

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFFECTOS DEL RETINOL (VITAMINA A) EN LA ACTIVACIÓN  
DE LINFOCITOS T HUMANOS Y SUS IMPLICACIONES  
TERAPÉUTICAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Luis Miguel Allende Martínez

Bajo la dirección de los doctores

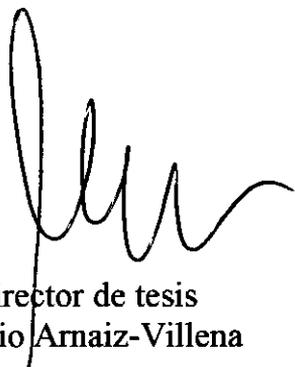
Antonio Arnaiz – Villena

Alfredo Corell Almuzara

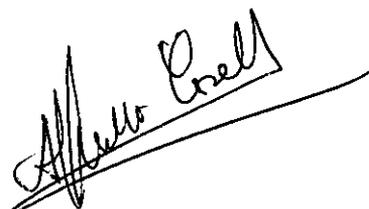
**Madrid, 1997**

**ISBN: 84-669-2427-2**

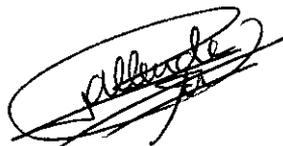
**EFFECTOS DEL RETINOL (VITAMINA A) EN LA  
ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T HUMANOS Y SUS  
IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS.**



V<sup>a</sup>B<sup>o</sup> Director de tesis  
Dr. Antonio Arnaiz-Villena



V<sup>a</sup> B<sup>o</sup> Director de tesis  
Dr. Alfredo Corell Almuzara



Luis M. Allende Martínez  
(Autor)

# **TESIS DOCTORAL**

## **EFECTOS DEL RETINOL (VITAMINA A) EN LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T HUMANOS Y SUS IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS.**



\* 5 3 0 9 8 2 6 2 2 7 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**AUTOR:** Luis Miguel Allende Martínez

**DIRECTORES:** Dr. Antonio Arnaiz-Villena  
Dr. Alfredo Corell Almuzara

**LUGAR DE  
REALIZACION:** Servicio de Inmunología  
Hospital Universitario "12 de Octubre"  
Madrid

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**1997**

**a mis padres**

## **AGRADECIMIENTOS:**

- Me gustaría dejar patente mi más sincero agradecimiento al Dr. Antonio Arnaiz y al Dr. Alfredo Corell por su dirección y apoyo contante durante todo este tiempo, sin los cuales no hubiera sido posible la elaboración de este proyecto de tesis doctoral.

- A todos mis compañeros y amigos del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario "12 de Octubre" de Madrid por su continua ayuda en todos los campos, entre los que destaco a Agustín Madroño, Pilar Gutiérrez, Alberto López Goyanes, Miguel Angel García Pérez, Milagros Pérez García, Antonia Ramírez, Rafael Góngora, Carlos Rodríguez-Gallego...

- Muy especialmente también, a mi hermano Fran, a mis abuelas y como no a Maribel.

# INDICE

I.- RESUMEN.....	1
II.- INTRODUCCION.....	4
II.1.- Los retinoides.....	5
II.1.1.- Estructura y bioactividad de los retinoides.....	5
II.1.2.- Metabolismo de los retinoides.....	7
II.1.3.- Proteínas que unen retinoides.....	12
II.1.3.1.- Proteínas plasmáticas.....	13
II.1.3.2.- Proteínas citoplasmáticas.....	13
II.1.3.3.- Receptores Nucleares.....	14
II.1.4.- Acciones biológicas de los retinoides.....	17
II.1.4.1.- Morfogénesis.....	18
II.1.4.2.- Teratogénesis.....	19
II.1.4.3.- Carcinogénesis.....	20
II.1.4.4.- En la piel.....	21
II.1.4.5.- En el Sistema Inmune.....	26
II.1.4.5.1.- En el linfocito T.....	26
II.1.4.5.2.- En el linfocito B.....	28
II.1.4.5.3.- En los linfocitos Natural Killer.....	30
II.1.4.5.4.- En la producción de interleucinas.....	31
II.1.4.5.5.- En la apoptosis.....	33
II.1.5.- Uso terapéutico de los retinoides.....	34
II.1.5.1.- Enfermedades dermatológicas.....	34
II.1.5.2.- Cáncer.....	35
II.1.5.2.1.- Leucemias.....	35
II.1.5.2.2.- Sarcoma de Kaposi.....	36
II.1.5.2.3.- Carcinoma de cabeza y cuello.....	36
II.1.5.3.- Inmunodeficiencias primarias.....	37
II.1.5.3.1.- Inmunodeficiencia común variable.....	37
II.1.5.3.2.- Síndrome Papillon-Lefèvre.....	38
II.1.5.4.- Inmunodeficiencias secundarias.....	39
II.1.5.4.1.- Sida.....	39
II.1.5.4.2.- Malnutrición.....	40

II.2.- Activación del linfocito T.....	42
II.2.1.- Mecanismo de la activación del linfocito T.....	42
II.2.2.- Estructura de moléculas importantes en la activación de los linfocitos T.....	45
II.2.2.1.- TCR/CD3.....	45
II.2.2.2.- CD2.....	46
II.2.2.3.- CD28.....	47
II.2.2.4.- CD25.....	47
II.2.3.- Consecuencias funcionales en la activación del linfocito T.....	50
II.2.3.1.- Activación fisiológica a través del complejo TCR/CD3.....	50
II.2.3.1.1.- Fenómenos tempranos.....	51
II.2.3.1.2.- Fenómenos tardíos.....	56
II.2.3.2.- Activación a través de CD2.....	58
II.2.3.3.- Activación a través de CD28.....	60
II.2.3.4.- Activación a través de CD25.....	62
II.2.4.- Moléculas inmunológicas inducidas o reprimidas por retinoides.....	64
II.2.4.1.- Regulación de la transcripción del gen de la IL-2.....	64
II.2.4.2.- Regulación de la transcripción del gen del IFN- $\gamma$ .....	65
II.2.4.3.- Regulación de la transcripción del gen de la cadena $\beta$ de LFA-1 (CD18).....	65
II.2.4.4.- Regulación de la transcripción del gen de ICAM-1.....	66
<b>III.- OBJETIVOS.....</b>	<b>68</b>
<b>IV.- MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>70</b>
IV.1.- Grupos de población estudiados.....	71
IV.1.1.- Grupo control.....	71
IV.1.2.- Pacientes analizados.....	71
IV.2.- Obtención de las muestras.....	72
IV.2.1.- Suero y leucocitos de sangre periférica.....	72
IV.2.2.- Obtención del material genético.....	73
IV.2.2.1.- Extracción del RNA citoplasmático total.....	73
IV.2.2.2.- Obtención del DNA complementario (cDNA).....	74
IV.2.2.3.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	74
IV.2.2.4.- Oligonucleótidos utilizados.....	74
IV.2.2.5.- Reacciones de amplificación del cDNA.....	75

IV.3.- Determinaciones inmunoquímicas.....	76
IV.3.1.- Inmunoglobulinas totales.....	76
IV.3.2.- Componentes del sistema del complemento.....	76
IV.4.- Determinaciones fenotípicas.....	76
IV.4.1.- Recuento leucocitario total y diferencial.....	76
IV.4.2.- Citofluorometría.....	76
IV.5.- Determinaciones funcionales en PBMC.....	77
IV.5.1.- Respuesta proliferativa a mitógenos.....	77
IV.5.2.- Producción de interleucinas.....	79
IV.5.2.1.- A nivel de proteína.....	79
IV.5.2.2.- A nivel de mRNA.....	79
IV.5.3.- Ensayos de fragmentación de DNA.....	81
IV.6.- Funcionalidad de linfocitos T-HVS.....	82
IV.6.1.- Inmortalización de linfocitos T con Herpes Virus Saimiri (HVS).....	82
IV.6.2.- Respuesta proliferativa en líneas T-HVS.....	82
IV.6.3.- Síntesis de RNAs específicos de receptores nucleares de retinoides.....	82
<b>V.- RESULTADOS.....</b>	<b>84</b>
V.1.- Puesta a punto de sistema de estimulación con retinoides.....	85
V.1.1.- Retinol - ácido retinoico.....	85
V.1.2.- Medio de crecimiento libre de suero.....	86
V.1.3.- Tiempo de adición.....	86
V.1.4.- Concentración óptima de retinol.....	88
V.2.- Efecto del retinol en las vías de activación de los linfocitos T.....	90
V.3.- Efecto de los diferentes anticuerpos monoclonales para activar vía.....	93
CD3: especificidad de la acción del retinol	
V.4.- La co-estimulación producida por el retinol no es debida a una.....	96
disminución de la apoptosis	
V.5.- Efecto del retinol en la inducción de citocinas.....	98
V.5.1.- A nivel de proteína.....	98
V.5.2.- A nivel de RNA mensajero.....	98

V.6.- Efecto del retinol en la inducción de marcadores de activación de las células T.....	101
V.7.- Estado inmunológico de los pacientes estudiados.....	103
V.8.- Efecto del retinol sobre la activación celular linfocítica..... de los inmunodeficientes	108
V.9.- Efecto del retinol en la respuesta proliferativa de las líneas T-HVS.....	109
V.10.- Síntesis de RNAs específicos de receptores nucleares de retinoides en..... las líneas T-HVS	111
<b>VI.- DISCUSION.....</b>	<b>113</b>
VI.1.- El retinol es un co-estímulo importante en los linfocitos T activados..... específicamente vía CD3.	114
VI.2.- Inducción de citocinas y marcadores de activación celular.....	118
VI.3.- Tratamiento in vitro con retinoides en determinadas inmunodeficiencias.....	121
<b>VII.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>123</b>
<b>VIII.- BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>125</b>
<b>IX.- ANEXO.....</b>	<b>145</b>
IX.1.- Abreviaturas.....	146

***I.- RESUMEN***

El término retinoide engloba un grupo de compuestos que incluye al ácido retinoico (AR), el retinol (ROL) y una serie de derivados naturales y sintéticos que presentan actividad tipo vitamina A. El retinol ejerce sus efectos a través de la interacción del complejo retinoide-receptor nuclear de retinoide con regiones promotoras del DNA nuclear de genes inducibles por ácido retinoico.

Los retinoides en general ejercen funciones muy importantes en la regulación, diferenciación y homeostasis del desarrollo de vertebrados; además, cada vez se implican más a estas moléculas en el desarrollo y maduración de gran variedad de tipos celulares (incluidas las del sistema inmune), así como en el tratamiento de diversas patologías: cáncer, enfermedades dermatológicas e inmunodeficiencias.

Mediante el estudio de la proliferación celular en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), se ha analizado el papel del ROL en linfocitos previamente activados con un amplio panel de mitógenos. Se ha utilizado tanto ROL como AR observándose un mayor efecto del ROL, se ha estandarizado la concentración óptima de ROL y cual es el momento adecuado de la adición del mismo. El efecto observado es realmente un aumento de proliferación celular y no una disminución de la posible apoptosis inducida al estimular vía CD3.

Uno de los mecanismos por los que el ROL modula la mitogénesis a través de CD3, es la inducción de la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  en PBMCs estimuladas previamente con anticuerpos monoclonales anti-CD3. No se han observado efectos aditivos del ROL sobre la síntesis de otras citocinas como IL-4, IL-6, IL-10 lo que claramente sugiere un perfil de activación tipo Th1.

Además, las PBMCs que se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y posteriormente con ROL han mostrado un aumento de porcentaje de expresión y de densidad celular en diversos marcadores de activación de células T (CD18, CD45RO, CD25). El aumento de expresión de

estos marcadores está en relación con la existencia de regiones de unión de retinoides sobre los promotores de los genes de estas moléculas.

Por último, se ha estudiado el efecto del ROL sobre linfocitos T activados de diferentes inmunodeficiencias encontrándose que sólo en aquellos casos en que la vía de activación del CD3 se encuentra intacta, el efecto del ROL persiste. Estos hallazgos permiten plantear su uso terapéutico en determinadas inmunodeficiencias.

## ***II.- INTRODUCCIÓN***

## II.1.- LOS RETINOIDES

Los retinoides son una serie de compuestos derivados de la vitamina A que se han revelado muy importantes para numerosos procesos biológicos tales como el crecimiento, la regulación de la proliferación y diferenciación de los tejidos epiteliales, el mantenimiento de las funciones visuales y en la reproducción.

Los efectos anti-infectivos de la vitamina A son conocidos desde hace tiempo, aunque su mecanismo de acción en el sistema inmune no es totalmente conocido. En los últimos años se han identificando los receptores del ácido retinoico, pertenecen a una familia multigénica de receptores nucleares que incluye los receptores para las hormonas esteroideas, tiroideas y vitamina D<sub>3</sub>, a través de los cuales los retinoides ejercerían sus funciones.

### II.1.1.- ESTRUCTURA Y BIOACTIVIDAD DE RETINOIDES

La vitamina A es un compuesto isoprenoide formado por un anillo carbocíclico de 6 miembros y una cadena lateral de 11 átomos de carbono. Pertenecen a una familia de moléculas con estructura similar que se denominan de modo genérico retinoides (Figura 1). La actividad de la vitamina A en los mamíferos se debe no sólo a los retinoides, sino también a ciertos carotenos ampliamente distribuidos en la mayoría de los vegetales. Los carotenos no poseen actividad intrínseca de vitamina A por sí mismos, pero son convertidos en vitamina A mediante reacciones enzimáticas que tienen lugar en la mucosa intestinal y en el hígado: así el  $\beta$ -caroteno, cuya molécula es simétrica, se escinde por su centro y rinde dos moléculas de retinol.

