del linfocito iNKT hacia un fenotipo Th1 [23, 26] .

*Vía PD1/PD-L:* La expresión del este receptor monomérico con función inhibitoria PD1, es baja en las células iNKT en reposo, y rápidamente se sobre-regula posterior al estímulo con  $\alpha$ GalCer, manteniendo su expresión durante la fase anérgica que experimentan las células iNKT. Los trabajos que se han enfocado a describir esta expresión, muestran que la vía de PD1-PD-L no se requiere para el desarrollo intratímico ni para la homeostasis periférica de los linfocitos iNKT, pero sí parece mediar la anergia inducida por  $\alpha$ GalCer. Además podría estar implicada en regular la respuesta de las células iNKT en asma alérgica [27, 28].

### **1.1.2 CRTAM (Class I-Restricted T cell Associated Molecule)**

CRTAM es una proteína transmembranal tipo I de 393aa, miembro de la familia de las proteínas similares a nectinas (nectin like proteins), que contiene dos dominios de inmunoglobulina, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático en el cual se localiza un dominio PDZ de unión a proteínas capaz de ensamblar grandes complejos proteicos involucrados en gran variedad de vías de señalización incluyendo adhesión, polarización y proliferación celular [29-33]. El gen que codifica para esta molécula se encuentra localizado en la región central del cromosoma 9 en el ratón y en el humano lo encontramos en el brazo corto del cromosoma 11 [29] mientras que su ligando, Necl-2

(Cadm1, IgSF4 o Tslc1) se encuentra localizado en el brazo largo del mismo cromosoma. Necl-2 es una molécula de adhesión perteneciente a la familia de las proteínas tipo nectina (nectin like proteins) la cual también se expresa en células epiteliales y se ha asociado a sinapsis neuronal, espermatogénesis y respuesta contra tumores [34]. En células del sistema inmune se describió su expresión en una subpoblación de DC que expresan el marcador BDCA3 en humano y CD8 $\alpha$  en ratón y la cual se localiza en la zona de linfocitos T dentro del ganglio linfático, lo que sugiere fuertemente su probable participación en la interacción linfocito T-DC [35, 36].

CRTAM ha sido detectada de forma transitoria en células CD8<sup>+</sup>, NK y NKT activadas; además se ha identificado *Crtam* en ratón como un gen inducido tras la activación de linfocitos. Por lo que se ha propuesto esta molécula como un marcador de activación en estas poblaciones celulares [30]. Su expresión también ha sido descrita en células no inmunes como células epiteliales, formando parte de las uniones intercelulares; en tejidos como cerebelo (células de Purkinje), testículo y riñón [30, 32].

Un estudio realizado por Yeh y cols. muestra que CRTAM se expresa también de forma transitoria, en una sub-población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> diferenciados y activados bajo distintas condiciones; revelando que sólo las células que expresan CRTAM producen IFN $\gamma$ , IL-22 e IL-17. En contraste, no se detectan diferencias en la secreción de IL-4 entre células T CD4<sup>+</sup>, que expresan o no la molécula CRTAM. Lo que les sugiere que la expresión de CRTAM en una sub-población de células T CD4<sup>+</sup> naive, se asocia a una mayor capacidad para sintetizar y secretar citocinas pro-inflamatorias posterior a su activación. Así mismo se demostró que en el ratón deficiente de CRTAM (*Crtam*<sup>-/-</sup>) estos linfocitos presentaban una disminución en la secreción de IFN $\gamma$  posterior a la estimulación ya sea primaria o secundaria, además de presentar niveles disminuidos de RNAm para IFN $\gamma$  cuando éstas eran diferenciadas bajo condiciones Th1. Un comportamiento similar se observó para IL-22 y en menor magnitud para IL-17. En cuanto a linfocitos T CD8<sup>+</sup> *Crtam*<sup>-/-</sup>, la activación del TCR resultó en una disminución en la secreción de IFN $\gamma$  tanto en la población naive como en las poblaciones efectora y de memoria [37]

Además de la activación y su función efectora, la expresión de CRTAM también participa en adhesión y es requerida para establecer la polaridad de la célula T durante la fase tardía de activación [37]. En este sentido Takeuchi y cols. en el 2009 evalúan, *in vivo*,

el impacto de la expresión de CRTAM en un modelo de diabetes, demostrando que CRTAM es importante para la acumulación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> dentro del ganglio linfático mediante su retención, modulando así su respuesta durante una fase tardía de la activación de la célula T [31].

Recientemente se ha demostrado la expresión diferencial del gen de *crtam* en timocitos y linfocitos T CD3<sup>+</sup>, provenientes de ratones NOD durante el desarrollo de DT1; sin embargo, la expresión de la proteína en linfocitos iNKT no ha sido demostrada en esta patología. [38].

### **1.1.3 Diabetes mellitus tipo 1**

La Diabetes Tipo 1 (DT1) es el desorden autoinmune más común en la infancia, se estima que afecta alrededor del 3% de la población menor de 14 años alrededor del mundo [39].

La DT1 se desarrolla como consecuencia de la destrucción gradual de las células  $\beta$ -pancreáticas productoras de insulina, lo que eventualmente resulta en una pérdida total de éstas con el consecuente descontrol de la glucosa en sangre y la completa dependencia de insulina exógena [40]. La presentación clínica de la DT1 es precedida por un periodo asintomático de duración altamente variable que va desde pocos meses a incluso más de 10 años en algunos casos [41, 42].

Esta patología se considera una enfermedad compleja, cuyo desarrollo se encuentra mediado por múltiples factores tanto genéticos como ambientales. Entre los genes o regiones génicas que se han asociado a esta enfermedad, la región que codifica para moléculas HLA clase II; permanece con la más fuerte asociación. Además del HLA se han identificado más de 40 loci asociados con DT1 entre los cuales encontramos polimorfismos en la región promotora del gen de la insulina; el gen de PTPN22 importante fosfatasa que regula negativamente la señalización del receptor de células T (TCR); al gen que codifica para la cadena alfa del receptor de IL-2 (IL-2RA) y al de CTLA4 [43, 44].

No obstante, solo una proporción de los individuos con susceptibilidad genética a padecer DT1 progresan a la fase clínica de la enfermedad. Esto implica que se requieren de factores adicionales para desencadenar y dirigir la destrucción de las células  $\beta$  en aquellos sujetos predispuestos genéticamente [41, 43]. Como un ejemplo de factores exógenos que influyen en la incidencia de esta patología podemos mencionar a las infecciones virales, las cuales se han asociado por medio de tres mecanismos distintos: a) Mediante una infección directa de células  $\beta$ ; b) A través de mimetismo molecular, el cual consiste en una respuesta inmune cruzada contra secuencias similares entre antígenos virales y antígenos de las células  $\beta$  (ejemplo: proteína gp33 de virus coxaquie y GAD65 en la célula pancreática) podría desencadenar la activación de células T auto-reactivas y por tanto la destrucción tisular; c) O bien a consecuencia de un efecto “bystander” resultado de la infección viral y la activación del sistema inmunológico favoreciendo un ambiente pro-inflamatorio que afecte indirectamente a las células pancreáticas [45, 46]. Entre los virus que han sido asociados a esta patología podemos mencionar al virus coxackie B4 (CVB4), citomegalovirus (CMV), rotavirus y rubeola [47].

Los resultados que derivan de modelos experimentales de DT1, particularmente del Ratón Diabético NOD (Non-Obese Diabetic), han mostrado la participación de varias poblaciones celulares del sistema inmunológico en la destrucción de las células  $\beta$ . Entre ellas linfocitos T  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  y macrófagos han mostrado un papel directo en la muerte de las células productoras de insulina. Además de éstas, otros tipos celulares están presentes en el infiltrado pancreático y en el ganglio linfático pancreático, donde se lleva a cabo la presentación inicial del antígeno por las células dendríticas a las células T antígeno-específicas; incluyendo a linfocitos B, células NK, NKT y DCs [45].

La progresión de la diabetes, en los ratones NOD hembras, se caracteriza por una peri-insulitis no destructiva entre la semana 3 y 4 de edad, que consiste inicialmente en DCs y macrófagos, seguidos por células T y B. Esta fase es seguida por una destrucción completa de las células  $\beta$  mediada por linfocitos T, alrededor de las 16 y las 24 semanas de edad, de tal forma que a las 30 semanas el 80% de los ratones NOD hembras presentan la enfermedad [44]. Las células T  $CD4$  son predominantes en la fase temprana de la insulitis y el papel de las subpoblaciones Th1 y Th2 ha sido evaluado mediante ensayos de

transferencia, y se ha documentado la participación de la producción de citocinas Th1 como IFN $\gamma$  por parte de las células infiltrantes iniciales favoreciendo el subsecuente reclutamiento de células T activadas. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> no tienen la capacidad de invadir los islotes y transferir la enfermedad, pero su ausencia es crítica en el desarrollo de la patología. Lo anterior remarca la necesidad de ambas poblaciones para una eficiente invasión y destrucción de los islotes pancreáticos [41, 48].

Recientemente, los linfocitos NKT han sido implicados en la regulación de la enfermedad autoinmune tanto en humanos como en ratones.[49] Múltiples estudios han mostrado el papel de esta población en la prevención de enfermedades autoinmunes, particularmente DT1. Dichos reportes muestran que el incremento en la frecuencia de las células NKT, reduce de forma substancial la incidencia de DT1 en el ratón NOD. [45]

Se ha descrito que el ratón NOD presenta una deficiencia tanto numérica como funcional en la población de linfocitos iNKT, con una producción anormal de IFN $\gamma$  e IL-4 tras ser estimulados [50]. El incremento de la frecuencia de esta población, ya sea por transferencia adoptiva o en un modelo transgénico, reduce significativamente la incidencia de DT1 en este modelo murino. Esto aparentemente es debido que las células iNKT inducen un estado de anergia en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> auto-reactivos, y repercutiendo directamente en la capacidad de estas células para producir IFN $\gamma$  [51]. Un efecto protector similar fue observado tras estimular específicamente a los linfocitos NKT con  $\alpha$ GalCer o sus análogos.[45]

Tanto el grupo de Sharif y cols. así como Hong y cols. mostraron en el 2001 que la activación de las células NKT por el tratamiento con  $\alpha$ GalCer previene el inicio y la recurrencia de la DT1 en el ratón NOD, promoviendo un ambiente enriquecido con citocinas Th2 en bazo y ganglios linfáticos pancreáticos, también observó que las células T antígeno específicas de ratones tratados tenían una producción incrementada de IL-4 y una disminución de la producción de IFN $\gamma$ . [52-54]

La relevancia clínica del defecto en las células NKT del ratón NOD no se ha podido establecer en el humano. Los resultados de diversos estudios muestran desde una baja frecuencia de esta población celular en sangre periférica de pacientes con DT1 comparado

con sus gemelos idénticos mostrando también un defecto en la producción de IL-4 [55]; niveles similares a los de los sujetos sanos [56]; e incluso un alto porcentaje de células NKT en estos pacientes comparado con otros grupos de riesgo y sujetos control. [57] Otro estudio muestra que si bien la frecuencia de las células NKT en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) no difiere entre grupos de estudio, las clonas de las células NKT de pacientes muestran una desviación hacia fenotipo Th1 y una reducción en la subpoblación NKT CD4<sup>+</sup>. [58]

### **1. 2 Antecedentes directos.**

Estudios recientes de nuestro grupo de trabajo, muestran una disminución significativa en el número absoluto de linfocitos NKT en pacientes con DT1 comparado con el grupo control. Debido a que esta disminución fue encontrada también en los familiares no diabéticos de los pacientes, no fue posible explicar la participación funcional de los linfocitos NKT por la sola disminución en la frecuencia. Para esto se realizó un análisis de la activación de estas células, en base a la expresión de moléculas de activación (CD69 y CRTAM). En el análisis inicial se identificó la presencia de dos poblaciones de NKT en base a la expresión del iTCR, una población con una alta expresión del receptor y otra con una expresión disminuida de éste; dividiéndolas así en iTCR<sup>hi</sup> e iTCR<sup>lo</sup> [59].

Al analizar el estado de activación de las células NKT con base en la expresión de CRTAM y CD69, éstas moléculas se identificaron en linfocitos NKT que expresaban un iTCR<sup>lo</sup>, presente sólo en algunos pacientes y algunos de sus familiares, sugiriendo la existencia *ex vivo* de una población activada de NKT en familias de pacientes con DT1 [59, 60] .

La funcionalidad de esta población no fue evaluada en este estudio, sin embargo estudios preliminares en nuestro grupo de trabajo sugieren que los linfocitos NKT de individuos sanos, activados *in vitro* con  $\alpha$ GalCer y que expresan CRTAM, son productores de IFN $\gamma$  [60].

Recientemente, nuestro grupo de trabajo identificó la expresión de CRTAM en la superficie de tanto granulocitos (Eosinófilos y Neutrófilos) como linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> obtenidos de pacientes con diagnóstico de asma [61]. Sin embargo, la participación que

podría estar teniendo esta molécula en la patogenia tanto de asma como de DT1 no ha sido evaluada.

En resumen, la expresión de CRTAM en células humanas y su función, en estado de homeostasis así como en escenarios patológicos, está pobremente evaluada. Por lo tanto, el análisis de la expresión de CRTAM en linfocitos iNKT provenientes de individuos sanos y pacientes con DT1, tanto *ex vivo* como posterior al estímulo antígeno específico *in vitro*, además de la identificación del perfil efector que presentan las células que la expresan, puede brindar información relevante acerca del papel que CRTAM pudiera estar desempeñando no sólo de manera fisiológica sino en el marco de una autoinmunidad.

## **2. Planteamiento del problema**

La expresión de CRTAM ha sido ampliamente descrita en células del sistema inmune y de otros tejidos, cuya función como molécula de adhesión en la formación de las uniones intercelulares y su participación en la generación de perfiles efectoros ha quedado de manifiesto. Sin embargo, estas funciones se han evaluado en células de ratón o líneas celulares empleando estímulos policlonales. Si bien, estos trabajos han proporcionado un gran avance en el conocimiento de la biología de esta molécula, pueden no ser completamente extrapolables a lo que podría estar sucediendo en el ser humano. Existen muy pocos reportes en donde se evalúe la expresión de CRTAM en células humanas en condiciones basales, bajo estímulos antígeno específicos o en condiciones patológicas.