Los retinoides son una familia de moléculas de bajo peso molecular, derivadas de moléculas hidrofóbicas de la vitamina A. Estos compuestos exhiben sus efectos en el crecimiento y diferenciación de muchos tejidos celulares y su empleo ha mostrado ser relevante clínicamente para el tratamiento de algunos tipos de cáncer y de enfermedades dermatológicas.

Los retinoides que llevan a cabo esas funciones primordiales son: retinol (vitamina A),

ácido retinoico y otros metabolitos. El ácido retinoico es la forma oxidada del retinol, siendo el ácido retinoico todo-trans (AT-RA) y el ácido 9-cis retinoico (9-cis RA) sus isómeros más comunes. Algunos retinoides no son funcionales, sino moléculas de almacenamiento inactivas, precursores metabólicos o derivados de las formas activas.

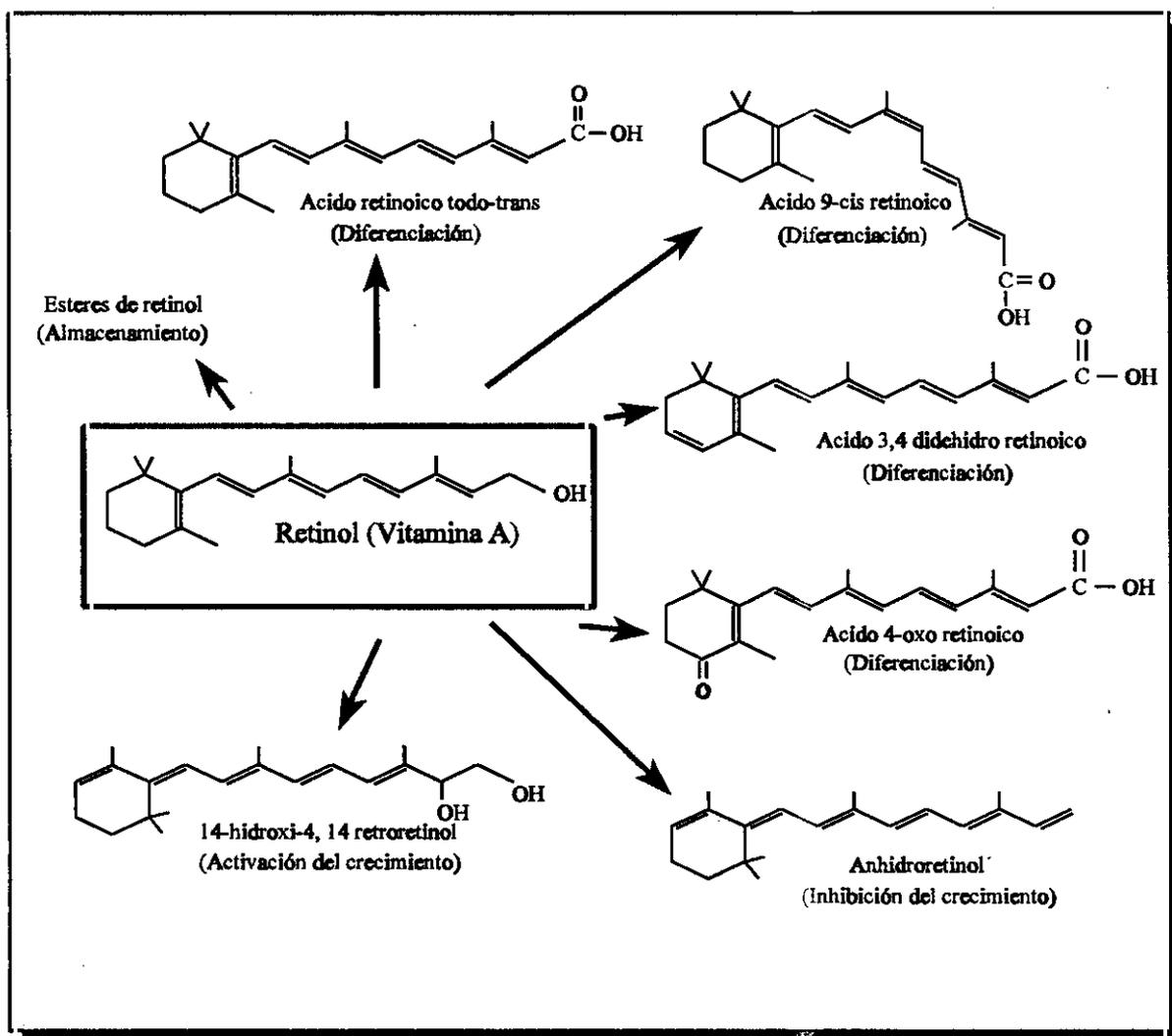


Figura 1. Estructura de algunos retinoides

La estructura de la vitamina A y algunos de sus metabolitos se muestran en la figura 1. La mayoría de los estudios de teratogénesis se centran en el estudio del ácido retinoico todo-trans (AT-RA), aunque sus esteroisómeros [el ácido 9-cis retinoico (9-cis RA) y el ácido 13-cis retinoico (13-cis RA)] también exhiben las mismas funciones biológicas que el AT-RA.

Los cambios en la estructura del anillo carbocíclico resultan en diferentes componentes bioactivos tales como: el ácido 3, 4 didehidroretinoico y el ácido 4-oxoretinoico (Sporn, 1994), importantes en diferenciación celular. Dos derivados del retinol que han mostrado ser importantes para el crecimiento de algunas células en cultivo, son el anhidroretinol y el 14-hidroxi- 4, 14 retroretinol (14-HRR) (Eppinger, 1993). El 14-HRR se requiere para el crecimiento de células linfoides mientras que el anhidroretinol actúa como un antagonista de 14-HRR e inhibe el crecimiento de las células linfoides. Además hay una gran variedad de derivados sintéticos de los retinoides que se han utilizado en diferentes ensayos "in vitro" (Fanjul, 1994).

### **II.1.2.- METABOLISMO DE LOS RETINOIDES**

El término "vitamina A" es empleado para los retinoides que muestran actividad biológica del tipo "vitamina A". La palabra retinoide fue acuñada por Sporn hace más de 25 años e incluye las formas natural de la vitamina A (retinol) y sus análogos sintéticos (DeLuca, 1991).

Los seres humanos requieren cantidades pequeñas de vitamina A en su dieta (400 a 1300µg de retinol por día, según la edad). Esta cantidad se puede ingerir fácilmente en la alimentación diaria en la mayoría de los países occidentales, pero se ha demostrado que una dieta deficitaria de vitamina A (especialmente en niños) es un problema de salud común en algunas partes del mundo, dando como resultado xeroftalmia y un incremento de infecciones severas y muerte (Semba, 1994; de Pee, 1996).

#### **Absorción intestinal del retinol**

Las fuentes principales de vitamina A en la dieta son los carotenos procedentes de frutas y verduras y los ésteres de retinol procedentes de los tejidos animales (especialmente del hígado).

En cada caso la absorción se produce de forma diferente (Figura 2):

a) En el caso de los carotenos, son absorbidos como tales y escindidos a retinal en los

enterocitos (Ong, 1993). El retinal se une a una proteína intestinal (CRBP II), la cual le protege de su oxidación a ácido retinoico y permite la reducción del retinal al retinol.

b) Por otra parte, los ésteres de retinol (ER) sufren una hidrólisis en el lumen intestinal transformándose en retinol, de esta forma son absorbidos por los enterocitos y ya como en el caso anterior se unen a CRBP II.

En los enterocitos el complejo retinol-CRBP II reacciona con ácidos grasos de cadena larga formando los ésteres de retinol, este proceso es catalizado por la enzima lecitina: retinol acil transferasa (LRAT) (Matsuura, 1993; Ong, 1987b). Los ésteres de retinol formados junto con los triglicéridos y los ésteres de colesterol son incorporados en los quilomicrones que son las principales lipoproteínas intestinales.

### **Transporte en forma de Quilomicrones**

El componente proteico de los quilomicrones es extraordinariamente importante porque los ésteres de retinol formados son incapaces por sí solos de pasar al líquido linfático. Las proteínas que forman parte de la estructura de los quilomicrones forman una cubierta hidrofílica alrededor de dichos ésteres, haciéndolos hidrosolubles. Una vez en el sistema linfático, los quilomicrones son transportados a través del conducto torácico hasta el punto de unión de las venas yugular y subclavia, donde son secretados a la circulación general. Ya en la sangre se sucederán distintos procesos como la hidrólisis de triacilglicerol y el intercambio de apolipoproteínas que originará la formación de quilomicrones remanentes (Green, 1981). Los quilomicrones remanentes contienen todo el retinol absorbido en forma de ésteres de retinol, son aclarados por células del parénquima hepático (Blomhoff, 1984; Figura 2), y pueden seguir dos vías:

a) Vía Extrahepática.

Los quilomicrones remanentes son importantes en la entrega directa de los ésteres de retinol a tejidos como la médula y el bazo ya que en estos tejidos se dan importantes procesos

de proliferación celular y diferenciación. En las células leucémicas mieloides se ha visto cómo los quilomicrones aportan ésteres de retinol inhibiendo la proliferación celular e induciendo la diferenciación de esas células (Wathne, 1988).

b) Vía hepática.

En el hígado, las células parenquimales (hepatocitos) son responsables de la incorporación de los ésteres de retinol (Blomhoff, 1984), estos son hidrolizados en la membrana plasmática o en los endosomas tempranos por una hidrolasa de ésteres de retinol (Harrison, 1989) liberando retinol, que es transferido al retículo endoplásmico (RE) (Blomhoff, 1985); dentro del RE el retinol se acompleja con una proteína unidora de retinol (RBP) que se encuentra a alta concentración. El complejo RBP-retinol se transloca al aparato de golgi, se secreta y se exporta a las células estrelladas hepáticas.

Esa transferencia es bastante específica y ya en las células estrelladas el retinol vuelve a ser re-esterificado a ésteres de retinol. En mamíferos más del 80% del total de vitamina A es almacenado en las células estrelladas hepáticas en forma de ésteres de retinol (Blomhoff, 1985); esa reserva es suficiente en humanos al menos durante varios meses. Las células estrelladas almacenan ésteres de retinol en grandes gotas lipídicas citoplasmáticas, donde el tamaño y número de las cuales depende de la cantidad de vitamina A presente (Wake, 1980). Las células estrelladas se encuentran también en el intestino, riñón, corazón, ovarios y testículo donde también funcionan como almacenadoras de cantidades elevadas de retinol (Wake, 1980).

Todo el retinol del plasma sanguíneo que no está asociado con los quilomicrones se une a la RBP y es movilizado desde las células estrelladas al plasma, como RBP-retinol. La facilidad de las células estrelladas para controlar el almacenamiento y movilizar el retinol asegura que la concentración en sangre de retinol esté siempre entorno a  $2\mu\text{g}$  a pesar de las fluctuaciones diarias en el aporte de vitamina A (van den Berg, 1996).

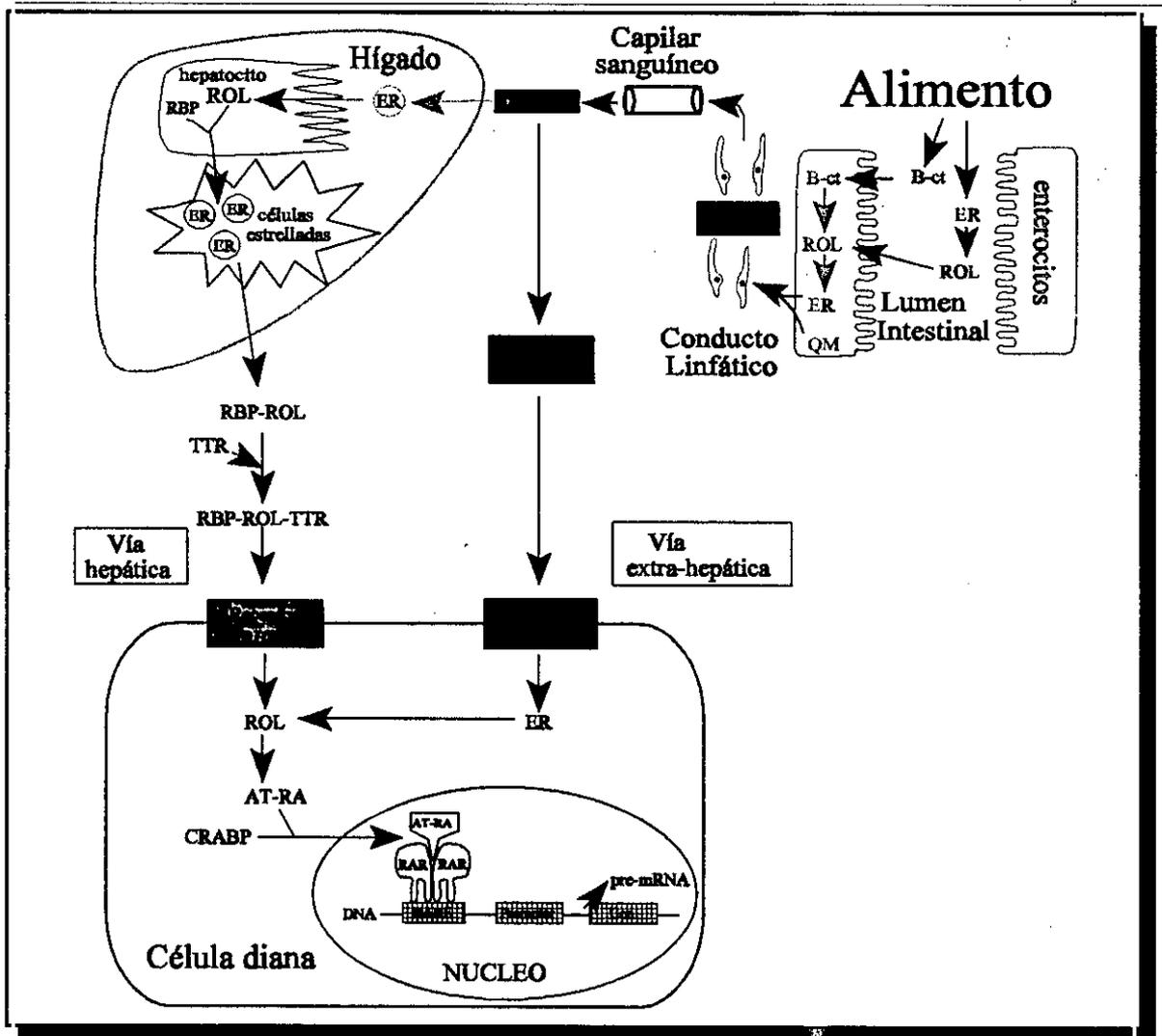


Figura 2. Absorción, distribución y metabolismo de los retinoides.