Por lo tanto, resulta relevante estudiar si la expresión de CRTAM requiere únicamente la estimulación antigénica o también de moléculas de co-estimulación además si su expresión se asocia a un perfil efector inflamatorio en linfocitos iNKT de pacientes con diagnóstico de DT1.

### **3. Hipótesis**

La expresión de la molécula CRTAM en linfocitos iNKT se asocia con la producción de IFN $\gamma$  tanto en individuos sanos como pacientes con diabetes tipo 1.

### **4. Objetivos**

Objetivo General: Evaluar la expresión de CRTAM y su participación en la producción de IFN $\gamma$  por linfocitos iNKT de individuos sanos y pacientes con diabetes tipo 1.

### **5. Objetivos particulares:**

- 5.1 Identificar la expresión de CRTAM en linfocitos iNKT de sangre periférica de individuos sanos bajo condiciones de estimulación antígeno-específico.
- 5.2 Determinar la participación de moléculas de co-estimulación en la expresión de CRTAM en linfocitos iNKT.
- 5.3 Evaluar la participación de CRTAM en la producción de citocinas (IFN $\gamma$  e IL-4) por linfocitos iNKT.
- 5.4 Evaluar la expresión ex vivo de CRTAM en linfocitos iNKT en una cohorte de pacientes con diabetes tipo 1 y sus familiares de primer grado.
- 5.5 Determinar la expresión de CRTAM en linfocitos iNKT de sangre periférica de pacientes con diabetes tipo 1, bajo condiciones de estimulación antígeno-específico.
- 5.6 Analizar la población de linfocitos iNKT que producen IFN $\gamma$  y expresan CRTAM posterior en pacientes con diabetes tipo 1.

## 6. Metodología

### 6.1 Población de estudio:

Se analizaron 391 sujetos, incluyendo 69 pacientes con reciente diagnóstico de DT1 (<3 meses), diagnosticados de acuerdo a los criterios de la ADA en el Hospital de Pediatría del “Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS”, 76 hermanos no diabéticos, y 116 padres (madres y padres). En el grupo control, se incluyeron 53 sujetos sanos de edad similar a la de los pacientes, 20 hermanos y 57 padres. Todos los sujetos o sus tutores legales firmaron un consentimiento informado previo a la toma de muestras.

### 6.2 Material y Métodos:

- a) *Muestras de sangre periférica.* Se emplearon concentrados leucocitarios de donadores sanos o bien se obtuvieron 10ml de sangre periférica en tubos con heparina correspondiente ya fuera a casos o controles.
- b) *Obtención de células mononucleares de sangre periférica:* En esterilidad se transfirió la muestra de sangre heparinizada o de concentrados leucocitarios, según el caso, a tubos cónicos de 50ml y se diluyó en una relación 1:1 con PBS 1x pH 7.4 estéril. En tubos cónicos de 15ml o de 50ml, según correspondiera, se colocó 1ml de Ficoll-Paque por cada 2ml de la dilución anterior para tener una proporción 1:2. Cuidadosamente se adicionó la dilución de sangre al Ficoll evitando mezclarlos. Las muestras fueron centrifugadas a 1500rpm a temperatura ambiente durante 30 minutos. La fase correspondiente a los linfocitos fue recuperada y transferida a un tubo cónico de 15ml o 50ml, como correspondiera, se aforo con el volumen necesario de PBS estéril y centrifugo a 1500rpm a 5°C por 5 minutos, repitiendo este paso hasta completar 2 lavados. Se retiró el sobrenadante, las células se resuspendieron en PBS y se contaron en cámara de Neubauer.
- c) *Obtención de células dendríticas a partir de células CD14+:* Las células dendríticas (DCs) se obtuvieron a partir de PBMCs obtenidos de concentrados leucocitarios de donadores sanos se purificaron monocitos por selección positiva, mediante anticuerpos acoplados a perlas magnéticas (Miltenyi Biotec). La población celular obtenida se colocó en placas de 24 pozos a razón de  $1 \times 10^6$  de células por pozo

resuspendidas en 1 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB), 1000 unidades de GM-CSF/ml (Peprotec) y 800 unidades de IL-4/ml (Peprotec) cada tercer día durante 5 días, al sexto día se agregó 25 ng de TNF- $\alpha$  como estímulo de maduración, dejando en cultivo por 48 hrs. La fracción CD14 negativa del mismo individuo fue resuspendida en SFB con 10% de DMSO y distribuida en crioviales a razón de  $10 \times 10^6$  por vial y se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante el proceso de diferenciación. Posterior a este proceso la fracción CD14 negativa fue descongelada 24hrs antes del co-cultivo.

- d) *Co-cultivo de linfocitos de sangre periférica con células dendríticas maduras pulsadas con  $\alpha$ Galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer):* Una vez concluido el protocolo de diferenciación, las placas de 24 pozos que contenían las células dendríticas derivadas a partir de monocitos CD14<sup>+</sup> fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se lavaron las células con 1 ml de medio DMEM suplementado con 10% de SFB, posteriormente se resuspendieron en 1 ml del mismo medio DMEM suplementado adicionado con 100ng/ml de  $\alpha$ GalCer y fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$ , durante las 24 horas siguientes. Transcurrido este tiempo, las células dendríticas pulsadas fueron centrifugadas, lavadas y finalmente resuspendidas en 500 $\mu$ l de medio DMEM suplementado con 10% de SFB. A los mismos pozos se adicionaron los linfocitos CD14<sup>-</sup> del mismo individuo a razón de  $4 \times 10^6$  (relación 1:4) en 500 $\mu$ l del mismo medio de cultivo empleado por pozo y se incubaron durante 18hrs.
- e) *Bloqueo de moléculas co-estimuladoras:* Siguiendo el protocolo de co-cultivo previamente descrito se colocaron, en este caso, anticuerpos dirigidos contra las moléculas CD80, CD86, CD40L (CD154) o bien los tres, a una concentración de 10 $\mu$ g/ml, dependiendo de la condición a evaluar.
- f) *Estimulación de linfocitos iNKT de sangre periférica de pacientes con diabetes tipo 1 y controles:* Posterior a obtener las PBMCs de pacientes con DT1 y controles, se colocaron en placas de 24 pozos a razón de  $3-5 \times 10^6$  por pozo, con 1 ml de medio RPMI suplementado con 10% de SFB, 50 $\mu$ M de  $\beta$  mercapto-etanol y 10 $\mu$ l/ml de antibiótico- antimicótico (Life Technologies), bajo dos condiciones: sin estímulo o con  $\alpha$ GalCer 100ng/ $\mu$ l (Alexis Biochemicals, CA, USA). El tiempo de cultivo fue

de 18hrs, durante las últimas 4hrs se colocaron 10µg/ml de Brefeldina A (BFA) para inhibir el tránsito vesicular de las células y acumular, así, las citocinas producidas por éstas.

- g) *Citometría de flujo*: La fenotipificación de las poblaciones celulares así como la identificación de moléculas de activación y citocinas, se llevó a cabo mediante tinción de superficie e intracelular de las PBMCs con los siguientes anticuerpos acoplados a los fluorocromos indicados: anti-Vβ11-Fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-Vα24-Phycoerythrin (PE), anti-CD69-PE-TexasRed (PE-TR) (Beckman Coulter), anti-CD3-Brilliant Violet 510 (BV510) o -FITC, anti-CD4-PE, anti-CD8-Pacific Blue (PB), anti-IL-17-Per-CP-Cy5.5 (BioLegend), anti-CRTAM-Allophycocyanin (APC) (R&D Systems), anti-IL-4-PECy7, anti-IFNγ-PECy7 o -FITC (eBioscience o BD biosciences). Se utilizaron los controles de isotipo correspondientes para cada uno de los anticuerpos. Se emplearon gammaglobulinas humanas (Beriglobin-P, ZLB Behring GmbH; Marburg, Alemania) con el fin de bloquear receptores Fc, a una concentración de 1µg /1x10<sup>6</sup> células durante 15 min a 4°C. Transcurrido ese tiempo se adicionó 2ml de solución de lavado (PBS más 2% de SFB), se centrifugó y se decantó. El botón de células se resuspendió en el volumen necesario para distribuir las células en tubos para citometría de 5ml en una proporción de 1x10<sup>6</sup> células por tubo, en el caso de las células NKT. Una vez distribuidas las células, se adicionaron los anticuerpos para tinción de superficie, y se incubaron por 25 minutos a 4°C. A continuación se añadió solución de lavado y se centrifugó durante 5 min a 1500rpm a 4°C. Posteriormente se incubó con solución permeabilizadora Perm2 1x (BD biosciences) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo mencionado, se procedió a lavar del modo antes descrito. Se agregaron anticuerpos para tinción intracelular y se incubaron por 25 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar la tinción se fijaron las células con solución fijadora (PBS/Paraformaldehído (PFA) 2%) 100µl/tubo y se almacenaron a 4°C hasta su lectura en el citómetro 24hrs después. Se adquirieron de 5x10<sup>5</sup> a 1x10<sup>6</sup> de eventos para analizar las poblaciones de interés, en un Citómetro de Flujo CyAn ADP (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA).

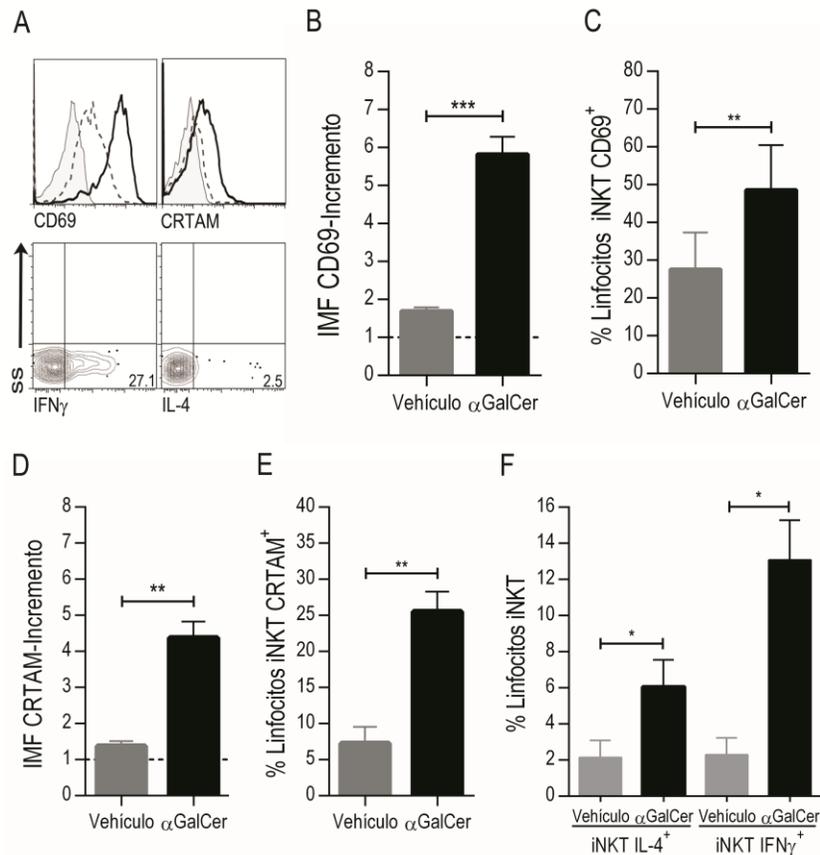
- h) *Análisis de datos*: Los datos fueron analizados en el software FlowJo v.7.6.5. (Tree Star, Inc. Ashland, OR, EUA). Los linfocitos fueron seleccionados de acuerdo a sus propiedades de dispersión de la luz (SSC/FSC). El porcentaje de linfocitos iNKT fue calculado a partir de la región que determinaba la triple expresión de CD3<sup>+</sup>Vα24<sup>+</sup>Vβ11<sup>+</sup>.
- i) *Análisis estadístico*: Se realizó el análisis estadístico en el programa GraphPad Prism v.5 empleando las siguientes prueba estadísticas: Anova de una vía con comparación múltiple de Tukey o Dunn (según el caso) para comparar la expresión en Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de moléculas de activación y el porcentaje de células productoras de citocinas en los experimentos de co-cultivo y bloqueo. Prueba de Wilcoxon de dos vías para muestras pareadas, para comparar las muestras con y sin estímulo de los pacientes con DT1 y controles respectivamente. Finalmente se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney para muestras no pareadas con el fin de comparar los datos de los pacientes con DT1 contra los controles. En todas las pruebas empleadas se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ .

## 7. Resultados

### 7.1 Identificar la expresión de CRTAM en linfocitos iNKT de sangre periférica de individuos sanos bajo condiciones de estimulación antígeno-específica.

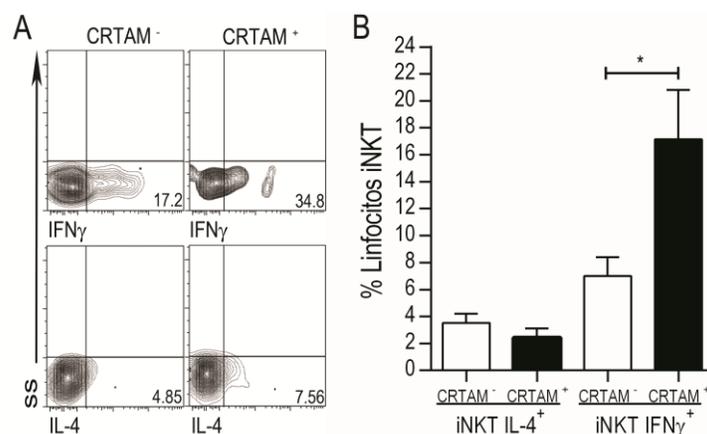
Se ha demostrado que estímulos policlonales (Ionomicina/PMA) son capaces de inducir la expresión de CRTAM en la superficie de los linfocitos iNKT [29, 30], sin embargo se desconoce si estímulos antígeno-específicos son capaces de promover el mismo efecto. Ensayos previos empleando distintas células presentadoras de antígeno (linfocitos B, macrófagos y células dendríticas) mostraron que las DCs fueron las únicas capaces de inducir una clara expresión de CRTAM en las células iNKT [62]. Con el fin de evaluar con más detalle este proceso, se obtuvieron PBMCs de individuos sanos y fueron co-cultivadas con DCs provenientes del mismo individuo (autólogas) pulsadas con  $\alpha$ GalCer durante 18hrs (tres experimentos con duplicado por experimento). En primera instancia se confirmó que dicho estímulo es capaz de inducir la activación de los linfocitos iNKT, evaluado por la expresión de la molécula CD69, (figura 1A), la cual encontramos expresada en más del 20% de las células sin estimular y en el 48.5% al ser activados. En estas células se observó un incremento de 5.8 veces de la IMF (figura 1B y 1C) ( $p=0.0005$  y  $p=0.008$  respectivamente). Además, confirmamos que CRTAM no se expresa en las células sin estimular y que ésta se induce en un 25.5% de las células iNKT con un incremento en la IMF de 4.4 veces el isotipo (figura 1D y 1E) ( $p=0.002$  y  $p=0.004$  respectivamente).

Con el fin de evaluar la capacidad de las células iNKT de producir citocinas tras el estímulo específico  $\alpha$ GalCer (figura 1A). Este resultado mostró un incremento en el porcentaje de células productoras tanto de IL-4 como de IFN $\gamma$  en promedio de un 2% a un 6% y de un 2.3 a un 13% respectivamente, siendo estadísticamente significativo el incremento en las células que recibieron el estímulo con  $\alpha$ GalCer comparadas con el vehículo figura 1 ( $p=0.03$  tanto para IL-4 como para IFN $\gamma$ ).



**Figura 1. Expresión de CRTAM en linfocitos iNKT en respuesta a estímulo antigénico específico.** A) Células iNKT (CD3<sup>+</sup>V $\alpha$ 24<sup>+</sup>V $\beta$ 11<sup>+</sup>) estimuladas durante 18hr. con DCs pulsadas con 100ng de  $\alpha$ GalCer. Histogramas y gráficas de contorno representativas de la expresión de CD69, CRTAM, IFN $\gamma$  e IL-4. El histograma vacío de línea continua gruesa corresponde a la tinción con los anticuerpos específicos (CD69 y CRTAM) en las células estimuladas; la línea discontinua a las células sin estímulo y el histograma sombreado en gris al control de isotipo respectivo. El número en los cuadrantes indica las frecuencias de las células respectivamente B) Expresión de CD69 por veces de incremento en la IMF o C) porcentaje de células positivas, en las condiciones indicadas (vehículo o  $\alpha$ GalCer). D) Expresión de CRTAM por veces de incremento en la IMF o E) porcentaje de células positivas, en las condiciones indicadas (vehículo o  $\alpha$ GalCer). F) Porcentaje de linfocitos iNKT positivos para IL-4 o IFN $\gamma$  en las condiciones indicadas (vehículo o  $\alpha$ GalCer). Prueba de Wilcoxon de dos vías para muestras pareadas, \* p<0.05, \*\* p<0.005 y \*\*\* p<0.0005.

Estudios en modelo murino demostraron que la expresión de CRTAM se asocia con la producción de citocinas de tipo Th1 ( $\text{IFN}\gamma$ , IL-17, IL-22) por células T  $\text{CD4}^+$ , mientras que las citocinas tipo Th2 (IL-4) no se ven afectadas [37]. Por lo que, una vez confirmado que el estímulo de iNKT por DCs cargadas con  $\alpha\text{GalCer}$  es capaz de inducir la expresión de CRTAM en individuos sanos, decidimos analizar si es que existía alguna diferencia en el porcentaje de células iNKT productoras de citocinas entre las células que expresaban o no la molécula. A este respecto observamos que la expresión de CRTAM identificó, de forma significativa, a aquellas células que producían  $\text{IFN}\gamma$  comparada con las que no la expresaban ( $p=0.03$  figura 2). Mientras que, en lo que respecta al porcentaje de linfocitos iNKT que producían IL-4, no observamos diferencia alguna en relación a la expresión de CRTAM ( $p=0.44$ , figura 2).



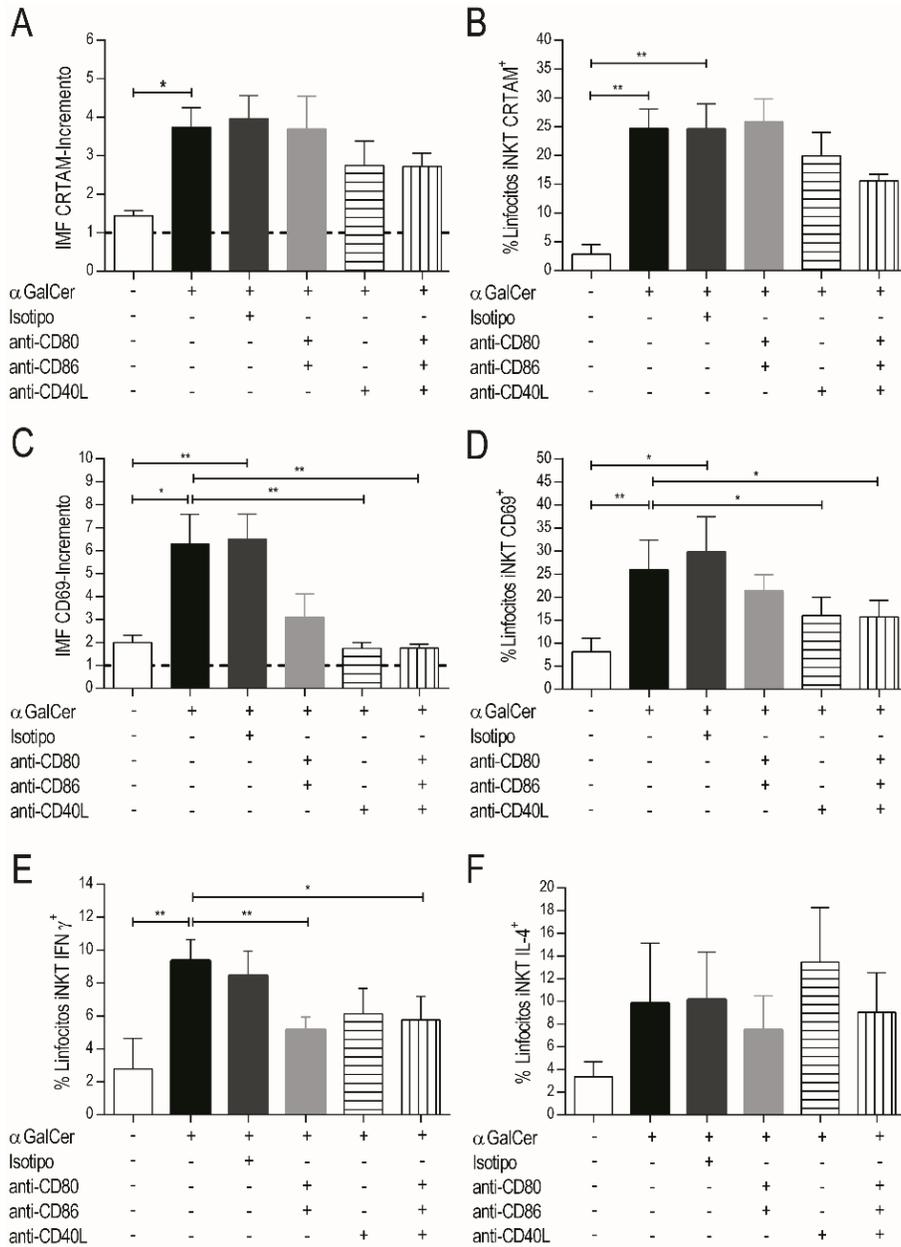
**Figura 2. La expresión de CRTAM identifica a los linfocitos iNKT productores de  $\text{IFN}\gamma$  en individuos sanos.** A) Células iNKT CRTAM<sup>+</sup> y CRTAM<sup>-</sup> productoras de  $\text{IFN}\gamma$  e IL-4. Gráficas de contorno representativas, el número en los cuadrantes indica las frecuencias de las células respectivamente. B) Porcentaje de linfocitos iNKT productores de IL-4 o  $\text{IFN}\gamma$  en base a la expresión de CRTAM. Se muestra el promedio de tres experimentos con dos datos por experimento. Prueba de Wilcoxon de dos vías para muestras pareadas, \*  $p<0.05$ .

## **7.2 Determinar la participación de moléculas de co-estimulación en la expresión de CRTAM en linfocitos iNKT de individuos sanos.**

Previamente, en ensayos iniciales, observamos que las DCs maduras pulsadas con  $\alpha$ GalCer eran capaces de inducir una expresión franca de CRTAM en células iNKT comparadas con otras CPA (linfocitos B y macrófagos) [62]. Está reportado que las células DCs maduras, a diferencia de otras CPA, expresan en mayor densidad moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 y CD40 [63]; lo que nos llevó a investigar si estas moléculas estaban participando en inducir la expresión de CRTAM en los linfocitos iNKT. Para ello empleamos, durante el co-cultivo, anticuerpos bloqueadores dirigidos contra dichas moléculas de co-estimulación y evaluamos el efecto que esto tenía sobre la expresión de CRTAM y la generación de células productoras de citocinas ( $\text{IFN}\gamma$  e IL-4), analizando como control de activación a CD69. Como resultado de estos experimentos pudimos observar que la expresión de CRTAM en linfocitos iNKT, evaluada por veces de incremento en la IMF o por células positivas para la molécula no se modifica de forma importante al bloquear las moléculas de co-estimulación ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, se puede observar una tendencia a la disminución cuando se emplea el anticuerpo contra CD40L o los tres anticuerpos (anti CD80, anti CD86, anti CD40L) de forma simultánea (Figura 3A y 3B).

En cuanto a la expresión de CD69, detectamos una disminución significativa al bloquear CD40L y CD80, CD86 y CD40L de forma paralela, cuantificada tanto por veces de incremento de la IMF ( $p = 0.008$  en ambas condiciones) como en porcentaje de células que expresan la molécula ( $p = 0.05$  y  $p = 0.03$  respectivamente) (Figura 3C y 3D).

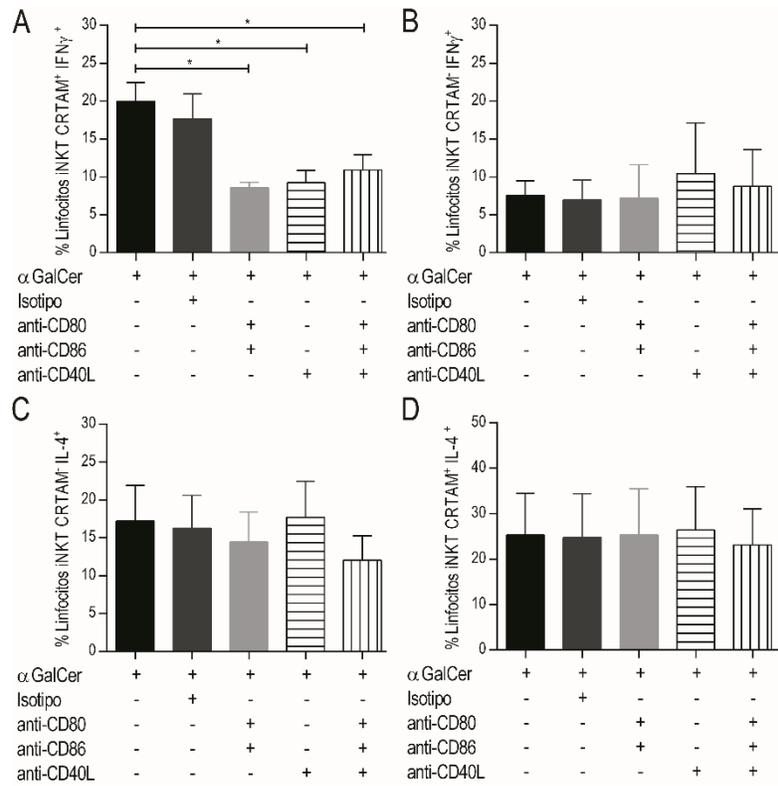
Al evaluar el efecto que tuvo el bloqueo del co-estímulo en la generación de células que producen citocinas observamos que el porcentaje de células positivas para  $\text{IFN}\gamma$  se ve disminuido de forma significativa al bloquear las moléculas CD80 y CD86 y al bloquear las tres moléculas de co-estimulación al mismo tiempo (CD80, CD86 y CD40L) ( $p = 0.004$  y  $p = 0.02$  respectivamente). En lo que al porcentaje de las células productoras de IL-4 respecta, no observamos diferencia alguna en las condiciones de bloqueo evaluadas ( $p > 0.05$ ) (Figura 3D y 3E).



**Figura 3. La expresión de CRTAM es independiente de las moléculas de co-estimulación.** A) Expresión de CRTAM por veces de incremento en la IMF o B) porcentaje de células iNKT positivas posterior a 18hrs de estímulo con DCs pulsadas con  $\alpha$ GalCer y bajo diferentes condiciones empleando anticuerpos dirigidos contra moléculas de co-estimulación. C) Expresión de CD69 por veces de incremento en la IMF o D) porcentaje de células iNKT positivas posterior a 18hrs de estímulo con  $\alpha$ GalCer y bajo las mismas condiciones de bloqueo de moléculas de co-estimulación. E) Porcentaje de linfocitos positivos para IFN $\gamma$  o F) IL-4 en las distintas condiciones experimentales. Anova de una vía con comparación múltiple de Tukey. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  y \*\*\*  $p < 0.0005$ .