**Reciclaje de retinol**

La proteína RBP pertenece a una familia de proteínas que une pequeñas moléculas hidrofóbicas como pigmentos biliares, etc. La estructura tridimensional de RBP predice la existencia de un bolsillo hidrofóbico capaz de unir una molécula de retinol (Newcomer, 1984).

La mayoría del RBP-retinol (21 kD) se acompleja reversiblemente en el plasma con otra proteína llamada transtiretina (TTR) (55kD); este complejo trimolecular presenta menor susceptibilidad de filtración renal que el formado solamente por RBP-retinol. Estudios cinéticos (Green, 1987) indican que la mayoría del retinol plasmático que abandona la circulación general

se recicla de 7 a 9 veces hasta que ya resulta inservible para los tejidos. Sólo el 20% del RBP-retinol plasmático procede del hígado; el riñón aporta un 50% de RBP-retinol procedente de lo que se ha reabsorbido.

### **Proteínas que unen retinoides**

RBP es la proteína plasmática que une retinoides, su función es el transporte de los retinoides unidos a los tejidos diana (Blaner, 1989). El proceso por el cual el retinol se incorpora a las células diana depende de la existencia de receptores para RBP en dichas células (Bavik, 1991) (Figura 2). Una vez en el interior celular, la entrada del ácido retinoico al interior nuclear de una célula diana depende de 2 tipos de proteínas que unen retinoides: CRBP (Proteína que une retinol a nivel celular) y CRABP (Proteína que une ácido retinoico a nivel celular).

### **Mecanismo de acción del ácido retinoico**

El ácido retinoico y sus isómeros son los compuestos funcionalmente activos de la vitamina A a la hora de ejercer el papel correspondiente en el interior celular. La oxidación del retinol a ácido retinoico se ha demostrado en numerosos órganos "in vitro". El ácido retinoico se produce principalmente en el hígado y se libera a los tejidos diana a través de la circulación, pero sus niveles plasmáticos son muy reducidos, no estando claro si es porque se secuestra por las células diana donde ejercerá su función.

Estudios bioquímicos y moleculares han demostrado que el mecanismo de acción del ácido retinoico (Figura 2) es altamente homólogo al de las hormonas esteroideas y tiroideas. Esto se ha confirmado tras el descubrimiento de al menos dos tipos de receptores nucleares de ácido retinoico:

-RAR: Receptor de Acido retinoico

-RXR: Receptor de otras formas de ácido retinoico

Ambos tipos de receptores tienen tres subformas diferentes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) que son codificados por genes diferentes y regulados independientemente. Las tres formas del RAR difieren en su

distribución tisular y en su nivel de expresión durante el desarrollo.

Esos receptores nucleares ejercen su función por la unión a secuencias específicas de DNA llamadas, elementos de respuesta a ácido retinoico (RARE) y elementos de respuesta de retinoides X (RXRE) las cuales se localizan en la región promotora de los genes retinoico-inducible (Lohnes, 1992). Hasta el momento se han identificado un número moderado de RAREs en genes diana cuya expresión estaría controlada a nivel transcripcional por el ácido retinoico (Durand, 1992). Estos RAREs consisten en repeticiones directas (DR) de dos motivos de la siguiente secuencia consenso 5'-[A/T]G[G/T]TCA separadas por cinco pares de bases (DR5) en el caso de los genes inducibles por RAR $\alpha$  (Leroy, 1991) y RAR $\beta$  (de Thé, 1990). Sin embargo, estudios en el caso de RXR han mostrado su preferencia por la unión a motivos separados por una sola base (DR1) (Mader, 1992).

Se han identificado otros elementos de respuesta distintos a los RARE para RAR y RXR, se ha demostrado que RAR $\alpha$  puede unirse a un elemento de respuesta de la hormona tiroidea (HRE) sobre el gen de la hormona de crecimiento, esto explicaría que el ácido retinoico actúe de forma sinérgica con la hormona tiroidea y se estableciera el control transcripcional de la hormona de crecimiento en células pituitarias (Umesono, 1988).

Hay dos tipos de receptores de hormona tiroidea, denominados TR $\alpha$  y TR $\beta$ . Ambos pueden formar heterodímeros con el RAR $\alpha$  (Glass, 1989) y estos dímeros pueden unirse a elementos de respuesta de la hormona tiroidea lo que resulta en un incremento transcripcional de algunos genes, aunque también en la regulación negativa de otros (Fanjul, 1994).

### II.1.3.- PROTEINAS QUE UNEN RETINOIDES

Como ya se ha mencionado anteriormente la forma que tienen los retinoides de ejercer su función es a través de unos receptores específicos que pueden ser plasmáticos, citoplasmáticos y nucleares.

### **II.1.3.1.- PROTEINAS QUE UNEN RETINOL A NIVEL PLASMATICO**

La RBP (Proteína que une retinol) está formada por una cadena polipeptídica de 182 aminoácidos con un peso molecular de 21 Kd, donde en su estructura se encuentra un dominio para la unión del retinol (Blaner, 1989). En la sangre, la RBP circula unida con otra proteína sérica llamada transtiretina (o prealbúmina), que estabiliza todo el complejo.

La RBP es la única proteína conocida que une retinol a nivel sanguíneo (Newcomer, 1984; Noy, 1991); su función es la protección del retinol, debido a su extrema labilidad. Se ha demostrado que el retinol sin RBP tiene una vida media muy reducida (12 horas) (Buck, 1991).

### **II.1.3.2.- PROTEINAS CITOPLASMATICAS QUE UNEN RETINOIDES**

Entre las proteínas citoplasmáticas que unen retinoides se incluyen la CRBP y la CRABP. Estas proteínas unen sus ligandos (retinol y ácido retinoico, respectivamente) con alta afinidad y especificidad. Tienen 2 funciones principales:

a) como proteínas tampón

CRBP y CRABP son muy importantes en controlar y limitar la concentración de retinol y de ácido retinoico libre que no está unido. La cantidad de retinol unido a CRBP y el no unido debe estar en equilibrio, sin embargo, la cantidad de retinol asociado a CRBP es bastante mayor favoreciendo por tanto la disminución de la concentración de retinol libre (Levin, 1988; Noy, 1991).

b) como proteínas guía

Se encargan de dirigir adecuadamente la vitamina A hacia enzimas específicas del metabolismo (Boerman, 1991).

Ambas proteínas son similares estructuralmente (homólogas), pero no tienen el mismo patrón de distribución y se regulan de forma diferente durante el desarrollo embrionario, fetal y neonatal (Blomhoff, 1990; Ross 1993):

**a) CRBP (Cellular Retinol Binding Protein)**

A su vez se subdividen en CRBPI y CRBP II (Blomhoff, 1990). CRBPI regula la formación de la reserva principal de retinol que es en forma de ésteres de retinol (Ong, 1987a). CRBP II media el transporte intracelular de retinol durante la adsorción de éste componente desde el lumen intestinal (Ong, 1987a; Ong., 1987b).

La expresión de estas proteínas se regula por un mecanismo feedback, siendo los transcritos de CRBPI inducibles por ácido retinoico (Smith, 1991b) lo que regula la cantidad de retinol disponible para su conversión en ácido retinoico.

**b) CRABP (Cellular Retinoic Acid Binding Protein)**

Se subdivide en dos formas CRABPI y CRABPII (Blomhoff, 1990; Giguere, 1990). Unen el ácido retinoico con alta afinidad (Blomhoff, 1991), su función principal es el transporte del ácido retinoico hasta el núcleo donde es transferido a los receptores nucleares (Takase, 1986). También se encargan del control intracelular de la cantidad del ácido retinoico libre en una célula (Ruberte, 1991).

CRABPI y II son inducibles por ácido retinoico (Durand, 1992), por lo que existe un mecanismo feedback encargado de la regulación del exceso de ligando que impide una inapropiada expresión de genes inducibles por el ácido retinoico.

**II.1.3.3.- RECEPTORES NUCLEARES DE ACIDO RETINOICO**

Son los receptores que unen finalmente el ácido retinoico en el núcleo de la célula, hasta el momento se han descrito dos tipos:

**a) RAR (Receptor de Acido Retinoico)**

Se han descrito tres tipos de RAR cuyos genes, en humanos, mapean en diferentes cromosomas:

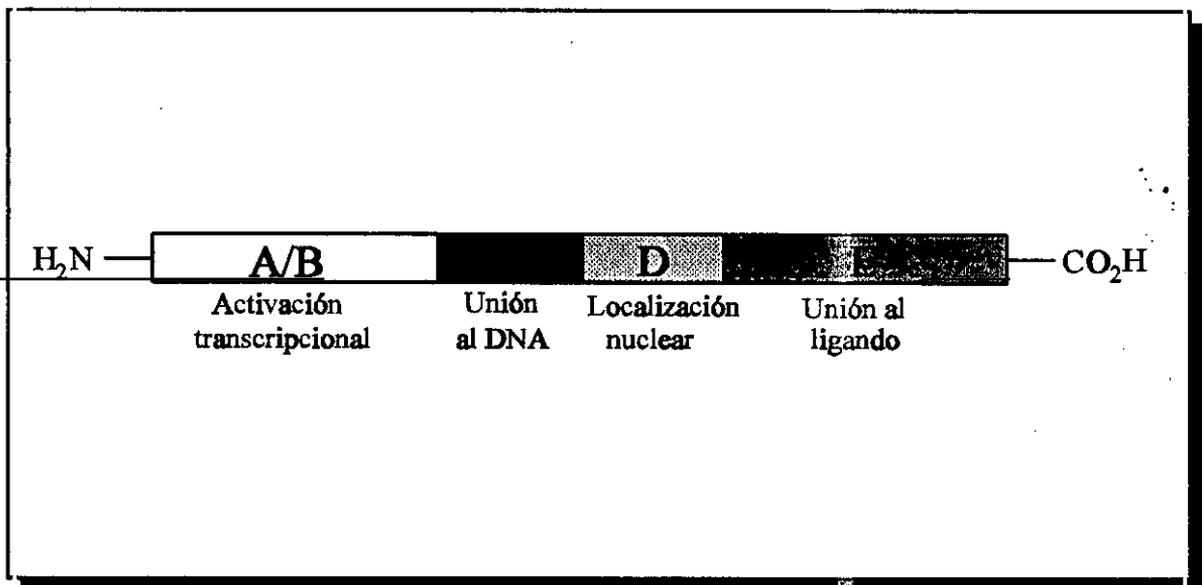
- RAR $\alpha$ : cromosoma 17 (Petkovich, 1987)

- RAR $\beta$ : cromosoma 3 (Benbrook, 1988)

- RAR $\gamma$ : cromosoma 12 (Ishikawa, 1990)

Se han encontrado proteínas homólogas para los tres receptores en los anfibios (Ragsdale, 1991) y en las aves (Smith, 1991) lo que sugiere que esos tres genes se han conservado a través de la evolución en vertebrados superiores.

Las proteínas RARs como miembros de la superfamilia de los receptores nucleares están formadas por cinco dominios designados de la A a la E (Figura 3) (Green, 1988). La estructura común de esta superfamilia de receptores consiste en un dominio A/B en el extremo N terminal de la molécula que es importante para la activación de la transcripción, un dominio C que es la zona de unión al DNA y que además representa la región más conservada en esta familia de receptores (Evans, 1988), un dominio D que contiene una señal de translocación nuclear y el dominio E en el extremo C terminal de la molécula que representa la región de unión al ligando (ácido retinoico) (Napoli, 1996).



**Figura 3. Dominios de los receptores nucleares.**

Cuando un mismo RAR se compara entre especies, las secuencias de aminoácidos tienen gran homología (por ejemplo entre humanos y ratón; Krust, 1989), sin embargo la comparación

de los tres tipos de receptores ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) dentro de una misma especie revela que sólo las regiones B, C y E son las homólogas en mayor grado. Esta observación implica que cada RAR podría ser funcionalmente distinto, regulando una subclase de genes respondedores a retinoides diferente, lo cual es coherente con el hecho de que la expresión espacio-temporal de los RARs es distinta durante el desarrollo embrionario.

#### b) RXR (Receptor de retinoide X)

La familia de receptores RXR se compone también de tres subtipos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) los cuales se conservan en las diferentes especies de los vertebrados (Leid, 1992).