### **7.3 Evaluar la participación de CRTAM en la producción de citocinas (IFN $\gamma$ e IL-4) por linfocitos NKT de individuos sanos.**

No obstante que, al bloquear las moléculas de co-estimulación, el efecto observado sobre la expresión de CRTAM fue una sutil disminución, la consecuencia sobre la frecuencia de células iNKT totales productoras de IFN $\gamma$  fue más evidente. Lo anterior, aunado a que inicialmente demostramos que la expresión de esta molécula se asocia a aquellas células que producen IFN $\gamma$ , nos llevó a evaluar si el bloqueo del co-estímulo repercutía sobre el porcentaje de linfocitos iNKT que expresan CRTAM y producen citocinas (IFN $\gamma$  e IL-4). Nuestros resultados muestran una disminución significativa en la frecuencia de células iNKT CRTAM<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> en las tres condiciones de bloqueo evaluadas (CD80/86, CD40L, CD80/86/40L con p=0.04, 0.05 y 0.04 respectivamente) (figura 4A). No se observaron cambios en los porcentajes de las células positivas para IFN $\gamma$  que no expresaban la molécula CRTAM (figura 4B). En lo que a IL-4 respecta, la frecuencia de las células productoras de ésta citocina no se vio modificada al emplear los anticuerpos de bloqueo, tal como lo observamos en las células totales, independientemente de la expresión de CRTAM (figura 4C y 4D).



**Figura 4. La expresión de CRTAM no es suficiente para generar células productoras de IFN $\gamma$  en ausencia de co-estímulo.** A) Porcentaje de células iNKT CRTAM<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> o B) CRTAM<sup>-</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> ante condiciones de bloqueo de moléculas. C) Frecuencia de linfocitos iNKT CRTAM<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup> y D) iNKT CRTAM<sup>-</sup> IL-4<sup>+</sup> bajo las diferentes condiciones de bloqueo de co-estímulo. Anova de una vía con comparación múltiple de Tukey. \* p<0.05, \*\* p<0.005 y \*\*\* p<0.0005.

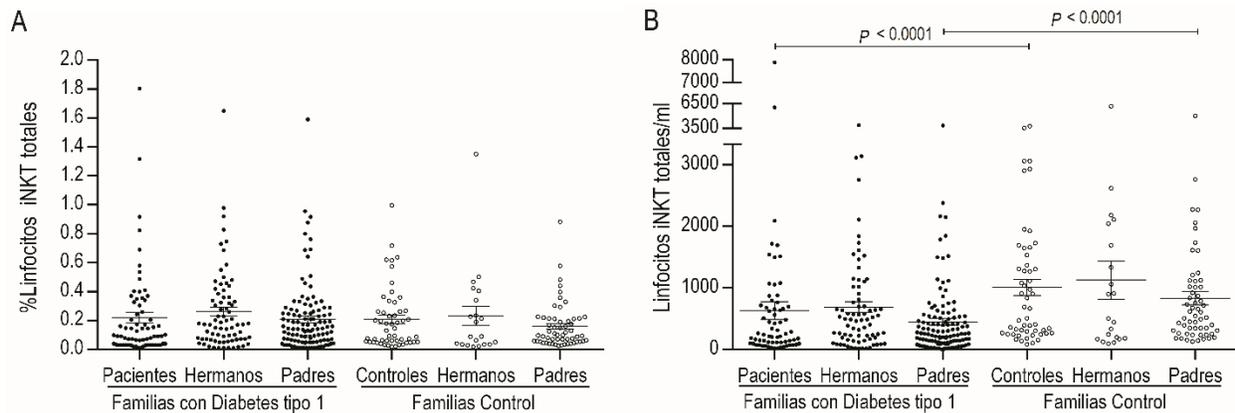
#### **7.4 Evaluar la expresión *ex vivo* de CRTAM en linfocitos iNKT en una cohorte de pacientes con diabetes tipo 1 y sus familiares de primer grado.**

CRTAM es una molécula que se asocia a activación en linfocitos iNKT y ya que demostramos que, al igual que en ratón, se asocia a la producción de IFN $\gamma$  en individuos sanos ante un estímulo-antígeno específico, se confirma como una molécula ligada a un perfil pro-inflamatorio (Th1). Debido a lo anterior, CRTAM es una molécula que podría estar participando en la patogénesis de enfermedades con dicho perfil. Por otra parte, datos iniciales obtenidos por este grupo de trabajo mostraron alteraciones en el número de linfocitos iNKT en sangre periférica de pacientes con DT1 y sus familiares de primer grado comparado con un grupo control, además de que se identificó la presencia de dos poblaciones de iNKT que presentaban diferente expresión del iTCR, dividiéndolas así en iNKT<sup>hi</sup> e iNKT<sup>lo</sup> [59], identificándose en ésta última la expresión *ex vivo* de CRTAM [62]. Con base en estos antecedentes nos dimos a la tarea de completar el análisis de la frecuencia y el perfil de activación de los linfocitos iNKT (tanto iNKT<sup>hi</sup> como iNKT<sup>lo</sup>) en el total de individuos que conforman la cohorte de pacientes con DT1 y familiares de primer grado, así como en familias control. Los resultados de este objetivo se desglosan a continuación

##### **7.4.1 Disminución en los números de linfocitos iNKT en familias con DT1.**

Evaluamos la frecuencia de células iNKT no sólo en pacientes con DT1 sino también en sus familiares de primer grado, comparándola con las encontradas en familias control. Se logró completar una cohorte de 391 sujetos, por lo que se colectaron muestras de sangre periférica de 69 pacientes con reciente diagnóstico de DT1, 76 hermanos y 116 padres (madres y padres), de igual forma se obtuvieron muestras de 53 controles sanos de edades similares a la de los pacientes, 20 hermanos y 57 padres. Los detalles de la selección de los pacientes, así como la estrategia para identificar y calcular el porcentaje de células iNKT (CD3<sup>+</sup>V $\alpha$ 24<sup>+</sup>V $\beta$ 11<sup>+</sup>) se describen en la sección de “Metodología”. En cuanto a porcentajes, nosotros no encontramos diferencias entre los grupos analizados (figura 5A). Sin embargo, referente a los números absolutos de linfocitos iNKT, pudimos observar una evidente reducción en las familias con DT1, siendo significativo ( $p < 0.0001$ ) en los

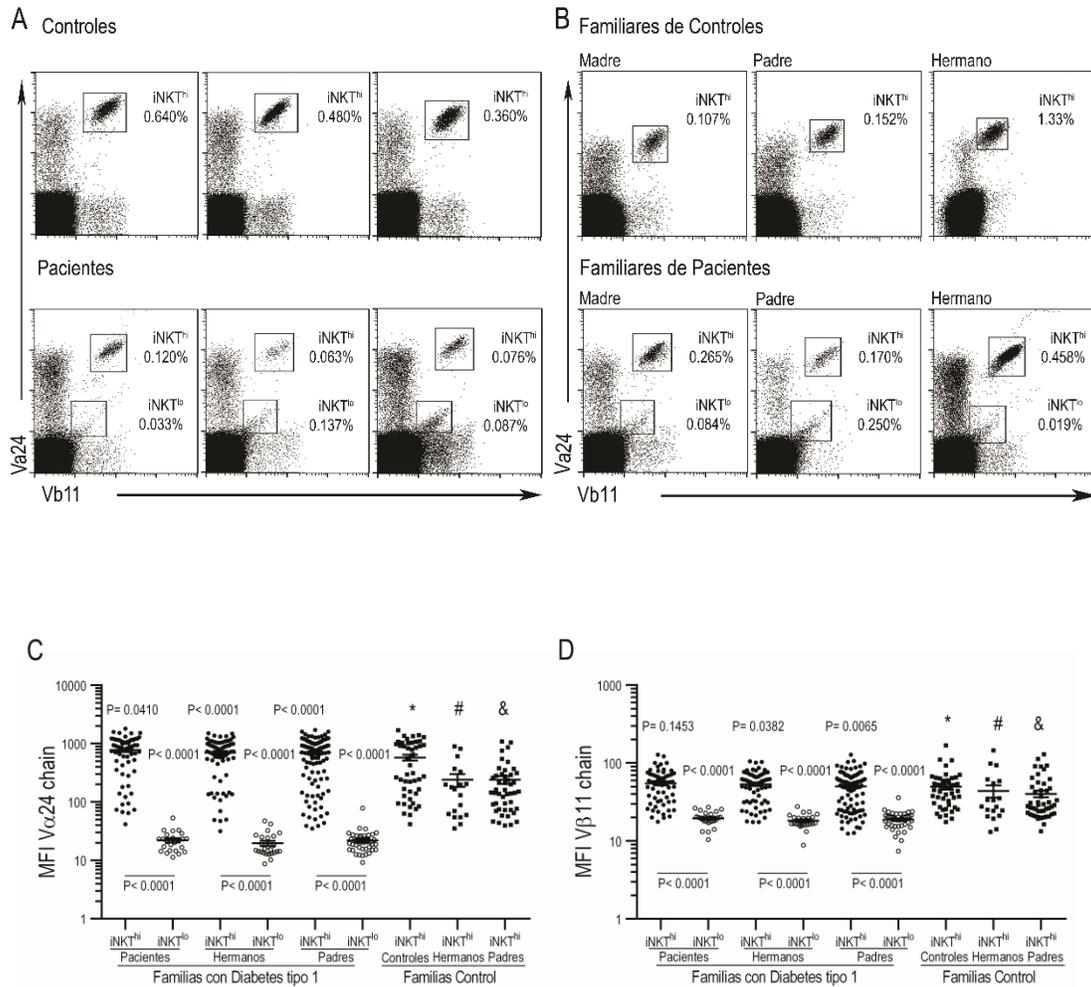
pacientes (633.6/ml±146.3) al compararlos con los controles (1010.5/ml±132.9). Diferencias similares se identificaron entre los padres de los pacientes (450.2/ml±53.2) comparados con el grupo de padres de controles (833.2/ml±111.4;  $p < 0.0001$ ) (figura 5B). No obstante que los resultados obtenidos de los hermanos de los pacientes (686.8/ml ±89.7) muestran una tendencia similar al compararlos con los hermanos de los controles (1129/ml ±311.1), el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas ( $p = 0.24$ ). Estos resultados revelan el impacto de la carga genética sobre los números de iNKT y sugiere una probable participación de estas células en DT1.



**Figura 5. Deficiencia familiar del número absoluto de linfocitos iNKT en diabetes tipo 1.** A) Porcentaje y B) Número absoluto de células iNKT en pacientes con DT1 y sus familiares de primer grado (círculos negros); y familias control (círculos blancos). Prueba U de Mann Whitney. Líneas horizontales muestran el promedio y error estándar.

#### **7.4.2 Pacientes con diabetes tipo 1 presentan dos subpoblaciones de linfocitos iNKT.**

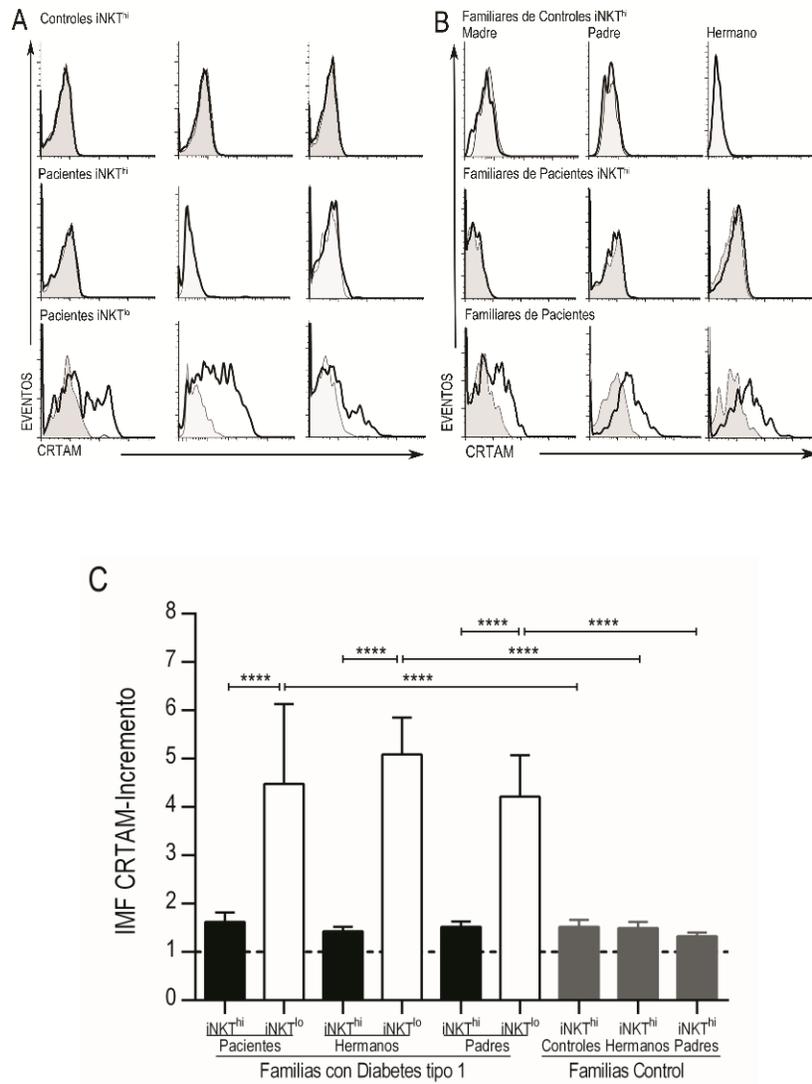
Durante el análisis de la frecuencia de células iNKT en la cohorte de DT1 se identificó inicialmente por Canché-Pool E., la presencia de dos subpoblaciones de linfocitos iNKT de acuerdo a la expresión del iTCR. Una población con una alta expresión de las cadenas V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11 (iTCR) (iNKT<sup>hi</sup>) y otra que expresaba bajos niveles del iTCR (iNKT<sup>lo</sup>). Al completar el análisis de la cohorte se observó que la población iNKT<sup>hi</sup> estuvo presente en todas las muestras analizadas, mientras que la subpoblación iNKT<sup>lo</sup> únicamente fue identificada en 24 de 69 pacientes (34.7%) (figura 6A), 26 de 76 hermanos de pacientes (34.2%) y 39 de 116 padres de pacientes (33.6%) (figura 6B y tabla). La expresión del iTCR con base a la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) tanto de la cadena V $\alpha$ 24 como de la cadena V $\beta$ 11 mostró diferencias significativas entre las poblaciones iNKT<sup>hi</sup> e iNKT<sup>lo</sup>. La figura 6C muestra un incremento promedio en la IMF de 1 logaritmo para la cadena V $\alpha$ 24 en las células iNKT<sup>hi</sup>, comparado con la población de células iNKT<sup>lo</sup> (IMF promedio de 538 $\pm$ 53.5 contra 21.4 $\pm$ 1.86 respectivamente). En el caso de la figura 6D exhibe las diferencias encontradas en los niveles de expresión para la cadena V $\beta$ 11 que en este caso fue de 2.5 veces la IMF de la subpoblación iNKT<sup>hi</sup> comparada con la subpoblación iNKT<sup>lo</sup> (IMF promedio de 48.7 $\pm$ 4 contra 18.9 $\pm$ 0.8 respectivamente). También fue posible detectar ligeras diferencias al comparar las cadenas del iTCR de las poblaciones iNKT<sup>hi</sup> de los grupos analizados, encontrando una mayor expresión, principalmente para la cadena V $\alpha$ 24 y menos evidente para la V $\beta$ 11. Los resultados muestran las siguientes diferencias en las IMF de esa población entre los grupos comparados; en pacientes contra controles 777.2 $\pm$ 59.3 vs 578.8  $\pm$ 69.8 (p=0.041) para la cadena V $\alpha$ 24 y 54.9  $\pm$ 3.3 vs 49.7 $\pm$ 4 para V $\beta$ 11, hermanos de pacientes contra hermanos de controles 696.7 $\pm$ 52.3 vs 239.7 $\pm$ 59.5 (p<0.0001) V $\alpha$ 24 y 53.4  $\pm$ 2.8 vs 43.9 $\pm$ 8 (p=0.0382) V $\beta$ 11, padres de pacientes contra padres de controles 695.5 $\pm$ 44 vs 240.1 $\pm$ 36.4 (V $\alpha$ 24 p<0.0001) y 50.2 $\pm$ 2.4 vs 40.2 $\pm$ 4 (V $\beta$ 11 p=0.065). La frecuencia de la subpoblación iNKT<sup>lo</sup> tanto en los grupos control como en el resto de los pacientes con DT1 y sus familias, de estar presente, fue demasiado baja para ser distinguida del fondo de la tinción con total certeza.