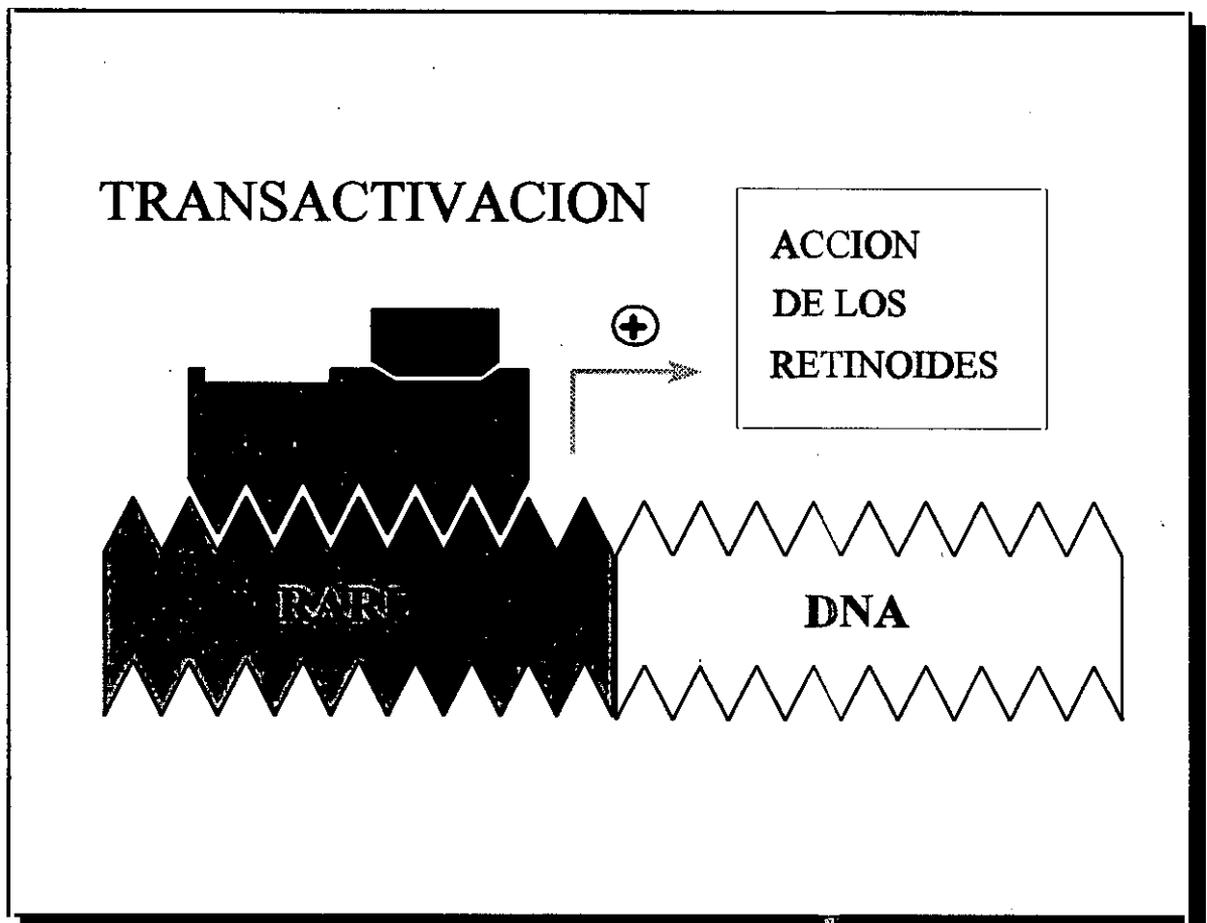


Figura 4. Transactivación: mecanismo de acción de los retinoides.

Aunque se descubrió que la familia RXR tenía un ligando único y específico (9-cis RA) lo que implicaba una supuesta vía de señalización distinta, diversos estudios han demostrado que las familias de los receptores RAR y RXR podrían tener vías de señalización convergentes ya

que se comprobó "in vitro" que heterodímeros RAR/RXR pueden unirse activamente a elementos de respuesta de ácido retinoico (RAREs) y estos complejos transactivarían más eficazmente los promotores inducibles que los homodímeros de esos receptores (Figura 4) (Durand, 1992; Luisi, 1995).

El ácido retinoico todo-*trans* (AT-RA) es el ligando de alta afinidad para los receptores RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (Allegreto, 1993), mientras que el 9-*cis* RA es el esteroisómero activo del AT-RA y el ligando de alta afinidad tanto para los receptores RAR como RXR. Los heterodímeros formados por RAR-RXR activan la respuesta transcripcional únicamente por la unión de 9-*cis* RA. Esta variación de combinaciones podría empezar a explicar los efectos pleiotrópicos de los retinoides "in vivo" (Perlmann, 1995).

#### II.1.4.- ACCIONES BIOLÓGICAS DE LOS RETINOIDES

Los retinoides son una serie de moléculas capaces de controlar diferentes procesos biológicos (Figura 5) muy importantes para el desarrollo de los vertebrados. Estas pequeñas moléculas lipídicas pueden contener y comunicar tanta información gracias a la gran cantidad de combinaciones regulatorias que pueden llegar a establecerse.

La acción de los retinoides es el resultado de las numerosas interrelaciones que se establecen con una serie de hormonas, proteínas de unión, enzimas anabólicas y catabólicas, receptores (actuando bien solos y/o en combinación con otros receptores hormonales) y elementos de respuesta. Esta combinación de acciones se controla en todos los vertebrados con un cuidadoso programa de regulación espacio-temporal.

A continuación se detallan algunas de las funciones más importantes desempeñadas por los retinoides.

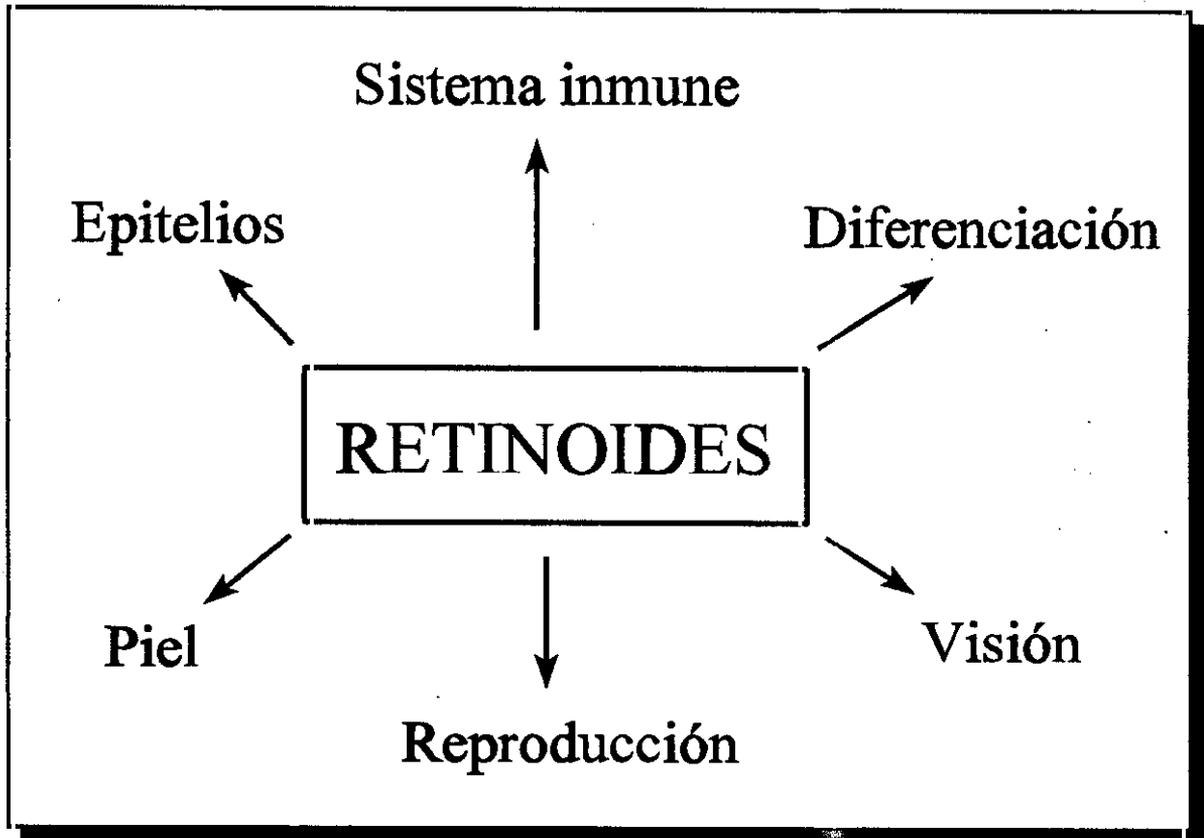


Figura 5. Funciones biológicas de los retinoides.

#### II.1.4.1.- MORFOGENESIS

La morfogénesis puede definirse como el conjunto de procesos a través de los cuales los embriones o partes de ellos cambian de forma y los grupos de células cambian sus posiciones relativas en el espacio (movimientos morfogenéticos). La morfogénesis da lugar a la forma final del individuo adulto estableciendo un patrón específico de tejidos y órganos que implican relaciones definidas de unos con otros en términos de tamaño y contenido celular.

El desarrollo de un organismo pluricelular depende de señales morfogenéticas que son producidas entre las células como consecuencia de cambios en la expresión génica.

Muchos estudios han demostrado que el ácido retinoico está implicado en algunos de estos procesos, debido a su mecanismo de actuación a través de una serie de receptores nucleares (RAR y RXR). Algunos de esos genes que son directamente regulados por esos receptores son genes expresados durante la embriogénesis, otros codifican para factores

transcripcionales y otros para factores de crecimiento (Maden, 1994).

El tratamiento con retinoides causa malformaciones de las estructuras (miembros) que surgen a lo largo del eje antero/posterior; la influencia de retinoides sobre el desarrollo morfológico y sobre la regulación de genes implicados en el desarrollo (observando similitudes entre el fenotipo de la teratogénesis mediada por retinoides y mutaciones en los genes homeobox) sugiere que los retinoides puedan mediar en algunas de las funciones de la colocación del eje antero/posterior que ocurre en la embriogénesis normal (Means, 1995).

#### II.1.4.2.- TERATOGENESIS

Durante el desarrollo de los vertebrados, el eje central del cuerpo debe ser establecido, organizándose en la mayoría de los casos según el eje antero/posterior (de cabeza a cola). El ácido retinoico exógeno puede producir efectos teratogénicos sobre el establecimiento de este eje y la estructura que surga a partir de él, induciendo una gran variedad de malformaciones en los vertebrados, las cuales han sido bien caracterizadas en el desarrollo de los humanos (Dai, 1992), hamster (Wiley, 1983) y ratones (Rutledge, 1994). Entre las malformaciones más frecuentemente descritas destacan las que implican a estructuras craneo-faciales, cardíacas, tónicas, del sistema nervioso central y en la primera estructura derivada del eje antero-posterior (tubo neural).

El ácido retinoico causa distintos tipos de efectos teratogénicos en función de la concentración y el tiempo de adición del ácido retinoico a los embriones en desarrollo (Hyatt, 1992).

Aunque se ha prestado menor atención a la teratogénesis asociada con la deficiencia de vitamina A, hay también un amplio conjunto de malformaciones observadas en los fetos de las ratas deficientes en vitamina A. Las anormalidades más frecuentemente encontradas implican al desarrollo ocular llegando incluso a la anoftalmia (ausencia del ojo), al tracto genito urinario,

al corazón y a los pulmones.

### II.1.4.3.- CARCINOGENESIS

Los retinoides han mostrado tener una variedad de efectos en la diferenciación celular y en el proceso de carcinogénesis. Recientemente el AT-RA y sus derivados se han usado como agentes preventivos contra el cáncer y como alternativa en la quimioterapia anti-leucémica (Love, 1994).

Los receptores nucleares juegan un papel fundamental en la funcionalidad del AT-RA, por lo que las funciones anti-cancerígenas de los retinoides deben a su vez ser mediadas por los RARs. La expresión de los diferentes transcritos de RAR varía durante la progresión celular desde el estado premaligno al estado maligno de las células. Analizando varios tipos de cáncer se ha observado que la expresión del gen RAR- $\beta$  en distintos carcinomas es mucho menor que en las células control (Xu, 1994).

La transfección con un vector de expresión del gen RAR $\beta$  sobre células epidermoides de carcinoma de pulmón ha mostrado el aumento del efecto anti-tumoral de este factor (Houle, 1993); por lo tanto, el papel del gen RAR $\beta$  parece ser muy importante en el mantenimiento y la prevención de ciertos procesos malignos, mostrando que la disminución en su expresión los haría más sensibles a padecer la transformación cancerosa.

En el caso de la leucemia promielocítica aguda (APL), es RAR $\alpha$ , el que desarrolla un papel muy importante en la patogénesis de la enfermedad (Warrel, 1993; Weis, 1994).

Recientemente, se conoce más en profundidad el papel regulador de los receptores RARs sobre los genes homeobox (genes que codifican para factores de transcripción específicos de una secuencia de DNA) que juegan un papel muy importante en el desarrollo embrionario e incluso en la diferenciación de muchos tipos celulares de animales adultos (Care, 1994). Ciertos genes homeobox tienen propiedades oncogénicas cuando se activan incontroladamente (Perkins,

1993), por lo que es probable que estos genes medien en la acción de los retinoides con respecto a la diferenciación celular y al control del crecimiento de muchos tipos celulares.

#### **II.1.4.4.- EN LA PIEL**

Los descubrimientos recientes que se han producido en las distintas áreas de investigación de los retinoides, ha hecho posible un conocimiento más extenso y profundo de las bases moleculares de la fisiología y farmacología de los retinoides a nivel de la piel.

La piel humana se divide en dos compartimentos fundamentales, epidermis y dermis. El tipo celular principal de la epidermis son los keratinocitos. Los keratinocitos en la capa basal se dividen y migran a través de la capa suprabasal diferenciándose en forma de barrera protectora. Los melanocitos también residen en la capa basal de la epidermis y son los responsables de la síntesis de pigmentos que dan el color a la piel. La epidermis está separada de la dermis por la membrana basal compuesta principalmente de colágeno tipo IV y tipo VII, laminina, fibronectina y proteoglicanos. La dermis está formada por colágeno tipo I, tipo III y elastina, los cuales son sintetizados por fibroblastos dermales.

#### **Metabolismo de los retinoides en la piel humana**

Los ésteres de retinol y  $\beta$ -carotenos incorporados desde la dieta son convertidos a retinol en el intestino y almacenados en el hígado en forma de ésteres de retinol. El retinol liberado por el hígado es transportado por la circulación unido a RBP, de esta forma el retinol es incorporado por las células de la piel a través de un proceso de difusión pasiva.

En la piel humana el retinol es metabolizado en al menos 4 productos: ésteres de retinol, 14-hidroxi-4, 14 retroretinol, ácido 3, 4 didehidro retinoico y ácido retinoico. De la misma forma que en el hígado los ésteres de retinol son la forma de almacenamiento, en la piel sucede lo mismo, produciéndose tras su hidrólisis retinol libre que es metabolizado por las células de la piel.

El tratamiento tópico con retinol de la piel humana incrementa los niveles de LRAT (probablemente vía RAR) y la formación de ésteres de retinol en los keratinocitos de la capa basal (Kurlandsky, 1996). Por lo tanto, la síntesis de ésteres de retinol por los keratinocitos de la capa inferior de la epidermis proporciona a esas células una fuente de retinol durante su migración y maduración a las capas superiores. Esta hipótesis se confirma observando que los keratinocitos maduros poseen la capacidad de metabolizar retinol al metabolito activo que es el ácido retinoico (Siegenthaler, 1990).

El proceso de biosíntesis de ácido retinoico desde el retinol sucede en dos pasos: el retinol se oxida a retinaldehído el cual posteriormente se volverá a oxidar a ácido retinoico.

El efecto del tratamiento de la piel humana con retinol produce alteraciones histológicas y moleculares parecidas a las que suceden en respuesta a ácido retinoico, produciendo un engrosamiento de la epidermis debido a un incremento en la proliferación de los keratinocitos, ensanchando los espacios intercelulares, compactando la barrera epidermal e induciendo la expresión de CRBP y CRABP II.

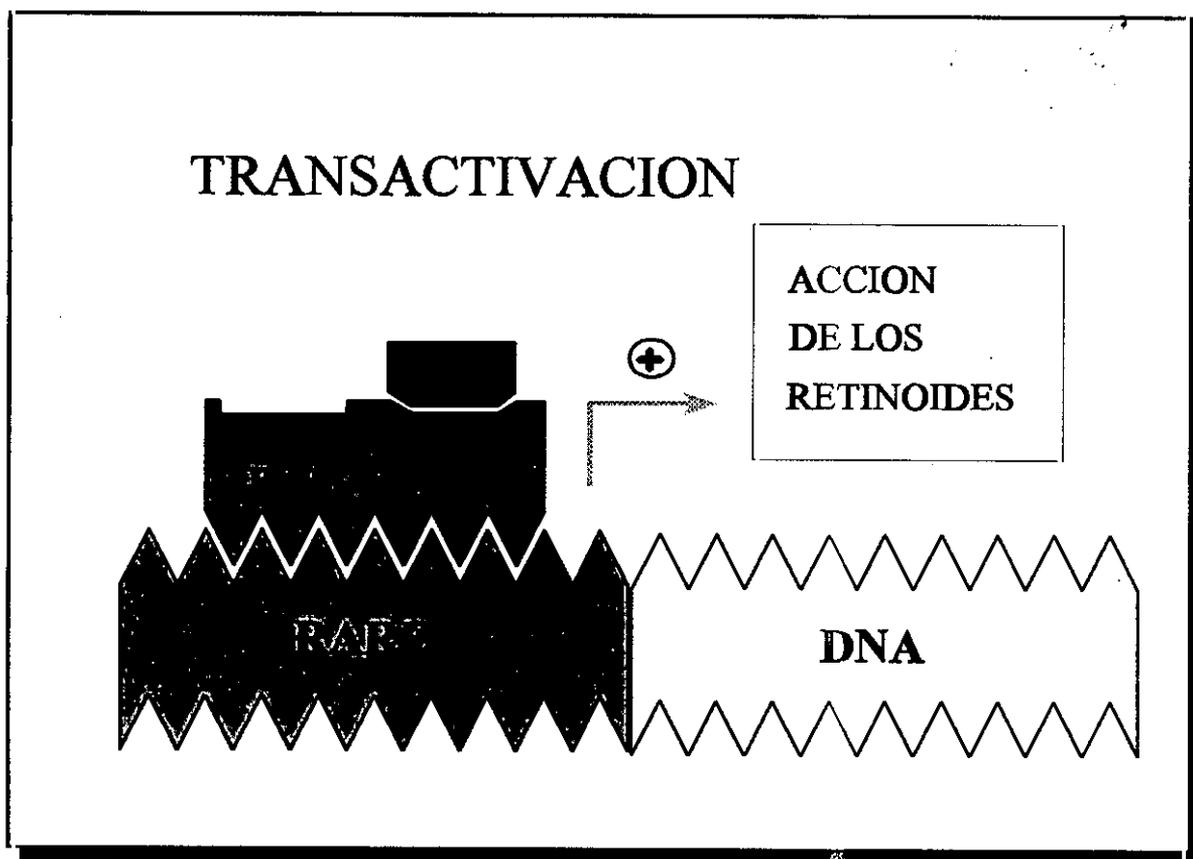
Los datos experimentales demuestran que el tratamiento superficial con retinol es más eficiente que el tratamiento con ácido retinoico, debido a que el retinol muestra una efectividad mayor a ser transportado a la región subcelular correspondiente dentro de las células de la piel (Chen, 1995).

### **Mecanismo de acción**

Los 3 mecanismos conocidos por los que, los receptores nucleares de retinoides modulan la expresión génica son:

#### **1. Transactivación a través de la unión a RAREs en los promotores de los genes diana**

Diferentes genes han mostrado ser directamente regulados por ácido retinoico debido a la existencia de RAREs en sus promotores. De éstos los mejor caracterizados en la piel humana son CRABP II, CRBP y la keratina 6 (Fisher, 1995).



**Figura 6. Mecanismo de transactivación en la piel**

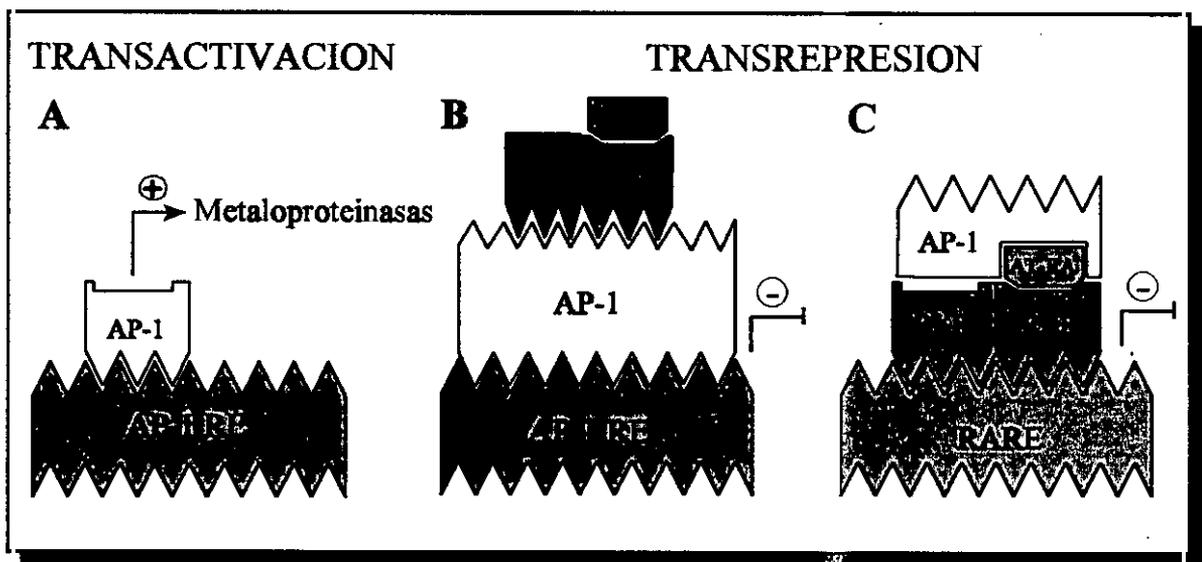
El heterodímero formado por RAR $\gamma$  y RXR $\alpha$  se une a los RAREs sobre las regiones promotoras de los genes que van a regular. La unión de ácido retinoico a RAR $\gamma$  activa la formación del heterodímero RXR-RAR que estimula la transcripción génica (proceso conocido como transactivación) (Figura 6).

## **2.- Transrepresión.**

Este mecanismo involucra la interacción entre receptores de retinoides RAR y los componentes de AP-1 que producen la regulación en la expresión de diversos genes (Pfahl, 1993).

Al igual que la transactivación, la transrepresión también es dependiente de ácido retinoico y es un proceso muy importante en la respuesta cutánea a la radiación solar. La exposición prolongada de la piel a la radiación ultravioleta (UV) es capaz de provocar el envejecimiento temprano de la piel (Kligman, 1986), manifestándose en la aparición de arrugas,

disminución de la elasticidad cutánea y oscurecimiento de la piel. El daño principal es la destrucción de la matriz extracelular de la dermis debido al acúmulo de metaloproteinasas (Fisher, 1996a). Los promotores de las metaloproteinasas contienen elementos de respuesta a AP-1, que son necesarios para su transcripción génica (Figura 7A). La exposición de la piel humana a pequeñas dosis de radiación UV activa el factor AP-1 e induce la expresión de metaloproteinasas nuevas (transactivación) (Figura 7A) que volverán a producir sus efectos adversos sobre la piel; este daño no es completamente reparado resultando en la formación de cicatrices que se irán acumulando llegando a producir el fotoenvejecimiento cutáneo.



**Figura 7. A: el mecanismo de transactivación regula la inducción de metaloproteinasas que provocan el envejecimiento de la piel. B: la transrepresión produce la inhibición de la inducción de metaloproteinasas mediante el bloqueo del sistema AP-1 RE/AP-1. C: la transrepresión mediada por AP-1 también controla la inhibición de los genes regulados por ácido retinoico.**

El tratamiento con ácido retinoico o con retinol de la piel humana bloquea mediante el mecanismo de transrepresión la activación de AP-1 (Figura 7B) no llegando a inducir la expresión de las metaloproteinasas. Por tanto, el retinol y el ácido retinoico son agentes muy importantes en la prevención de las alteraciones cutáneas (Fisher, 1996b). AP-1 es capaz de regular la transcripción de muchos genes que participan en la regulación del crecimiento, diferenciación y respuesta a estrés. La disregulación de AP-1 está asociada con

transformaciones tumorales, enfermedades inflamatorias y fotoenvejecimiento prematuro de la piel.

Como se indica en la figura 7C, el mecanismo de transrepresión también regula la transcripción de los genes que son inducidos por ácido retinoico, cuando los receptores de retinoides interaccionan con el factor de transcripción AP-1.

### 3.- Competición con otro receptor nuclear

El tercer mecanismo de regulación génica, consiste en la competición de RAR y otro tipo de receptor nuclear para la heterodimerización con RXR.

RXR $\alpha$  funciona también en la piel como una pareja heterodimérica con otros miembros de la superfamilia de los receptores esteroideos (R) como son los de la vitamina D y los de las hormonas esteroideas. La interacción de RXR con esos receptores nucleares provoca la pérdida de unión por competición de RXR con RAR. Este complejo nuevo formado se une a elementos de respuesta de hormonas específicas (HRE) en los genes diana. La unión de ligandos (L) (vitamina D y hormonas esteroideas) conocidos a esos receptores estimula el mecanismo de transactivación por la unión de 9cis RA a RXR $\alpha$ .



Figura 8. Mecanismo de competición.

### II.1.4.5.- EN EL SISTEMA INMUNE

#### II.1.4.5.1.-INFLUENCIA DE LOS RETINOIDES EN LA CÉLULA T

El ácido retinoico controla la diferenciación de varios tipos celulares, aunque los mecanismos implicados en el desarrollo de la célula T todavía no se han dilucidado plenamente. Las múltiples etapas del desarrollo de los timocitos a linfocitos T maduros están marcadas por: la adquisición de un fenotipo de célula madura, su proliferación y el rescate selectivo de determinados timocitos de la muerte celular.

Se ha comprobado como el ácido retinoico inhibe la maduración tímica, manteniendo a los timocitos en un estadio de inmadurez caracterizado por el fenotipo CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (Meco, 1994). Es decir, la supervivencia selectiva, la muerte celular y la conversión fenotípica son eventos que pueden estar regulados muy finamente por estímulos extracelulares como el ácido retinoico (que puede controlar los procesos morfogénéticos y la diferenciación; Maden, 1991).

A pesar de la influencia teratogénica del ácido retinoico sobre el desarrollo tímico en humanos y en roedores "in vivo" (Cohen, 1987; Shenefelt, 1972), su papel en la diferenciación de la línea linfóide T aún no ha sido suficientemente establecido, aunque cada vez se están encontrando más evidencias del papel del ácido retinoico en el desarrollo tímico:

- Se ha demostrado la expresión de los genes RAR $\alpha$  y RAR $\gamma$  en células estromales del timo, y en células linfoides (precursores tímicos doble negativos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>).
- La adición de ácido retinoico a células estromales tímicas doble negativas (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) produce una reducción significativa de los timocitos doble positivos (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). Esta reducción en la maduración de las células doble positivas causado por el ácido retinoico puede también reflejarse en su capacidad de reducir una fuente de células en expansión "in vivo" y proporcionar así un mecanismo de regulación del número de células viables para la subsiguiente selección.
- El proceso de maduración tímica también puede ser regulado por ácido retinoico debido a una inhibición de la apoptosis tímica inducida a través de CD3 (Iwata, 1992), así, el control

fisiológico del balance proliferación/apoptosis por el ácido retinoico minimizaría la expansión clonal aberrante sin comprometer la eficacia de la misma.