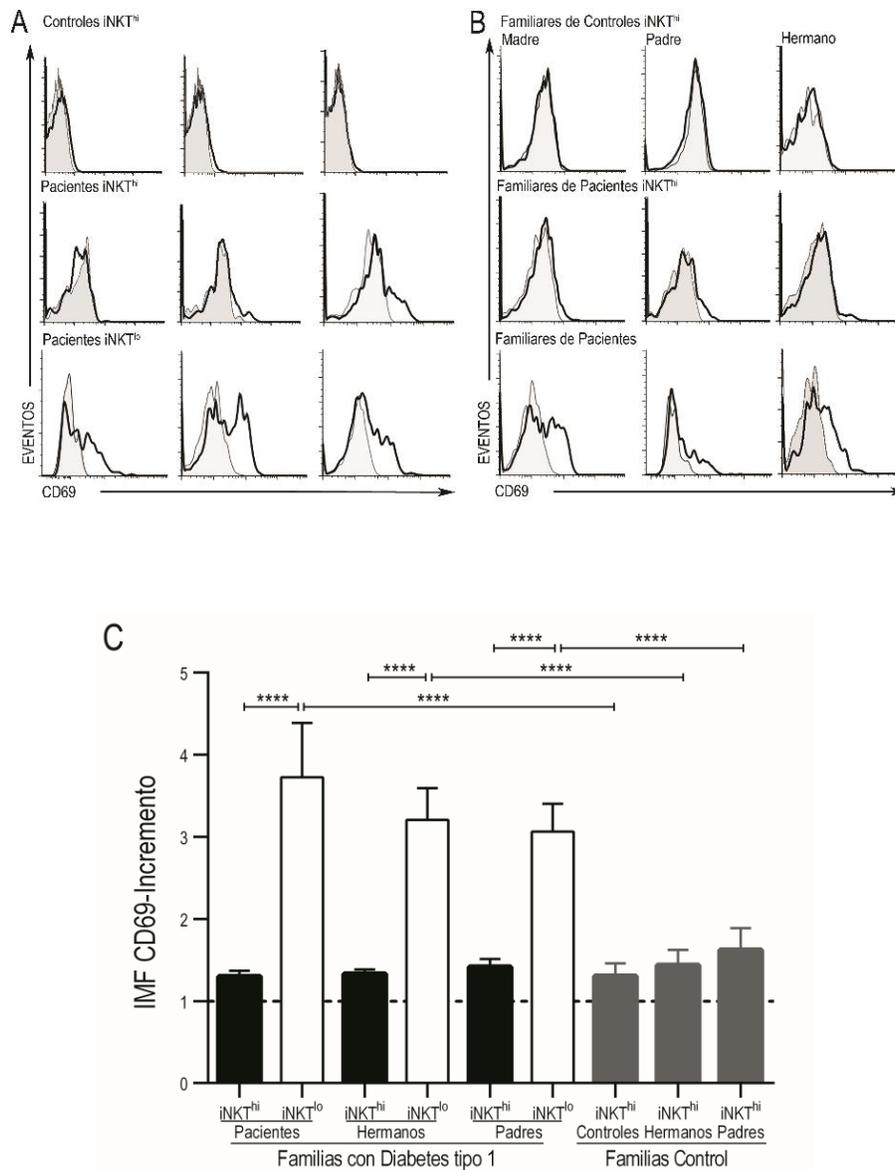
**Figura 6. Presencia de linfocitos iNKT con baja expresión del iTCR en pacientes con DT1 y sus familiares de primer grado.** A) Gráficas de puntos que muestran la expresión del iTCR ( $V\alpha 24+V\beta 11^+$ ) en células  $CD3^+$  de tres controles sanos y tres pacientes con DT1 o B) sus familiares de primer grado. C) IMF de las cadenas V alfa 24 y D) V beta 11 del iTCR de las poblaciones de linfocitos iNKT de familias de pacientes con DT1 y controles. Prueba U de Mann Whitney. \* Células  $iNKT^{hi}$  de controles comparados con pacientes, # células  $iNKT^{hi}$  de hermanos de controles comparados con hermanos de pacientes, & células  $iNKT^{hi}$  de padres de controles comparados con padres de pacientes.

### **7.4.3 Los linfocitos iNKT<sup>lo</sup> son una subpoblación activada.**

Ya que la subpoblación de linfocitos iNKT<sup>lo</sup> nos recordó a una población activada que ha desregulado la expresión del iTCR, era probablemente que estuvieran expresando, de forma incrementada, moléculas asociadas a este estado de activación. Está reportado que las células iNKT expresan, de forma constitutiva en baja densidad, moléculas como CD69, CD25 y CD44 [4, 6], sin embargo esta expresión se incrementa tras la activación. CRTAM es una molécula que se expresa en linfocitos únicamente al recibir un estímulo que induzca su activación. Debido a esto que decidimos analizar la expresión tanto de CRTAM como de CD69 como marcador conocido de activación. Las primeras observaciones a este respecto mostraron únicamente la expresión de CRTAM y no de CD69, sólo en la población iNKT<sup>lo</sup> [62]. Los resultados finales muestran que la subpoblación de células iNKT<sup>lo</sup> expresa ambas moléculas evaluadas en el 62.5% de los pacientes, el 73% de los hermanos de los pacientes y en el 69.2% de los padres de los pacientes que presentan esta subpoblación (Figura 7A y 7B para CRTAM y 8A y 8B para CD69). Al analizar las diferencias en la IMF de estas moléculas en las diferentes poblaciones, observamos un incremento de 4 a 5 veces la IMF de la expresión de CRTAM en las células iNKT<sup>lo</sup> comparado con la población iNKT<sup>hi</sup> (figura 7C). En lo referente a CD69 el incremento observado fue de 3 a 4 veces la IMF en los linfocitos iNKT<sup>lo</sup> comparados con los iNKT<sup>hi</sup> (figura 8C). En la subpoblación de linfocitos iNKT<sup>hi</sup> se observó una expresión basal de CRTAM similar a la de CD69 la cual concuerda con la reportada para otros marcadores de activación en estas células. Estos resultados confirman el estado de activación de la subpoblación iNKT<sup>lo</sup>, tanto en pacientes como en sus familiares de primer grado sugiriendo fuertemente que se trata de una población recientemente activada que ha des-regulado la expresión del iTCR.



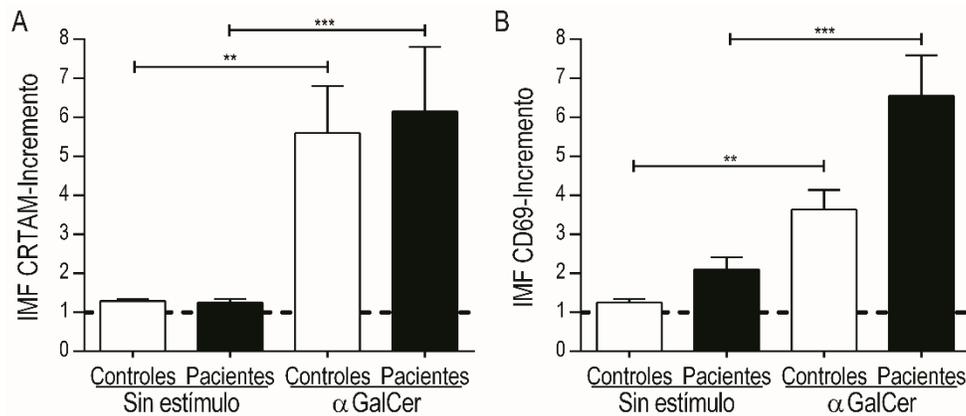
**Figura 7. Los linfocitos iNKT<sup>lo</sup> expresan CRTAM.** A) Expresión de CRTAM en células iNKT<sup>hi</sup> y iNKT<sup>lo</sup> de tres pacientes y controles o B) familiares de primer grado. Los histogramas representativos que se muestran corresponden a los mismos individuos que se muestran en la figura 6A y 6B. Los histogramas en gris muestran la tinción del control de isotipo para los anticuerpos monoclonales. C) Expresión de CRTAM en poblaciones iNKT<sup>hi</sup> e iNKT<sup>lo</sup> de los grupos analizados, calculada por veces de incremento. El valor del control de isotipo normalizado a un valor de 1, se muestra con una línea horizontal discontinua. Prueba U de Mann Whitney. \*\*\* p<0.0005. Líneas barras muestran el promedio y error standard.



**Figura 8. Los linfocitos iNKT<sup>lo</sup> expresan CD69.** A) Expresión de CD69 en células iNKT<sup>hi</sup> y iNKT<sup>lo</sup> de tres pacientes y controles o B) familiares de primer grado. Los histogramas representativos que se muestran corresponden a los mismos individuos que se muestran en la figura 6A y 6B. Los histogramas en gris muestran la tinción del control de isotipo para los anticuerpos monoclonales. C) Expresión de CD69 en poblaciones iNKT<sup>hi</sup> e iNKT<sup>lo</sup> de los grupos analizados, calculada por veces de incremento. El valor del control de isotipo normalizado a un valor de 1, se muestra con una línea horizontal discontinua. Prueba U de Mann Whitney. \*\*\* p<0.0005. Líneas barras muestran el promedio y error standard.

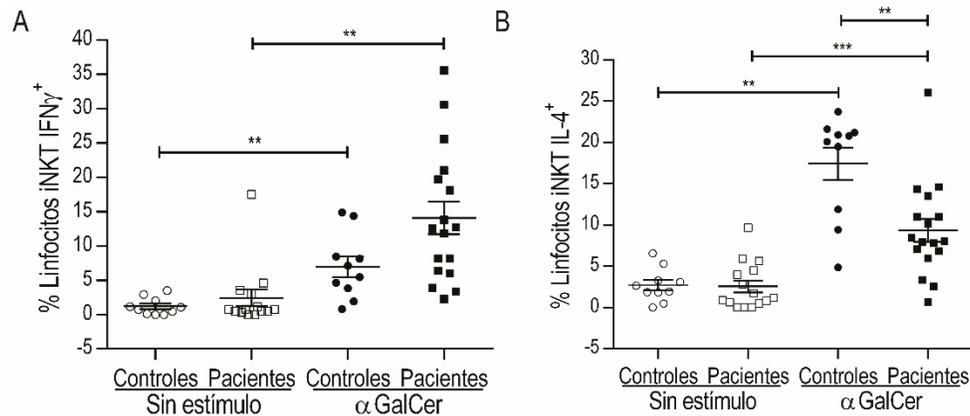
### **7.5 Determinar la expresión de CRTAM en linfocitos iNKT de sangre periférica de pacientes con DT1, tras un estímulo antígeno-específico.**

La presencia de una sub-población de linfocitos iNKT con una baja expresión del iTCR y la co-expresión de CRTAM en dicha sub-población en un porcentaje de pacientes con DT1 y sus familiares de primer grado, sugieren una probable participación de éstas células en la patogénesis de la enfermedad. Por lo anterior, decidimos evaluar *in vitro*, la respuesta de los linfocitos iNKT provenientes de pacientes con DT1, ante un estímulo antígeno específico ( $\alpha$ GalCer) y compararlo con controles sanos. Dicha respuesta fue evaluada mediante la expresión de CRTAM y CD69 (como control de activación) y la función efectora a través de la tinción intracelular de citocinas. Los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de CRTAM, mostraron que tanto en células iNKT de pacientes como de controles la molécula se induce en la misma magnitud tras las 18hrs de estímulo, 6.1 veces de incremento en la IMF de la condición sin estímulo para el caso de los pacientes y 5.5 para los controles ( $p=0.0001$  para los pacientes y  $p=0.006$  para los controles) (Figura 9A). Al evaluar CD69 observamos que, al igual que CRTAM, las células de ambos grupos indujeron la expresión de ésta molécula 6.5 ( $p=0.0001$ ) para el caso de los pacientes contra 3.6 ( $p=0.002$ ) veces de incremento de la IMF en los controles, comparada con la condición sin estímulo; sin embargo, a pesar de que en los pacientes se observó una tendencia a una mayor expresión comparada con los controles después de recibir el estímulo ésta no fue estadísticamente significativa ( $p=0.088$ ) (Figura 9B).