La desregulación de estos procesos sería responsable de los efectos teratogénicos de los retinoides resultando en hipoplasia tímica asociada con deplección tímica y deterioro del desarrollo y funcionalismo celular de la línea T (Cohen, 1987; Shenefelt, 1972).

### **Activación de las células de estirpe T por retinoides**

Se ha demostrado que los retinoides pueden ser cofactores importantes en la activación de células de linaje T (Garbe, 1992). Sobre timocitos humanos se ha visto que el ácido retinoico mejora la respuesta proliferativa mediante un incremento de la expresión del receptor de la IL-2, que aumentaría la proliferación celular vía IL-2/IL-2R (Sidell, 1988). Aparentemente, el ácido retinoico incrementa la expresión del receptor de la IL-2 sobre timoblastos pero no sobre blastos de linfocitos periféricos. Estas diferencias, junto con la observación que los timoblastos han reducido generalmente su respuesta proliferativa a IL-2 cuando se comparan con blastos de linfocitos periféricos, indican una diferencia fundamental en la regulación de los receptores de IL-2 y la utilización de la IL-2 por los linfoblastos derivados de los dos compartimentos. En ambos casos las células que proliferaron fueron predominantemente CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>, lo que concuerda con los datos que demuestran que son las células CD4 las que producen principalmente la IL-2 durante la estimulación inmune, perdiendo rápidamente la capacidad de responder a IL-2, quizás para limitar su propio crecimiento (Gullberg, 1986).

Se ha demostrado que el ácido retinoico aumenta la expresión de las dos cadenas inducibles del receptor de la IL-2: IL-2R $\alpha$  e IL-2R $\beta$ . En la cadena IL-2R $\alpha$  se observa que el aumento de su expresión se asocia al mantenimiento normal de su estabilidad.

También se ha confirmado el aumento de expresión de proteína y de transcritos de mRNA de la otra cadena inducible del receptor de la IL-2 (IL-2R $\beta$ ) (Robb, 1987; Siegel, 1987).

Estos descubrimientos reforzarían que el papel del ácido retinoico en aumentar la

respuesta proliferativa vendría mediado por la unión de la IL-2 a su receptor biológicamente más activo (de alta afinidad IL-2R $\alpha\beta\gamma$ ) (Sidell, 1993).

Por el contrario, en linfocitos de sangre periférica el ácido retinoico parece no mediar una respuesta proliferativa por no verse afectado el receptor de la IL-2. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que una población de linfoblastos generados de linfocitos T periféricos purificados pueden llegar a ser tan respondedores como los timoblastos cuando se coestimulan con ácido retinoico. Se cree que la pérdida de respuesta de los linfocitos de sangre periférica podría estar mediada por una serie de linfocinas secretadas por las células accesorias que acompañan a las células T, lo que sugiere que la alteración en la expresión de los receptores de interleucinas (no sólo por aumento de expresión del receptor de la IL-2, sino influyendo también, negativamente en el receptor de la IL-6) podría ser el mecanismo principal por el cual el ácido retinoico influye en la respuesta inmune (Tosato, 1988).

#### **II.1.4.5.2.- INFLUENCIA DE LOS RETINOIDES EN LA CELULA B**

La mayoría de los estudios realizados "in vivo" en linfocitos de sangre periférica muestran al ácido retinoico como un factor estimulador del sistema inmune (West, 1994). En cambio, en experimentos "in vitro" empleando linfocitos aislados los resultados pueden ser equívocos. Hay estudios donde se demuestra el papel estimulador (Buck, 1990), o inhibidor (Blomhoff, 1992) de los retinoides sobre los linfocitos B. Estas discordancias pueden deberse a los distintos modelos celulares empleados y a las distintas concentraciones de retinoides utilizadas.

En precursores de las células B (que se caracterizan por un fenotipo CD19<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>sIgM<sup>-</sup>) se han empleado diferentes sistemas de ensayo y condiciones de crecimiento y se ha demostrado el efecto inhibidor del ácido retinoico (Fahlman, 1995), tanto en hombre como en ratón.

Tanto el AT-RA como el 9-cis RA inhiben fuertemente el crecimiento de las células B

precursoras humanas y murinas. Ambas isoformas de ácido retinoico inhiben la síntesis de precursores de células B a pesar de la estimulación con potentes activadores de la proliferación de las células B como son la ionomicina+PMA y la IL-4+IL-7. Hay estudios donde el efecto inhibitorio de los retinoides parece estar mediado por el TGF- $\beta$  ya que se ha comprobado que la inducción del crecimiento de células pre-B por IL-7 se puede inhibir por TGF- $\beta$  (Lee, 1989) e IL-1 $\alpha$  (Suda, 1989).

Bloqueando la acción del TGF- $\beta$  con anticuerpos monoclonales, se comprobó que la adición de ácido retinoico tenía efectos inhibitorios sobre el crecimiento de las pre-B (Jacobsen, 1993), lo que indica una acción directa de los retinoides. Tanto el AT-RA como el 9-cis RA, a concentraciones fisiológicas, tienen efecto sobre células de linaje B humanas y murinas (Blomhoff, 1992).

Durante estos últimos años se sabe que la apoptosis juega un papel importante en el desarrollo funcional del sistema inmune tanto en el compartimento B (Neiman, 1991) como en el T (McConkey, 1990). Descubrimientos recientes demuestran la existencia de procesos apoptóticos espontáneos en los linfocitos B humanos en reposo, que pueden ser inhibidos por dosis fisiológicas de ácido retinoico (Fahlman, 1994).

Tanto los precursores de las células B como los linfocitos B de sangre periférica responden a dosis fisiológicas de ácido retinoico (Ballow, 1996), por lo que el efecto de los retinoides en la inmunidad mediada por linfocitos B puede alterar el balance crecimiento/apoptosis.

Diferentes estudios han demostrado los efectos del ácido retinoico en la inmunidad mediada por anticuerpos (Saxon, 1993). En pacientes con inmunodeficiencia variable común (CVI) se ha comprobado que el tratamiento con ácido retinoico induce en sus células B la expresión de un fenotipo mucho más diferenciado e incluso una corrección parcial en sus niveles de inmunoglobulinas (Zhang, 1997).

Cultivando células B inmortalizadas con el virus de Epstein Barr (EBV) en presencia y ausencia de ácido retinoico durante 6 días, se observó al final del cultivo una disminución de la proliferación en presencia de ácido retinoico del 43% respecto a las células crecidas sin ácido retinoico. El número de linfoblastos B no es el responsable del aumento en la síntesis de inmunoglobulinas en los sobrenadantes de cultivo. Buscando un factor soluble se encontró que la IL-6 estaba aumentada (unas 40 veces) en los sobrenadantes de las líneas EBV (Tosato, 1988) que se habían cultivado con ácido retinoico respecto a las líneas control.

Utilizando linfocitos B procedentes de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que fueron estimuladas con SAC (*Staphylococcus aureus* de la cepa Cowan I, que es un mitógeno de las células B) se observó un aumento en la producción de IgG de unas 16 veces al añadir diferentes retinoides (retinol y ácido retinoico) a una dosis óptima, no observándose ningún efecto en la producción de otras inmunoglobulinas (IgA e IgM) (Wang, 1993a). Por el contrario, utilizando linfocitos B procedentes de sangre de cordón (CBMC) estimulados igualmente con SAC se observa un aumento en la síntesis de IgM de unas 6 veces al añadir retinoides respecto al cultivo control (Wang, 1993b).

Estos resultados concuerdan con otros (Andersson, 1981) donde se muestra que las CBMC producen sólo pequeñas cantidades de IgM (y nada de IgG o IgA) en respuesta a activadores policlonales de células B. Por tanto, es coherente que el ácido retinoico aumente solamente la síntesis de IgM; por el contrario, en PBMC de individuos adultos (que son principalmente células B productoras de IgG), los retinoides incrementan la producción de IgG (Ballou, 1996).

#### **II.1.4.5.3.- INFLUENCIA DE LOS RETINOIDES EN LAS CELULAS NATURAL KILLER**

Se ha comprobado un aumento de la funcionalidad celular NK (citotoxicidad NK) en

mujeres afectadas de cáncer de mama que fueron tratadas con el retinoide sintético N-(4-hidroxifenil) retinamida (4-HPR), respecto a las no tratadas. El efecto producido fue nuevamente sobre la funcionalidad NK no viéndose afectado el número de células NK circulantes (Villa, 1993).

#### **II.1.4.5.4.- INFLUENCIA DE LOS RETINOIDES EN LA PRODUCCION DE INTERLEUCINAS**

La función inmune es regulada en parte por la acción de citocinas. Se han establecido 2 patrones de secreción de citocinas que corresponden con dos tipos funcionales de células T cooperadoras (Th). Los linfocitos Th1 secretan linfocinas que son importantes en la respuesta inmune celular mientras que los linfocitos Th2 secretan linfocinas importantes en la respuesta inmune humoral.

Cada tipo celular regula el crecimiento y la actividad del otro. Así, las células Th2 producen IL-10 (la cual inhibe la producción de IFN- $\gamma$  por células presentadoras de antígeno) e IL-4 (la cual inhibe el desarrollo de las células Th1). Igualmente, las células Th1 producen IFN- $\gamma$  el cual inhibe la proliferación celular de las células Th2 (Cantorna, 1994).

Se sabe que el ácido retinoico puede llegar a regular a nivel transcripcional la producción de interleucinas (Dillehay, 1988), en algunos casos debido a la existencia en los promotores de sus genes de elementos de respuesta a ácido retinoico (RAREs).

Según las circunstancias (el sistema celular empleado, el estado de activación, la concentración de retinoides utilizada) los retinoides podrían estimular la inflamación local (Sidell, 1988), o bien podrían tener efectos anti-inflamatorios. Podrían suprimir las reacciones de hipersensibilidad retardada (Ney, 1987), inhibir la migración de neutrófilos y eosinófilos (Orfanos, 1983) y disminuir la capacidad presentadora de antígenos por células epiteliales (Dupuy, 1989). Todos esos efectos resultarían, al menos en parte, de la capacidad de los

retinoides de inhibir la producción de interleucinas como IL-2 (Felli, 1991) e IFN- $\gamma$  (Abb, 1982) y su capacidad de estimular la producción de la citocina inmunosupresora TGF- $\beta$  (Glick, 1989).

En estados de hipovitaminosis A hay un desplazamiento del equilibrio de las poblaciones celulares Th1-Th2 hacia un exceso de Th1 que conlleva asociado una funcionalidad insuficiente de la población Th2. Estudios realizados en humanos y otros animales han correlacionado el déficit de vitamina A con el incremento en la susceptibilidad a infecciones (West, 1989). Para determinar las bases celulares del defecto funcional asociado a la deficiencia de vitamina A se estudió la alteración en la producción de IFN- $\gamma$ , observándose que a todas las concentraciones de antígeno testadas, las células T deficientes en vitamina A secretan mayor cantidad de IFN- $\gamma$  que los controles normales, no viéndose alterado el patrón de secreción de IL-2 e IL-4. Un mecanismo potencial para la regulación transcripcional del IFN- $\gamma$  vía vitamina A sería a través de los receptores nucleares del ácido retinoico (Petkovich, 1987; Carman, 1991).

Otra citocina regulada a nivel transcripcional es la IL-6 (Zitnik, 1994). Esta citocina tiene un efecto multifuncional sobre una gran variedad de células incluyendo a fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, keratinocitos y linfocitos T y B. Una producción elevada de IL-6 se ha asociado con numerosas enfermedades como: artritis, meningitis, malaria, infección HIV, rechazo trasplante renal, carcinoma renal (Kishimoto, 1989).

Los retinoides no estimulan la producción de IL-6 en fibroblastos estimulados con IL-1 y la producción de IL-6 por fibroblastos hepáticos humanos es inhibida por ácido retinoico.

Se cree que el mecanismo regulador de este sistema sería parecido a los anteriores: el gen de la IL-6 es uno de los muchos genes que son regulados negativamente por ácido retinoico donde se incluiría también el factor de transcripción oct3 (Okazawa, 1991), las keratinas epidermales K5, K6, K14 y K16 (Stellmach, 1991), el receptor de la progesterona (Clarke, 1991), la IL-2 (Felli, 1991) y la colagenasa (Schule, 1991). En la mayoría de los casos esos efectos inhibitorios son mediados transcripcionalmente aunque el mecanismo exacto por el cual

el ácido retinoico inhibe la transcripción génica no se conoce completamente.

#### II.1.4.5.5.- INFLUENCIA DE LOS RETINOIDES EN LA APOPTOSIS

La apoptosis o muerte celular programada está implicada en numerosos procesos biológicos del desarrollo, de la homeostasis y en diversas patologías. La apoptosis se puede producir en los linfocitos tras la estimulación a través del receptor antigénico. Esta estimulación es una señal que normalmente va asociada a la activación linfocítica y a la proliferación celular; sin embargo, en ciertos casos conduce a apoptosis; la apoptosis es uno de los mecanismos implicados en la selección negativa de los timocitos (Smith, 1989), delección periférica de células T maduras (Kawabe, 1991) y pérdida de células T no infectadas en la patología del SIDA (Meyaard, 1992).