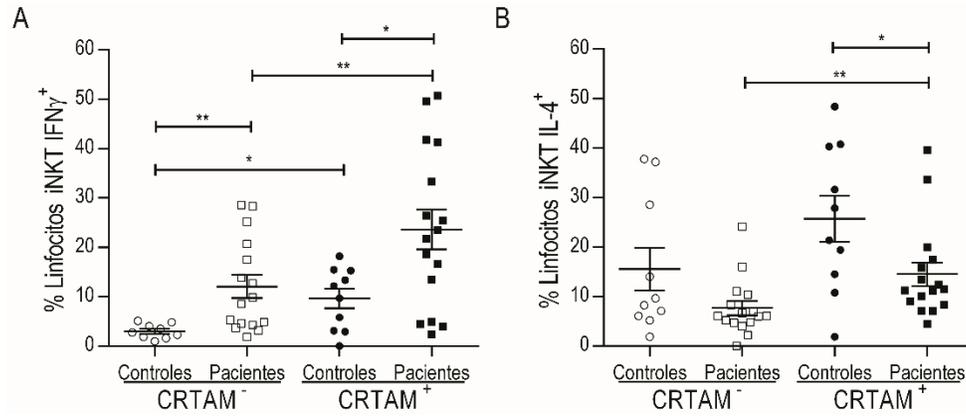
**Figura 9. El estímulo con  $\alpha$ GalCer induce la expresión de CRTAM y CD69 en pacientes con diabetes tipo 1.** A) Expresión de CRTAM y B) CD69 en pacientes con DT1 y controles sanos posterior al estímulo con  $\alpha$ GalCer por 18hrs. Se muestra la IMF calculada por veces de incremento. El valor del control de isotipo normalizado a un valor de 1, se muestra con una línea horizontal discontinua. Prueba de Wilcoxon de dos vías para muestras pareadas, \*\*  $p < 0.005$  y \*\*\*  $p < 0.0005$ .

En lo referente a las células productoras de citocinas, los resultados observados semejan mucho a lo ya reportado para esta patología. Se observó un mayor porcentaje de linfocitos iNKT totales productores de  $IFN\gamma$  en los pacientes (14.7%) comparado con los controles (7.1%) posterior al estímulo (Figura 10A), aunque dicha diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa ( $p=0.06$ ). Al evaluar a las células iNKT positivas para IL-4 después del estímulo, observamos una frecuencia significativamente menor ( $p=0.006$ ) en los pacientes (9.6%) que en los controles (17.4%) (Figura 10B).



**Figura 10. Linfocitos iNKT de pacientes con diabetes tipo 1 presentan un perfil efector Th1.** A) Porcentaje de linfocitos iNKT  $IFN\gamma^+$  o B) iNKT  $CRTAM^+ IL-4^+$  de pacientes con DT1 y controles sanos sin estímulo y posterior a estímulo con 100ng de  $\alpha GalCer$  durante 18hrs. Prueba de Wilcoxon de dos vías para muestras pareadas y prueba U de Mann Whitney para comparar controles contra pacientes. Líneas horizontales muestran el promedio y error standard. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  y \*\*\*  $p < 0.0005$

Con base a la clara asociación que hemos observado entre la expresión de CRTAM y la presencia de células productoras de  $IFN\gamma$ , nos preguntamos si es que en los pacientes con DT1 sucedía algo similar a lo observado en los experimentos de co-cultivo con células obtenidas de individuos sanos. A pesar de no observar diferencias en la expresión de CRTAM entre pacientes y controles, pero si en la frecuencia de linfocitos iNKT  $IFN\gamma^+$  e  $IL-4^+$ ; evaluamos si es que había alguna diferencia en las células doble positivas, que expresaban tanto CRTAM como  $IFN\gamma$  o  $IL-4$ . Los resultados nos muestran, en el caso de las células iNKT  $IFN\gamma^+$  podemos encontrar un incremento en su frecuencia en los pacientes comparada con los controles, independiente de la expresión de CRTAM ( $p=0.002$  para  $CRTAM^-$  y  $p=0.01$  para  $CRTAM^+$ ). En cuanto a las células iNKT que expresan CRTAM, observamos que identifican con mayor frecuencia y de forma significativa a aquellas productoras de  $IFN\gamma^+$ , tanto para pacientes como para controles ( $p=0.003$  y  $p=0.02$ , respectivamente) (Figura 11A). Al realizar el análisis para las células iNKT que expresaron CRTAM y produjeron  $IL-4$ , aunque observamos una mayor frecuencia de éstas en los pacientes contra las que no la expresan ( $p=0.003$ ), no parece haber diferencias entre los controles, expresen o no la molécula ( $p=0.27$ ) (figura 11B).



**Figura 11. CRTAM identifica a linfocitos iNKT productores de IFN $\gamma$  en pacientes con diabetes tipo 1 y controles sanos.** A) Porcentaje de linfocitos iNKT IFN $\gamma$ <sup>+</sup> o B) iNKT IL-4<sup>+</sup> que expresan o no CRTAM en pacientes con DT1 o controles sanos estimulados 18hrs con  $\alpha$ GalCer. Prueba de Wilcoxon de dos vías para muestras pareadas y prueba U de Mann Whitney para comparar controles contra pacientes. Líneas horizontales muestran el promedio y error estándar. \* p<0.05, \*\* p<0.005 y \*\*\* p<0.0005

## 8. Discusión

CRTAM se describió desde un inicio como uno de los transcritos más abundantes producidos por los linfocitos iNKT y T CD8<sup>+</sup> activados tanto en el ratón como en el humano. Debido a que estas dos poblaciones celulares se encuentran restringidas por MHC-clase I o tipo clase I (CD1d) le valió su nombre como Class I-Restricted T cell Associated Molecule (CRTAM). No obstante, con el paso del tiempo, los trabajos enfocados a estudiar esta molécula han demostrado que su presencia no se circunscribe únicamente a éstos linfocitos sino que se puede encontrar en una amplia gama de células tanto del sistema inmune (NK, T CD4<sup>+</sup>, Neutrófilos, Eosinófilos) como de otros muchos tejidos (cerebelo, testículo, riñón) [30, 32, 33]. Al describir a Necl-2 como su ligando, se logró establecer algunas de las funciones que CRTAM, al interactuar con este, puede estar llevando a cabo [34-36]. Como molécula de adhesión participa en mantener la unión intercelular en tejidos epiteliales, media la agregación celular, estabiliza la unión entre linfocitos T y CPAs durante la fase tardía de la sinapsis inmunológica, favorece la retención de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados en el ganglio linfático y controla la residencia de células T dobles positivas en intestino [31, 37, 64]. De la misma forma, como una molécula asociada a activación, CRTAM participa en funciones efectoras como activar la respuesta citotóxica de NK y CD8<sup>+</sup> contra células tumorales, regular la expresión de IL-22, favorecer la secreción de IFN $\gamma$  por CD8<sup>+</sup>, confiere activación en la fase tardía y regula la generación de células T CD4<sup>+</sup> pro-inflamatorias productoras de IFN $\gamma$ , IL-17 e IL-22 [34, 37, 65]. Todas estas funciones han sido evaluadas en líneas celulares y modelos murinos con estímulos policlonales que, si bien han proporcionado un gran avance en el conocimiento de la biología de ésta molécula, pueden no ser completamente extrapolables a lo que podría estar sucediendo en el ser humano. Debido a esto, este trabajo se enfocó a evaluar, en una población no convencional de linfocitos, pero en la primera en ser descrita esta molécula, las NKT; si un estímulo antígeno específico era capaz de inducir la expresión de CRTAM y si es que esto dependía de la presencia de otras moléculas de co-estimulación, además de cómo podría estar asociada esta expresión al perfil efector de dichas células en individuos sanos.

Los resultados a este respecto, nos confirman las primeras observaciones realizadas por Canché-Pool, que los linfocitos iNKT en co-cultivo con DC cargadas con  $\alpha$ GalCer, son capaces de expresar CRTAM en comparación con las células no estimuladas, de forma similar a lo reportado en estas células en los primeros trabajos, al emplear estímulos policlonales (Ionomicina /PMA) [29, 30]. También confirmamos que la expresión de CRTAM va acompañada de CD69 y de la generación de células productoras de citocinas (IFN $\gamma$  e IL-4), lo cual es sinónimo de un perfil efector. Al analizar si la expresión de CRTAM correlacionaba con la producción de una u otra citocina, pudimos observar, tal como lo reportó Yeh et. al. en el 2008 [37] para los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratón, que ésta molécula se asocia de manera preferencial a las células IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, lo que demuestra que en los linfocitos iNKT también se relaciona con un perfil pro-inflamatorio ya que no observamos diferencias al analizar la producción de IL-4 independientemente de la expresión de CRTAM.

La naturaleza de la respuesta, pro- o anti-inflamatoria, promovida o modulada por las células iNKT depende del tipo de citocinas que ellas mismas secreten; las cuales, en su momento, son influenciadas por las propiedades estructurales, concentraciones y distribución de los ligandos glicolipídicos, y de la localización membranal durante su presentación mediada por CD1d; la afinidad de unión del iTCR por esos ligandos, las señales co-estimuladoras o de daño recibidas por los linfocitos iNKT y el microambiente de citocinas así como el sitio anatómico en donde las subpoblaciones de iNKT son activadas [6]. Observaciones iniciales en nuestro grupo de trabajo indicaron que las DCs eran las APCs más eficientes para inducir la expresión de CRTAM en las células iNKT [62], lo que nos sugirió que las moléculas de co-estimulación podrían estar participando en inducir esta expresión. Lo anterior basados en el ejemplo de la molécula OX-40, la cual a pesar de que la señalización vía TCR es suficiente para inducir su expresión, la interacción de CD28-CD80/86 incrementa y sostiene su expresión subsecuente [66]. Sin embargo, durante los experimentos de bloqueo del co-estímulo no observamos cambios significativos en la expresión de CRTAM, lo que nos indica que basta con la primera señal recibida vía iTCR en la iNKT para inducir su expresión. A pesar de que las células iNKT expresan varias moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras de forma compartida con los linfocitos T convencionales, la unión de estas moléculas en ambos tipos celulares puede no arrojar

resultados funcionales similares. El efecto evidente que observamos posterior al bloqueo, fue la reducción importante en la expresión de CD69 y en la generación de las células productoras de IFN $\gamma$ , lo cual está ampliamente reportado en la literatura, ya que el bloquear con anticuerpos o interrumpir genéticamente las vías CD40-CD40L o CD28-CD80/86 inhibe la producción de IFN $\gamma$  pero no de IL-4 en respuesta a  $\alpha$ GalCer [23, 26, 63, 67, 68]. Este resultado nos indica que, además de la relativa independencia del co-estímulo para la expresión de CRTAM, ésta no es suficiente para sopesar el efecto del bloqueo sobre la expresión de IFN $\gamma$  en las células iNKT. Cabe mencionar que, ya que la reducción de las células iNKT CRTAM<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> fue importante a diferencia de las iNKT CRTAM<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup>, este resultado sustenta la hipótesis de que CRTAM podría estar participando en la expresión de IFN $\gamma$  en estas células.

El hecho de que la expresión de CRTAM se asocie con un perfil inflamatorio en células iNKT en individuos sanos, hace prácticamente obligado su análisis en el marco de una patología en donde los linfocitos iNKT y la producción de IFN $\gamma$  participan en el desarrollo de la enfermedad. Además, debido a que la presencia de CRTAM está pobremente estudiada también en el contexto patológico, y dado nuestros primeros resultados en una cohorte de pacientes con DT1; decidimos continuar con la evaluación de estos individuos, incrementando el tamaño de la muestra y analizando tanto la frecuencia de los linfocitos iNKT, la expresión *ex vivo* de CRTAM y en respuesta al estímulo con  $\alpha$ GalCer; así como el perfil efector al que se asocia su expresión.

Los resultados obtenidos de esta parte del trabajo mostraron una reducción en los números absolutos de linfocitos iNKT en los pacientes con DT1 y sus familiares de primer grado comparados con controles sanos y sus respectivos familiares. En cuanto a porcentajes, nuestros datos, fueron similares a aquellos reportados por Lee y cols. quien muestra un amplio rango en la frecuencia de las células iNKT entre los grupos estudiados y ninguna diferencia entre ellos [56]. En el modelo murino, Esteban y cols. identificaron los dos loci principales (*Nkt1* y *Nkt2*) que controlan los números de iNKT en timo, los cuales se localizan en la parte distal de la región *Idd13* del cromosoma 2 y en la región *Bana3* del cromosoma 1, respectivamente. Ambos loci han sido asociados con el desarrollo de DT1 y lupus eritematoso sistémico [69]. Recientemente, fue demostrado que el gene *Nkt1* controla los números de iNKT a través de la expresión diferencial de *Slamf1* [70].

Un hallazgo inesperado durante el análisis de la frecuencia de los linfocitos iNKT, observado desde los primeros sujetos analizados [59], fue la presencia de una población con una baja densidad del iTCR en su superficie. Esta población nos recordó a aquella mostrada por Gadola y cols. [71] posterior a la expansión de células T V $\alpha$ 24/Tetrámero CD1d- $\alpha$ GalCer<sup>+</sup> a partir de PBMCs de donadores sanos. Del mismo modo, Diana y cols. así como Constantínides y cols. muestran una población con las mismas características que la que nosotros observamos [72, 73]. Lucas y cols. [74] igualmente identificó bajos porcentajes de linfocitos iNKT en individuos infectados con VHC que presentaban un fenotipo activado evaluado por la expresión de CD69. Sin embargo, en estos artículos no se discute mucho acerca de ésta población con bajos niveles de iTCR. Nosotros creemos que la población iNKT<sup>lo</sup> podría tratarse de una población recientemente activada, debido a que expresa, no solo CRTAM, sino también CD69. La población iNKT<sup>lo</sup> nos recuerda a aquella reportada en ratón por Wilson y cols. y Harada y cols., la cual ha des-regulado la expresión de su iTCR a través de endocitosis posterior a recibir un estímulo de activación y justo antes de la fase de expansión [75, 76]. Esta clase de regulación ha sido reportada por muchos otros grupos para el caso de las células T convencionales [77-79]. Además, debido a que CRTAM es expresada sólo en linfocitos activados, su presencia *ex vivo* así como la de CD69 en un 62.5% de la población iNKT<sup>lo</sup> en los pacientes con DT1, sustenta nuestra hipótesis de que podría tratarse de una población celular recientemente activada (muy probablemente por auto-antígenos). Lo anterior, aunado al hecho de que observamos altos niveles de iTCR (V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11) entre las células iNKT<sup>hi</sup> de los pacientes con DT1 y sus familias comparados con los encontrados en las familias control, podría ser explicado de acuerdo al reabastecimiento y sobre-regulación del TCR reportada por otros grupos [79, 80]. Schrum y cols. demostraron que durante la activación de las células T CD4<sup>+</sup>, éstas tendían a sobre-regular la expresión del TCR en la superficie celular a pesar de la temprana des-regulación inducida por el antígeno [81]. Ellos describen que el nuevo nivel de expresión del TCR observable en superficie varios días después de la respuesta, incrementaba en proporción a la dosis antigénica, la duración del estímulo y el grado de co-estímulo recibido. Ésta recuperación de la expresión del TCR en la superficie celular se observó hasta dos veces comparada con el original [80].