La apoptosis en células T ocurre mediante la inducción de la expresión de dos moléculas, Fas (CD95) y FasL (Ligando del Fas) los cuales deben de interaccionar para que se transduzca la señal apoptótica al interior celular (Ju, 1995). Se ha encontrado que ambas moléculas se inducen en las 4 primeras horas tras la activación celular y que la apoptosis puede llegar a ser bloqueada por inhibición competitiva de FasL. El mecanismo molecular por el cual se inhibe la apoptosis implica al 9-*cis* RA que es capaz de inhibir la expresión de FasL tras su activación (Yang, 1993); sin embargo, los retinoides no parecen tener ningún efecto significativo sobre la expresión de Fas.

Aunque el ácido 9-*cis* retinoico inhibe la expresión de FasL a nivel de mRNA y de proteína no se ha probado que esto ocurra a nivel de la transcripción. El análisis de las regiones promotoras de Fas y FasL no revela la presencia de ningún elemento de respuesta a ácido retinoico (RARE) lo cual cierra una de las posibles explicaciones. Se puede pensar también en la existencia de algún factor de transcripción tipo Myc-Max (Bissonnette, 1994) o nur77a (Woronicz, 1994) que forme heterodímeros con RXR (Forman, 1995) participando en la

inestabilidad de los mensajeros de FasL.

En linfocitos B humanos también se han descrito procesos apoptóticos, que pueden (como en la línea T) verse inhibidos por dosis fisiológicas de ácido retinoico.

## **II.1.5.- USO TERAPEUTICO DE LOS RETINOIDES**

### **II.1.5.1.- ENFERMEDADES DERMATOLÓGICAS**

La importancia del retinol (Vitamina A) en una serie de procesos biológicos: el crecimiento, la regulación, la diferenciación y la proliferación de tejidos epiteliales, el mantenimiento de las funciones visuales y su papel en la reproducción se conoce desde hace mucho tiempo (Wilson, 1953; Sommer, 1983; Bloem, 1990). El uso del retinol en el tratamiento de enfermedades dermatológicas se introdujo hace más de 40 años (Keddie, 1948), pero los numerosos efectos secundarios hicieron que su empleo quedara en desuso. La síntesis química de análogos del retinol, ha permitido retomar esta vía de tratamiento; así el isotretinoín se ha utilizado en el tratamiento de casos graves de acné, mientras que otros derivados aromáticos de segunda generación tales como el etretinato y el acitretin, se han utilizado en el tratamiento de psoriasis severa y en ciertas dermatosis (Larsen, 1992).

Los retinoides antagonistas de AP-1 (retinoides de última generación) son hoy en día la terapia más prometedora para la curación de las diversas enfermedades cutáneas.

La activación celular del sistema inmune y los procesos inflamatorios de la piel son síntomas comunes a muchas patologías de la piel que en algunos casos están mediados por la expresión de distintas citocinas inflamatorias que se regulan mediante los factores de transcripción AP-1 y Nf-kB. Los retinoides actúan, como en el caso de los corticoesteroides, inhibiendo los factores AP-1 mediante el mecanismo de transrepresión (Saaticioglu, 1994). Por tanto, los retinoides sintéticos pueden llegar a ser unos agentes terapéuticos muy útiles en distintos procesos inflamatorios y proliferativos con menores efectos secundarios que los

retinoides convencionales.

### **II.1.5.2.- CANCER**

Hoy en día, en la terapia contra el cáncer se están utilizando agentes químicos que intervienen en las distintas etapas del proceso canceroso, para ello, se han diseñado nuevas estrategias con diferentes compuestos (entre los que destacan los retinoides) que han mostrado su eficacia (Greenwald, 1995).

Los retinoides son un nuevo agente quimiopreventivo que actualmente está alcanzado cierta importancia clínica (Hong, 1995). Desde hace tiempo se conoce la estrecha relación existente entre vitamina A y desarrollo de cancer; el déficit de vitamina A en animales experimentales se relaciona directamente con una tasa elevada de distintos procesos tumorales debido, en parte, a su mayor sensibilidad a agentes carcinogénicos. Esto refleja la gran importancia que tienen los niveles fisiológicos de retinoides para hacer frente a los procesos malignos (Lotan, 1996).

En modelos experimentales de carcinogénesis se ha mostrado la eficacia de los retinoides en la prevención del desarrollo de cancer de piel, cavidad bucal, pulmones, glándulas mamarias, próstata, vejiga, hígado y páncreas. Ensayos clínicos efectuados en humanos han mostrado también su efecto en cáncer del tracto digestivo, piel, mama y ovarios (De Palo, 1995).

A continuación se presentan algunas patologías cancerosas donde también se ha mostrado un efecto beneficioso del tratamiento con diferentes retinoides:

#### **II.1.5.2.1.- LEUCEMIAS**

Desde hace tiempo se sabe que el ácido retinoico puede causar diferenciación "in vitro" de células leucémicas. Las células leucémicas promielocíticas (HL-60) se dividen continuamente y permanecen indiferenciadas en cultivo, como consecuencia de la adición del ácido retinoico

al cultivo, paran de dividirse y empiezan a desarrollar las características de células blancas maduras (granulocitos) (Takahashi, 1991).

Además, ensayos clínicos en pacientes con leucemia promielocítica aguda mostraron una respuesta adecuada al tratamiento con dosis altas de AT-RA, llegando incluso a un estado de remisión completa (Warrell, 1991).

#### **II.1.5.2.2.- SARCOMA DE KAPOSI**

El Sarcoma de Kaposi (SK) es un tumor poco corriente de origen mesenquimático que hoy en día es el tumor más frecuente en individuos infectados con el HIV.

El mecanismo preciso que conduce a la aparición de la enfermedad no se conoce, pero se ha observado que la proliferación "in vitro" de las células con forma de huso del SK es dependiente de varias citocinas y factores de crecimiento como son IL-1 $\beta$ , IL-6, PDGF y TNF- $\alpha$ , las cuales funcionan como moduladores autocrinos y paracrinos.

Se ha demostrado que las células en forma de huso del SK expresan el receptor nuclear RAR $\alpha$  y por tanto son respondedoras a retinoides en cultivo, mostrando un efecto anti-proliferativo a concentraciones bajas de retinoides. La disminución de la tasa de crecimiento de las células tratadas con ácido retinoico va también acompañada de cambios morfológicos en las células y en su adhesividad, sugiriendo que el ácido retinoico está implicado en la alteración de la diferenciación de las células del SK (Guo, 1995).

#### **II.1.5.2.3.- CARCINOMA DE CABEZA Y CUELLO**

La patogénesis del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) es completamente desconocida. Se han propuesto distintas anomalías genéticas para explicar la transformación de estas células en células tumorales: a) alteraciones en oncogenes específicos (myc) (Field, 1989), b) alteraciones en genes supresores de tumor como p53 (Boyle, 1993), c)

cambios citogenéticos que involucran a distintos cromosomas (3, 11, 15, 17) (Nawroz, 1994) y d) modificaciones de proteínas del ciclo celular (Callender, 1994).

El mecanismo primario que interviene en el mantenimiento de las células CCECC es la activación de la transcripción de los genes TGF- $\alpha$  y EGFR, y se ha mostrado que TGF- $\alpha$  y EGFR son reprimidos en su expresión tanto en tejido fresco como en líneas celulares procedentes de pacientes con CCECC por el ácido retinoico.

La transcripción de gen de TGF- $\alpha$  se redujo en un 93% y la de EGFR en un 72% en una línea celular de CCECC tras el tratamiento con ácido retinoico. Por lo tanto, estos resultados podrían explicar el efecto clínico observado del ácido retinoico sobre lesiones premalignas y su influencia en tumores secundarios en pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Grandis, 1996).

### **II.1.5.3.- INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS**

#### **II.1.5.3.1.- INMUNODEFICIENCIA COMUN VARIABLE**

La inmunodeficiencia común variable (ICV) es la inmunodeficiencia primaria más común en adultos (Rosen, 1992). Las manifestaciones clínicas más frecuentes incluyen infecciones pulmonares recurrentes, malabsorción, enfermedades autoinmunes y un incremento en la incidencia de enfermedades neoplásicas como linfomas, carcinoma gástrico y cancer de piel.

El principal defecto de la función inmune de estos pacientes es una marcada reducción de la producción de inmunoglobulinas que puede estar acompañada con un número normal o bien reducido de células B. Se cree que el defecto molecular en los pacientes con ICV es un fallo en la diferenciación de la línea B aunque aproximadamente el 50% de los pacientes diagnosticados de ICV también manifiestan alteraciones en la inmunidad celular: aumento de la actividad supresora, disminución en la producción de interleucinas (IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ ), respuesta a mitógenos deficiente y funcionalidad disminuida de las células NK.

Se han estudiado los efectos del ácido retinoico en la diferenciación de las células B

empleando hibridomas B procedentes de células de individuos con ICV. La baja producción de IgM respecto a hibridomas de individuos normales se corrigió con el tratamiento de ácido retinoico, que inducía un aumento en la producción de IgM entorno a 15 veces.

En sangre periférica los datos más relevantes del tratamiento con ácido retinoico son la rápida disminución de los niveles de IL-6 (altos niveles de IL-6 son característicos de ICV) y la mejora en la diferenciación de las células B de los pacientes diagnosticados de ICV (Saxon, 1993):

La disminución en los niveles de IL-6 podría ser el resultado del efecto del ácido 13 cis retinoico sobre los monocitos y macrófagos que son la principal fuente de IL-6 en ICV. Esta posibilidad se refuerza por estudios recientes que muestran que el ácido retinoico puede alterar la diferenciación y activación de células de la serie mieloide (Douer, 1982).

#### **II.1.5.3.2. SINDROME PAPILLON-LEFEVRE**

El síndrome de Papillon-Lefèvre (SPL) es una enfermedad de herencia autosómica recesiva con una prevalencia estimada de 1 a 4 casos por millón en la población y clínicamente se caracteriza por la conjunción de hiperqueratosis palmoplantar en manos y pies, destrucción de las estructuras dentarias deciduas, y posteriormente, también de la dentición definitiva (Preus, 1987); así mismo, los pacientes con SPL tienen una elevada susceptibilidad a padecer infecciones, sobre todo cutáneas aunque también puede ser de tipo sistémico, como se ha observado en el 20-25% de los casos (Haneke, 1975). Este síndrome fue descrito en 1924 por Papillon y Lefèvre (Papillon MM., Lefèvre, 1924) y aunque los orígenes de su patología son desconocidos, se pueden deber a algún tipo de factor genético, ya que es relativamente frecuente encontrar varios hermanos afectados dentro de la misma familia y se ha observado consanguinidad en los padres de estos pacientes en el 33% de los casos (Haneke, 1979).

Antes de la utilización de retinoides en el tratamiento del SPL, la única terapia que se

utilizaba era la extracción de las piezas dentarias infectadas bajo cobertura antibiótica y el uso tópico de esteroides, que aún se sigue aplicando para mejorar el estado epitelial y aliviar los síntomas de modo independiente (Borroni, 1985).

Debido a las manifestaciones cutáneas del Síndrome Papillon-Lefèvre (que muchas veces se confunden con psoriasis) varios pacientes se han tratados con retinoides. Se han descrito casos del tratamiento más o menos eficaz con isotretinoin (Nguyen, 1986), etretinato (Bergman, 1988; Driban, 1988; Gelmeti, 1989) y acitretin (Nazzaro, 1988), que actúan disminuyendo las erupciones cutáneas y la inflamación de la gíngiva dentaria, llegando a salvarse en algún caso los dientes. No obstante, estas drogas no tienen siempre el resultado deseado y pueden tener efectos secundarios.

#### **II.1.5.4.- INMUNODEFICIENCIAS SECUNDARIAS**

##### **II.1.5.4.1.- VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA**

Una de las principales vías de infección del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) es la transmisión vertical de la madre al feto (tasa de transmisión entre el 10 al 40%). Existen factores de riesgo asociados como son: los partos prematuros, el orden de nacimiento, los niveles bajos de células T CD4<sup>+</sup> maternas y la malnutrición (Boylan, 1991).

La vitamina A es un factor nutricional importante debido al efecto estimulador que tiene sobre el sistema inmune ayudando a mantener la integridad de la superficie de las mucosas. Embarazo e infección HIV son factores de riesgo para individuos deficientes en vitamina A (Semba, 1993). Las consecuencias de un aporte reducido de vitamina A durante la infección HIV incluye una disminución de la inmunidad, un incremento de la progresión a SIDA y un aumento en la mortalidad infantil (Tang, 1993).

En individuos HIV la deficiencia de la vitamina A es relativamente común durante la infección, los niveles séricos caen durante la enfermedad debido a una disminución de la

absorción de la vitamina A procedente de la dieta (bien sea debido a diarrea o a la presencia de patógenos intestinales), produciéndose a su vez la disminución en la movilización de las reservas hepáticas de retinol durante la respuesta de fase aguda, acelerando por tanto su utilización por tejidos diana e incrementando la pérdida de vitamina A a través de la orina (Stephensen, 1993). Los individuos adultos infectados con HIV que muestran déficit de vitamina A ( $< 1,05 \mu\text{M}$ ) mostraron 6 veces más riesgo de muerte que los pacientes infectados que no mantenían esa deficiencia (Semba, 1993a).

#### II.1.5.4.2.- MALNUTRICION

El alto nivel de mortalidad y de enfermedades infecciosas asociado a poblaciones con déficit de vitamina A, ha hecho que esta vitamina sea conocida por su efecto anti-infeccioso. Aunque el déficit de vitamina A ha desaparecido prácticamente en los países desarrollados, los niños con una deficiencia media de vitamina A son más susceptibles a diarrea, enfermedades respiratorias (Bloem, 1990) y tienen unas tasas mayores de mortalidad en comparación con los individuos con un aporte adecuado de vitamina A.