Vale la pena resaltar que, la edad de los pacientes, los controles y sus respectivos hermanos, limitó la cantidad de la muestra de sangre obtenida. Debido a esto, no fue posible realizar un análisis más profundo en aquellos individuos que presentaban la población iNKT<sup>lo</sup>, sin mencionar la baja frecuencia *per se* de la población celular estudiada. No obstante, la presencia de una sub-población de linfocitos iNKT con una baja expresión del iTCR y la co-expresión de CRTAM en dicha sub-población en un porcentaje de pacientes con DT1 y sus familiares de primer grado, sugieren una probable participación de éstas células en la patogénesis de la enfermedad. Por lo anterior, decidimos evaluar *in vitro*, la respuesta de los linfocitos iNKT de pacientes con DT1 (cuya muestra fue suficiente) ante un estímulo antígeno específico ( $\alpha$ GalCer) y compararlo con controles sanos. Pese a lo reportado inicialmente por Canché-Pool E., quien no observó la expresión de CRTAM en linfocitos iNKT que se encontraban junto con células mononucleares estimuladas con  $\alpha$ GalCer [62]. Nosotros observamos la inducción de esta molécula en linfocitos iNKT estimulados con  $\alpha$ GalCer de hasta 6 veces la IMF comparado con las células sin estímulo, tanto en pacientes con DT1 como en controles sanos. Del mismo modo lo registramos para CD69; sin embargo observamos que, para esta molécula, las células provenientes de los pacientes mostraban una tendencia a presentar mayor expresión que los controles, lo que podría estar reflejando su probable condición autorreactiva [82, 83]. En este mismo sentido, al evaluar el perfil efector de los linfocitos iNKT tras recibir el estímulo con  $\alpha$ GalCer, pudimos observar que mientras para el caso de IFN $\gamma$  los pacientes presentaban una frecuencia incrementada de las células que producían esta citocina comparada con los controles, lo contrario se observó para el caso de las productoras de IL-4, presentando un porcentaje menor que el de los controles. Este sesgo en el perfil de citocinas producido por las células iNKT provenientes de pacientes con DT1 ha sido previamente reportado [55, 84]. Sin embargo cabe resaltar que esos trabajos evalúan las citocinas en sobrenadante producidas por clonas de linfocitos iNKT obtenidas a partir de células de sangre periférica o bien de ganglios linfáticos de los pacientes con DT1, lo cual puede no reflejar claramente la respuesta que estas células presentan *in vivo*. Si bien, nuestros resultados pudieran también tener esta limitante, ya que el estímulo con  $\alpha$ GalCer posiblemente no evoque la misma respuesta que los auto-antígenos, que muy seguramente están siendo reconocidos por las células iNKT *in vivo*, al tratarse de un cultivo primario sin más manipulación que la

necesaria para proveer el estímulo; puede reflejar de forma más cercana la respuesta que estos linfocitos probablemente están teniendo en el organismo.

En lo referente a CRTAM y el perfil efector de las células iNKT en base a la expresión o no de esta molécula, pudimos observar que mientras que para las células iNKT CRTAM<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup> encontramos una ligera tendencia a un mayor porcentaje en los pacientes que en los controles al comparar con iNKT IL-4<sup>+</sup> que no expresaban CRTAM, para el caso de los linfocitos iNKT CRTAM<sup>+</sup> se observó una marcada preferencia a identificar a aquellos linfocitos productores de IFN $\gamma$ <sup>+</sup> tanto para pacientes como para controles, lo cual sustenta los resultados previamente observados en los individuos sanos estimulados en cocultivo con DCs cargadas con  $\alpha$ GalCer, y concuerda con lo reportado para los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratón [37]. No obstante, estos resultados no demuestran que CRTAM esté participando directamente en la producción de IFN $\gamma$ , solamente que identifica a aquellas células que lo producen.

Hasta el momento no se ha descrito la vía de señalización de CRTAM, no obstante Valle-Rios y cols. describió, en linfocitos T CD8<sup>+</sup>, sitios potenciales de unión para el factor NF $\kappa$ B en las regiones no codificantes río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen de CRTAM [85]. Lo anterior sugiere que la posible señalización de CRTAM podría activar esta vía, sin embargo, su funcionalidad no fue ni ha sido evaluada. A este respecto, Yeh y cols. demostró que, el mecanismo por el cual CRTAM modula la producción de citocinas pro-inflamatorias es a través de su porción intracelular, que presenta un dominio PDZ, mediante el cual recluta hacia el polo de la sinapsis inmunológica a la proteína Scribble con la que interactúa y controla la proliferación celular y la producción de citocinas [37]. De tal forma que, CRTAM podría estar asociada a la producción de citocinas de dos formas, 1) a través de la señalización directa río abajo de esta molécula al reclutar Scribble, CDC42, PKC $\zeta$  y de alguna forma, aún no clara, converger con la vía de NF $\kappa$ B para inducir la transcripción de IFN $\gamma$  en los linfocitos iNKT o 2) como molécula de adhesión, la cual estabiliza la unión entre el iTCR y la molécula presentadora de antígeno, mediante el reclutamiento de Scribble, CDC42, PKC $\zeta$ , con el objetivo de mantener la polaridad del complejo CD3-TCR y recibir el co-estímulo necesario por parte de moléculas como CD28, CD40L, ICOS, OX40 cuya señalización se ha demostrado participa directamente en la producción de IFN $\gamma$ .

Los datos obtenidos hasta el momento, si bien sustentan una clara asociación entre las células que expresan CRTAM y las que producen IFN $\gamma$ , tanto en homeostasis como en estado patológico, aún no explican el mecanismo por el cual podría estarlo haciendo. Este trabajo suma una pieza más al rompecabezas de CRTAM, sin embargo hacen falta estudios funcionales y moleculares, en esta y otras poblaciones celulares que expresan la molécula, con el fin de avanzar aún más en el conocimiento de la biología de esta proteína, así como evaluar cuál es su función (si es diferente) en cada una de ellas.

## 9. Conclusiones

- La señalización vía iTCR con un estímulo antígeno específico induce la expresión de CRTAM en linfocitos iNKT de individuos sanos y pacientes con DT1.
- La expresión de CRTAM en células iNKT de sujetos sanos es independiente de co-estímulo.
- La sola expresión de CRTAM no es suficiente para inducir la producción de IFN $\gamma$  en linfocitos iNKT en ausencia de co-estímulo en individuos sanos. Lo que podría indicar que CRTAM no está señalizando o bien que la vía que pueda estar induciendo CRTAM no incide en la transcripción de IFN $\gamma$ .
- Existe una disminución de los números absolutos de células iNKT en pacientes con DT1 y sus familiares de primer grado, lo que sugiere que se trata de un rasgo familiar probablemente determinado por factores genéticos similares a los reportados en ratón. Lo que podría representar uno más de los ya reportados factores de riesgo o susceptibilidad y no una causa directa de la enfermedad.
- El hallazgo de la población de linfocitos iNKT<sup>lo</sup> con un fenotipo activado, tanto en pacientes con DT1 como en sus familiares de primer grado puede indicar la presencia de células iNKT recientemente estimuladas probablemente por auto-antígenos y representar otro factor de riesgo para el desarrollo de la patología.
- Se confirma que los linfocitos iNKT de pacientes con DT1 presentan un perfil efector Th1 productor de IFN $\gamma$ , al recibir un estímulo antígeno específico.
- Demostramos que la expresión de CRTAM identifica a la población de linfocitos iNKT productores de IFN $\gamma$ .

## 10. Perspectivas

- Caracterizar la vía que induce la expresión de CRTAM.
- Demostrar que la expresión de CRTAM participa en la producción de IFN $\gamma$  y otras citocinas pro-inflamatorias (IL-17, IL-22) en linfocitos iNKT y T convencionales.
- Determinar la vía por la cual CRTAM participa en la producción de IFN $\gamma$  y otras citocinas pro-inflamatorias (IL-17, IL-22) en linfocitos iNKT y T convencionales.
- Realizar un estudio prospectivo a los hermanos de los pacientes con DT1 que presentaron la población iNKT<sup>lo</sup> y la expresión de CRTAM, con el fin de confirmar si existe una asociación entre la presencia de esta población y el desarrollo de la enfermedad. Así como evaluar las citocinas que, ex vivo, podrían estar produciendo las células iNKT<sup>lo</sup> de estos individuos.

## 9. Bibliografía

1. Abul K. Abbas AHL, Shiv Pillai. Cellular and Molecular Immunology: Elsevier, 2012.
2. David Male JB, David B. Roth, Ivann Roitt. Immunology: Mosby Elsevier, 2006.
3. Fowlkes BJ, Kruisbeek AM, Ton-That H, Weston MA, Coligan JE, Schwartz RH, Pardoll DM. A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature* 1987; **329**:251-4.
4. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nature reviews Immunology* 2013; **13**:101-17.
5. Hammond KJ, Pelikan SB, Crowe NY, Randle-Barrett E, Nakayama T, Taniguchi M, Smyth MJ, van Driel IR, Scollay R, Baxter AG, Godfrey DI. NKT cells are phenotypically and functionally diverse. *European journal of immunology* 1999; **29**:3768-81.
6. van den Heuvel MJ, Garg N, Van Kaer L, Haeryfar SM. NKT cell costimulation: experimental progress and therapeutic promise. *Trends in molecular medicine* 2011; **17**:65-77.
7. Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *The Journal of experimental medicine* 2002; **195**:625-36.
8. Chan AC, Serwecinska L, Cochrane A, Harrison LC, Godfrey DI, Berzins SP. Immune characterization of an individual with an exceptionally high natural killer T cell frequency and her immediate family. *Clinical and experimental immunology* 2009; **156**:238-45.
9. Mattner J, Debord KL, Ismail N, Goff RD, Cantu C, 3rd, Zhou D, Saint-Mezard P, Wang V, Gao Y, Yin N, Hoebe K, Schneewind O, Walker D, Beutler B, Teyton L, Savage PB, Bendelac A. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 2005; **434**:525-9.
10. Kinjo Y, Illarionov P, Vela JL, Pei B, Girardi E, Li X, Li Y, Imamura M, Kaneko Y, Okawara A, Miyazaki Y, Gomez-Velasco A, Rogers P, Dahesh S, Uchiyama S, Khurana A, Kawahara K, Yesilkaya H, Andrew PW, Wong CH, Kawakami K, Nizet V, Besra GS, Tsuji M, Zajonc DM, Kronenberg M. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nature immunology* 2011; **12**:966-74.
11. Zhou D, Mattner J, Cantu C, 3rd, Schrantz N, Yin N, Gao Y, Sagiv Y, Hudspeth K, Wu YP, Yamashita T, Teneberg S, Wang D, Proia RL, Lavery SB, Savage PB, Teyton L, Bendelac A. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 2004; **306**:1786-9.
12. Brennan PJ, Tatituri RV, Brigl M, Kim EY, Tuli A, Sanderson JP, Gadola SD, Hsu FF, Besra GS, Brenner MB. Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. *Nature immunology* 2011; **12**:1202-11.

13. Pei B, Speak AO, Shepherd D, Butters T, Cerundolo V, Platt FM, Kronenberg M. Diverse endogenous antigens for mouse NKT cells: self-antigens that are not glycosphingolipids. *Journal of immunology* 2011; **186**:1348-60.
14. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H, Taniguchi M. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997; **278**:1626-9.
15. Benlagha K, Weiss A, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *The Journal of experimental medicine* 2000; **191**:1895-903.
16. Sullivan BA, Nagarajan NA, Wingender G, Wang J, Scott I, Tsuji M, Franck RW, Porcelli SA, Zajonc DM, Kronenberg M. Mechanisms for glycolipid antigen-driven cytokine polarization by Valpha14i NKT cells. *Journal of immunology* 2010; **184**:141-53.
17. Stetson DB, Mohrs M, Reinhardt RL, Baron JL, Wang ZE, Gapin L, Kronenberg M, Locksley RM. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *The Journal of experimental medicine* 2003; **198**:1069-76.
18. Terashima A, Watarai H, Inoue S, Sekine E, Nakagawa R, Hase K, Iwamura C, Nakajima H, Nakayama T, Taniguchi M. A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. *The Journal of experimental medicine* 2008; **205**:2727-33.
19. Coquet JM, Chakravarti S, Kyparissoudis K, McNab FW, Pitt LA, McKenzie BS, Berzins SP, Smyth MJ, Godfrey DI. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; **105**:11287-92.
20. Watarai H, Sekine-Kondo E, Shigeura T, Motomura Y, Yasuda T, Satoh R, Yoshida H, Kubo M, Kawamoto H, Koseki H, Taniguchi M. Development and function of invariant natural killer T cells producing T(h)2- and T(h)17-cytokines. *PLoS biology* 2012; **10**:e1001255.
21. Kim PJ, Pai SY, Brigl M, Besra GS, Gumperz J, Ho IC. GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells. *Journal of immunology* 2006; **177**:6650-9.
22. Williams JA, Lumsden JM, Yu X, Feigenbaum L, Zhang J, Steinberg SM, Hodes RJ. Regulation of thymic NKT cell development by the B7-CD28 costimulatory pathway. *Journal of immunology* 2008; **181**:907-17.
23. Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Van Kaer L, Saiki I, Okumura K. Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. *Journal of immunology* 2001; **166**:6012-8.
24. Kaneda H, Takeda K, Ota T, Kaduka Y, Akiba H, Ikarashi Y, Wakasugi H, Kronenberg M, Kinoshita K, Yagita H, Okumura K. ICOS costimulates invariant NKT cell activation. *Biochemical and biophysical research communications* 2005; **327**:201-7.
25. Akbari O, Stock P, Meyer EH, Freeman GJ, Sharpe AH, Umetsu DT, DeKruyff RH. ICOS/ICOSL interaction is required for CD4+ invariant NKT cell function and homeostatic survival. *Journal of immunology* 2008; **180**:5448-56.

26. Kitamura H, Iwakabe K, Yahata T, Nishimura S, Ohta A, Ohmi Y, Sato M, Takeda K, Okumura K, Van Kaer L, Kawano T, Taniguchi M, Nishimura T. The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *The Journal of experimental medicine* 1999; **189**:1121-8.
27. Chang WS, Kim JY, Kim YJ, Kim YS, Lee JM, Azuma M, Yagita H, Kang CY. Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy. *Journal of immunology* 2008; **181**:6707-10.
28. Parekh VV, Lalani S, Kim S, Halder R, Azuma M, Yagita H, Kumar V, Wu L, Kaer LV. PD-1/PD-L blockade prevents anergy induction and enhances the anti-tumor activities of glycolipid-activated invariant NKT cells. *Journal of immunology* 2009; **182**:2816-26.
29. Kennedy J, Vicari AP, Saylor V, Zurawski SM, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Zlotnik A. A molecular analysis of NKT cells: identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM). *Journal of leukocyte biology* 2000; **67**:725-34.
30. Patino-Lopez G, Hevezi P, Lee J, Willhite D, Verge GM, Lechner SM, Ortiz-Navarrete V, Zlotnik A. Human class-I restricted T cell associated molecule is highly expressed in the cerebellum and is a marker for activated NKT and CD8+ T lymphocytes. *Journal of neuroimmunology* 2006; **171**:145-55.
31. Takeuchi A, Itoh Y, Takumi A, Ishihara C, Arase N, Yokosuka T, Koseki H, Yamasaki S, Takai Y, Miyoshi J, Ogasawara K, Saito T. CRTAM confers late-stage activation of CD8+ T cells to regulate retention within lymph node. *Journal of immunology* 2009; **183**:4220-8.
32. Garay E, Patino-Lopez G, Islas S, Alarcon L, Canche-Pool E, Valle-Rios R, Medina-Contreras O, Granados G, Chavez-Munguia B, Juaristi E, Ortiz-Navarrete V, Gonzalez-Mariscal L. CRTAM: A molecule involved in epithelial cell adhesion. *Journal of cellular biochemistry* 2010; **111**:111-22.
33. Medina-Contreras O, Soldevila G, Patino-Lopez G, Canche-Pool E, Valle-Rios R, Ortiz-Navarrete V. Role of CRTAM during mouse early T lymphocytes development. *Developmental and comparative immunology* 2010; **34**:196-202.
34. Boles KS, Barchet W, Diacovo T, Cella M, Colonna M. The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood* 2005; **106**:779-86.
35. Galibert L, Diemer GS, Liu Z, Johnson RS, Smith JL, Walzer T, Comeau MR, Rauch CT, Wolfson MF, Sorensen RA, de Vries ARV, Branstetter DG, Koelling RM, Scholler J, Fanslow WC, Baum PR, Derry JM, Yan W. Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule. *Journal of Biological Chemistry* 2005; **280**:21955-64.
36. Arase N, Takeuchi A, Unno M, Hirano S, Yokosuka T, Arase H, Saito T. Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8+ T cells. *International immunology* 2005; **17**:1227-37.
37. Yeh JH, Sidhu SS, Chan AC. Regulation of a late phase of T cell polarity and effector functions by Crtam. *Cell* 2008; **132**:846-59.

38. Fornari TA, Donate PB, Macedo C, Sakamoto-Hojo ET, Donadi EA, Passos GA. Development of type 1 diabetes mellitus in nonobese diabetic mice follows changes in thymocyte and peripheral T lymphocyte transcriptional activity. *Clinical & developmental immunology* 2011; **2011**:158735.
39. Diabetes. WHOI. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>. , 2012.
40. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 2014; **37 Suppl 1**:S81-90.
41. Knip M, Siljander H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun Rev* 2008; **7**:550-7.
42. Knip M. Descriptive epidemiology of type 1 diabetes--is it still in? *Diabetologia* 2012; **55**:1227-30.
43. Noble JA, Erlich HA. Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2012; **2**:a007732.
44. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 2011; **91**:79-118.
45. Lehuen A, Diana J, Zaccane P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nature reviews Immunology* 2010; **10**:501-13.
46. Diana J, Gahzarian L, Simoni Y, Lehuen A. Innate immunity in type 1 diabetes. *Discovery medicine* 2011; **11**:513-20.
47. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 2010; **464**:1293-300.
48. Hill NJ, Van Gunst K, Sarvetnick N. Th1 and Th2 pancreatic inflammation differentially affects homing of islet-reactive CD4 cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2003; **170**:1649-58.
49. Cardell SL. The natural killer T lymphocyte: a player in the complex regulation of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Clin Exp Immunol* 2006; **143**:194-202.
50. Berzins SP, Kyparissoudis K, Pellicci DG, Hammond KJ, Sidobre S, Baxter A, Smyth MJ, Kronenberg M, Godfrey DI. Systemic NKT cell deficiency in NOD mice is not detected in peripheral blood: implications for human studies. *Immunology and cell biology* 2004; **82**:247-52.
51. Beaudoin L, Laloux V, Novak J, Lucas B, Lehuen A. NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells. *Immunity* 2002; **17**:725-36.
52. Fletcher MT, Baxter AG. Clinical application of NKT cell biology in type I (autoimmune) diabetes mellitus. *Immunology and cell biology* 2009; **87**:315-23.
53. Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Mi QS, Sondhi J, Naidenko OV, Kronenberg M, Koezuka Y, Delovitch TL, Gombert JM, Leite-De-Moraes M, Gouarin C, Zhu R, Hameg A, Nakayama T, Taniguchi M, Lepault F, Lehuen A, Bach JF, Herbelin A. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat Med* 2001; **7**:1057-62.
54. Hong S, Wilson MT, Serizawa I, Wu L, Singh N, Naidenko OV, Miura T, Haba T, Scherer DC, Wei J, Kronenberg M, Koezuka Y, Van Kaer L. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* 2001; **7**:1052-6.

55. Wilson SB, Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, Porcelli S, Schatz DA, Atkinson MA, Balk SP, Strominger JL, Hafler DA. Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 1998; **391**:177-81.
56. Lee PT, Putnam A, Benlagha K, Teyton L, Gottlieb PA, Bendelac A. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *The Journal of clinical investigation* 2002; **110**:793-800.
57. Oikawa Y, Shimada A, Yamada S, Motohashi Y, Nakagawa Y, Irie J, Maruyama T, Saruta T. High frequency of valpha24(+) vbeta11(+) T-cells observed in type 1 diabetes. *Diabetes care* 2002; **25**:1818-23.
58. Kis J, Engelmann P, Farkas K, Richman G, Eck S, Lolley J, Jalahej H, Borowiec M, Kent SC, Treszl A, Orban T. Reduced CD4+ subset and Th1 bias of the human iNKT cells in Type 1 diabetes mellitus. *Journal of leukocyte biology* 2007; **81**:654-62.
59. Canché-Pool EB. Evaluación de la presencia de linfocitos NKT que expresan la molécula CRTAM en pacientes con diabetes tipo 1 y sus familiares de primer grado. *Biomedicina Molecular*. Ciudad de México: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, 2006.
60. Canche-Pool E. Caracterización de la expresión de CRTAM en linfocitos NKT de humano. *Biomedicina Molecular*. Ciudad de México: Escuela Superior de Ciencias Biológicas- IPN, 2011:80.
61. Ramirez-Velazquez Carlos B-CN, Guido-Bayardo Leopoldo, Ortiz-Navarrete Vianney. Peripheral blood T Cells and Neutrophils from asthma patients express Class-I MHC restricted T cell-associated molecule. *ALLERGY, ASTHMA & CLINICAL IMMUNOLOGY* 2014; **10**:6.
62. Elsy C-P. Caracterización de la expresión de CRTAM en linfocitos NKT de humano. *Inmunología*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas: Instituto Politécnico Nacional, 2011:64.
63. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature reviews Immunology* 2013; **13**:227-42.
64. Cortez VS, Cervantes-Barragan L, Song C, Gilfillan S, McDonald KG, Tussiwand R, Edelson BT, Murakami Y, Murphy KM, Newberry RD, Sibley LD, Colonna M. CRTAM controls residency of gut CD4+CD8+ T cells in the steady state and maintenance of gut CD4+ Th17 during parasitic infection. *The Journal of experimental medicine* 2014; **211**:623-33.
65. Dessarthe B, Thedrez A, Latouche JB, Cabillic F, Drouet A, Daniel P, de La Pintiere CT, Catros V, Toutirais O. CRTAM receptor engagement by Necl-2 on tumor cells triggers cell death of activated Vgamma9Vdelta2 T cells. *Journal of immunology* 2013; **190**:4868-76.
66. Zaini J, Andarini S, Tahara M, Saijo Y, Ishii N, Kawakami K, Taniguchi M, Sugamura K, Nukiwa T, Kikuchi T. OX40 ligand expressed by DCs costimulates NKT and CD4+ Th cell antitumor immunity in mice. *The Journal of clinical investigation* 2007; **117**:3330-8.
67. Holzer U, Kwok WW, Nepom GT, Buckner JH. Differential antigen sensitivity and costimulatory requirements in human Th1 and Th2 antigen-specific CD4+ cells with similar TCR avidity. *Journal of immunology* 2003; **170**:1218-23.

68. Hermans IF, Silk JD, Gileadi U, Salio M, Mathew B, Ritter G, Schmidt R, Harris AL, Old L, Cerundolo V. NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells. *Journal of immunology* 2003; **171**:5140-7.
69. Esteban LM, Tsoutsman T, Jordan MA, Roach D, Poulton LD, Brooks A, Naidenko OV, Sidobre S, Godfrey DI, Baxter AG. Genetic control of NKT cell numbers maps to major diabetes and lupus loci. *Journal of immunology* 2003; **171**:2873-8.
70. Jordan MA, Fletcher JM, Pellicci D, Baxter AG. Slamf1, the NKT cell control gene Nkt1. *Journal of immunology* 2007; **178**:1618-27.
71. Gadola SD, Dulphy N, Salio M, Cerundolo V. Valpha24-JalphaQ-independent, CD1d-restricted recognition of alpha-galactosylceramide by human CD4(+) and CD8alphabeta(+) T lymphocytes. *Journal of immunology* 2002; **168**:5514-20.
72. Diana J, Beaudoin L, Gautron AS, Lehuen A. NKT and tolerance. *Methods in molecular biology* 2011; **677**:193-206.
73. Constantinides MG, Picard D, Savage AK, Bendelac A. A naive-like population of human CD1d-restricted T cells expressing intermediate levels of promyelocytic leukemia zinc finger. *Journal of immunology* 2011; **187**:309-15.
74. Lucas M, Gadola S, Meier U, Young NT, Harcourt G, Karadimitris A, Coumi N, Brown D, Dusheiko G, Cerundolo V, Klenerman P. Frequency and phenotype of circulating Valpha24/Vbeta11 double-positive natural killer T cells during hepatitis C virus infection. *Journal of virology* 2003; **77**:2251-7.
75. Wilson MT, Johansson C, Olivares-Villagomez D, Singh AK, Stanic AK, Wang CR, Joyce S, Wick MJ, Van Kaer L. The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; **100**:10913-8.
76. Harada M, Seino K, Wakao H, Sakata S, Ishizuka Y, Ito T, Kojo S, Nakayama T, Taniguchi M. Down-regulation of the invariant Valpha14 antigen receptor in NKT cells upon activation. *International immunology* 2004; **16**:241-7.
77. Menne C, Lauritsen JP, Dietrich J, Kastrup J, Wegener AK, Andersen PS, Odum N, Geisler C. T-cell receptor downregulation by ceramide-induced caspase activation and cleavage of the zeta chain. *Scandinavian journal of immunology* 2001; **53**:176-83.
78. Liu H, Rhodes M, Wiest DL, Vignali DA. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* 2000; **13**:665-75.
79. Schrum AG, Turka LA, Palmer E. Surface T-cell antigen receptor expression and availability for long-term antigenic signaling. *Immunological reviews* 2003; **196**:7-24.
80. Schrum AG, Wells AD, Turka LA. Enhanced surface TCR replenishment mediated by CD28 leads to greater TCR engagement during primary stimulation. *International immunology* 2000; **12**:833-42.
81. Schrum AG, Palmer E, Turka LA. Distinct temporal programming of naive CD4+ T cells for cell division versus TCR-dependent death susceptibility by antigen-presenting macrophages. *European journal of immunology* 2005; **35**:449-59.
82. Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nature reviews Immunology* 2011; **11**:131-42.

83. Novak J, Griseri T, Beaudoin L, Lehuen A. Regulation of type 1 diabetes by NKT cells. *International reviews of immunology* 2007; **26**:49-72.
84. Kent SC, Chen Y, Clemmings SM, Viglietta V, Kenyon NS, Ricordi C, Hering B, Hafler DA. Loss of IL-4 secretion from human type 1a diabetic pancreatic draining lymph node NKT cells. *Journal of immunology* 2005; **175**:4458-64.
85. Valle-Rios R, Patino-Lopez G, Medina-Contreras O, Canche-Pool E, Recillas-Targa F, Lopez-Bayghen E, Zlotnik A, Ortiz-Navarrete V. Characterization of CRTAM gene promoter: AP-1 transcription factor control its expression in human T CD8 lymphocytes. *Molecular immunology* 2009; **46**:3379-87.