A nivel inmunológico la malnutrición afecta al peso y a la morfología de los órganos linfoides, lo que unido a una deficiencia adicional de vitamina A, tiene efectos sinérgicos conduciendo a una atrofia severa del bazo y timo que disminuye el número de linfocitos y provoca una producción defectuosa de anticuerpos frente a antígenos virales o bacterianos (Ahmed, 1991). También se han observado anomalías en las subpoblaciones celulares T en individuos con aporte insuficiente de vitamina A ( $< 1,05 \mu\text{M}$ ). El estudio mostró principalmente que niños hipovitaminosis-A tienen una proporción de linfocitos T CD4 vírgenes ( $\text{CD4}^+\text{CD45RA}^+$ ) muy reducida respecto a niños normales.

El aporte de la vitamina A produjo una reversión de las anomalías, la relación CD4/CD8 aumentó a 1,32 (respecto a un cociente en individuos normales de 1,3) y el porcentaje

de las células CD4 (37%) se aproximó al de los niños con aporte adecuado de vitamina A (40%). Por lo tanto, la vitamina A puede modular la diferenciación de las células CD4 (Ross, 1992).

El comportamiento celular B también se ve afectado por la hipovitaminosis-A: en niños con déficit de vitamina A se observó una producción disminuida de IgG específica tras la vacunación con toxoide tetánico. Esta producción de IgG recuperaba los niveles normales tras el tratamiento con ácido retinoico (Semba, 1993b).

## II.2.- ACTIVACION DEL LINFOCITO T

### II.2.1.- MECANISMO DE LA ACTIVACION DEL LINFOCITO T

El sistema inmune proporciona al organismo un mecanismo dinámico y flexible para responder específicamente a una amplia gama de antígenos (Ag) gracias a la existencia de dos componentes celulares específicos: los linfocitos T y B, responsables, respectivamente, de lo que clásicamente se ha denominado como inmunidad celular y humoral, y dotados ambos de receptores específicos distribuidos clonalmente. Se considera que el inicio del programa de activación de la célula T requiere dos estímulos:

a) el estímulo crítico residiría en el adecuado contacto del Ag con el receptor de la célula T (TCR/CD3). Este contacto implica la presentación de determinantes antigénicos en un bolsillo de la molécula del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) situada sobre la célula presentadora de Ag (APC) (Schwartz, 1985). La interacción del TCR con su ligando fisiológico (Ag), en un contexto MHC apropiado, iniciará la activación celular con la formación subsiguiente de segundos mensajeros. Estos afectarán finalmente a mecanismos de regulación génica y culminarán con la división celular, además de darse la ejecución de funciones efectoras (lisis específica de células blanco por parte de las células T citotóxicas o CTL) o reguladoras (liberación de citocinas inmunoreguladoras por el linfocito T cooperador) (Seder, 1994; Carter, 1996). Entre estas citocinas se encuentran la Interleucina 2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-6 y el Interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), entre otras. Estas, a su vez, actuarán bien activando a los linfocitos B (IL-2, IL-4, IL-6), que proliferarán y se diferenciarán en células plasmáticas secretoras de Inmunoglobulinas (Igs), o bien activando a monocitos y macrófagos (IFN- $\gamma$ ) sobre los que inducirán la aparición de receptores para la región Fc de las Igs, aumentando así su capacidad fagocítica específica (Gillis, 1989). Por otra parte la IL-2 controla el crecimiento de los linfocitos T desde los que se ha originado (Meuer, 1984a) y es capaz de inducir sus propios receptores (Depper, 1985), dando lugar así a la proliferación celular autocrina y paracrina.

b) El segundo grupo de estímulos necesarios para iniciar la proliferación y diferenciación del linfocito T son productos secretados por las APC: IL-1, IL-6, Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ). Ultimamente se concede mayor importancia a las moléculas de contacto entre APC y célula T, destacando especialmente la interacción CD28-B7 (Ward, 1996).

Desde otro punto de vista, se puede considerar el fenómeno de activación linfocitaria dividido en dos etapas: una primera, de adhesión, donde aún no se ha dado el reconocimiento específico del Ag. y otra posterior, específica y dependiente del Ag, en la que se da la transducción de señales hacia el núcleo. En esta etapa, la molécula clave es el complejo TCR/CD3 sobre la célula T.

Durante la primera etapa (de adhesión) intervienen diferentes moléculas que pueden contribuir a la acción celular por diferentes mecanismos: facilitando la interacción célula T-APC (o sea promoviendo su adhesión), modificando la señal transmembrana iniciada vía TCR y/o iniciando sus propios fenómenos de transducción (Weiss, 1989). Entre las moléculas que intervienen en la primera etapa se encuentran CD2, CD4, CD5, CD8, CD11a/CD18, CD28, CD43, CD54. Las parejas CD2/CD58, CD11a/CD18/CD54, CD43/CD54 y CD5/CD72 aumentan la afinidad entre la unión de la célula T y su célula blanco (caso de las CTL) o entre las células T y APC (caso del linfocito T cooperador) (Van de Velde, 1991; Vanderberghe, 1991). CD28, a través de su ligando sobre los linfocitos B (B7), aumenta la adhesión entre éstos y el linfocito T (Koulova, 1991). CD4 y CD8 aumentan también la afinidad de la unión, pero sus ligandos son moléculas MHC: MHC-II para los linfocitos T CD4 (Konig, 1992), y MHC-I para los linfocitos T CD8 (Salter, 1990). Además, CD4 y CD8 al igual que CD2, CD5, CD43 y CD28 pueden transducir señales hacia el interior celular por su relación con la proteína tirosín cinasa p56 lck (Veillete, 1988).

Otras moléculas implicadas en fenómenos de activación son CD7, CD26, CD44, CD45, CD69 y HLA-DR. Este grupo de moléculas se caracteriza por tener capacidad mitogénica para

los linfocitos T, bien solas o unidas a otras sustancias capaces de activar la célula T (Carrera, 1988; Dang, 1990; Huet, 1989; Martorell, 1987; Testi, 1989; Odum, 1991).

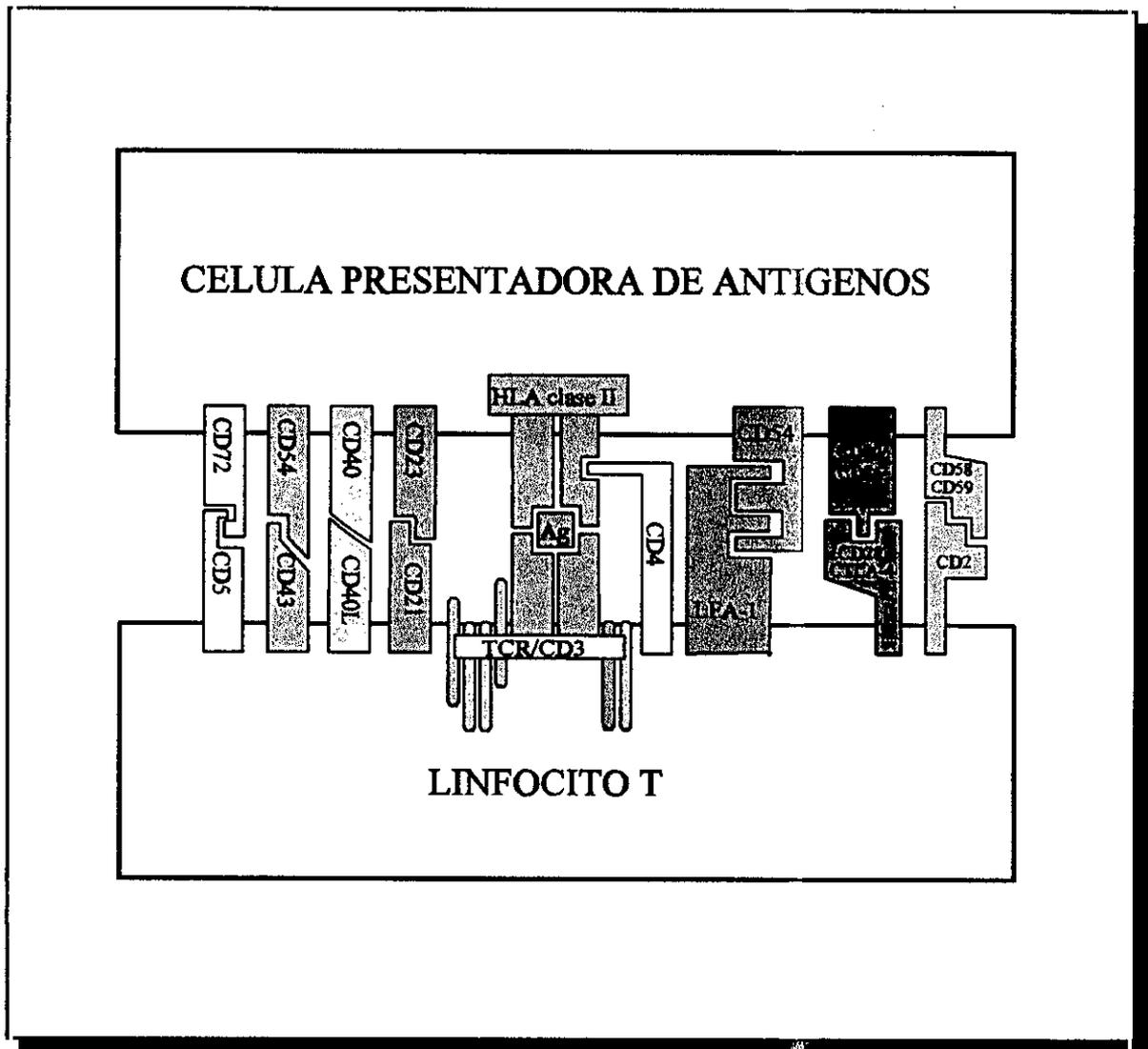


Figura 9. Moléculas implicadas en la adhesión y la transducción de señales durante la activación del linfocito T.

Los datos actuales sugieren que la activación de la célula T es el resultado de una serie de señales liberadas hacia el interior celular tanto vía TCR/CD3 como a través de otras moléculas ; una vez superado el umbral de activación se movilizan proteínas reguladoras de la transcripción de diversos genes que varían según el subtipo celular respondedor.

## II.2.2.- ESTRUCTURA DE MOLECULAS IMPORTANTES EN LA ACTIVACION DE LOS LINFOCITOS T.

De entre todas las moléculas conocidas que intervienen en la activación de la célula T, sólo algunas inducen proliferación celular en linfocitos de sangre periférica. Entre ellas, las mejor estudiadas en humanos son CD3, CD2, CD25 y CD28, cuya estructura bioquímica se expone a continuación.

### II.2.2.1.- TCR/CD3

El receptor para el Ag de los linfocitos T es el complejo formado por dos componentes: uno polimórfico y estructuralmente único para cada clon de células T (TCR), y otro monomórfico, llamado colectivamente CD3.

- El receptor clonotípico (TCR) está formado por dos glicoproteínas unidas por puentes disulfuro y estructuralmente semejantes a las Igs (poseen regiones constantes y variables al igual que éstas). La forma del receptor mayoritaria en los linfocitos T es la formada por una cadena  $\alpha$  (43 kDa) y otra  $\beta$  (49 kDa) (Meuer, 1983). Posteriormente ha sido descrito otro tipo de receptor formado por las cadenas  $\gamma\delta$  (Hass, 1993). Cada uno de estos polipéptidos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) contiene pequeñas regiones intracitoplasmáticas, lo que sugiere poca participación en la transducción directa de señales hacia el interior celular.

- El complejo CD3 está formado, por al menos, tres cadenas polipeptídicas diferentes ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), asociadas no covalentemente con el receptor clonotípico  $\alpha/\beta$  o  $\gamma/\delta$  TCR. Estas proteínas tienen un peso molecular (Pm) entre 16-28 kDa. Las cadenas CD3  $\gamma$  y  $\delta$  contienen sitios extracelulares de glicosilación, no así  $\epsilon$ . Estas tres cadenas, al igual que las cadenas variables componentes del TCR, pertenecen a la familia de las Inmunoglobulinas y se han originado por duplicación génica (Gold, 1987; Tunnacliffe, 1987). Las porciones intracitoplásmicas de las cadenas que componen CD3 son considerablemente más largas que las

de las cadenas que forman el TCR, en relación con el papel en la transducción de señales al citoplasma (Ashwell, 1990).

Las subunidades CD3 $\zeta$  y CD3 $\eta$  pueden formar, entre sí, homo o heterodímeros. Los dímeros  $\zeta\zeta$  y  $\zeta\eta$ , unidos por puentes disulfuro, pertenecen a la familia de moléculas asociadas al receptor para el fragmento Fc de las Igs: existe asociación de la cadena  $\zeta$  con CD16 en células NK (Lanier, 1989) y con Fc $\epsilon$ RI en mastocitos (Orloff, 1990). Es decir, que CD3 $\zeta$  no es un componente específico de los linfocitos T, ya que se expresa también en células NK, ni tampoco lo son CD3 $\delta$  o CD3 $\epsilon$ : se ha encontrado expresión de CD3 $\delta$  y  $\epsilon$  en células NK fetales TCR negativas (Phillips, 1992).

La cadena  $\zeta$  está implicada en la transducción de señales bioquímicas intracelulares (Irving, 1991; Klausner, 1991), y también son capaces de transducción de señal las cadenas  $\eta$  y  $\gamma$ -Fc $\epsilon$ RI (Romeo, 1991). Se ha propuesto que existirán diferentes clases de receptor sobre cualquier célula T debido a la diversificación de dímeros posibles entre las cadenas de CD3. Esto hace probable el que distintas clases de receptor puedan activar a diferentes vías intracelulares (Bauer, 1991).

#### II.2.2.2.- CD2

Es una glicoproteína monomérica de 50 kDa que facilita la adhesión entre la célula T y APC (células T CD4<sup>+</sup> cooperadoras) y entre linfocitos T y células blanco (linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>) (Bierer, 1993). Además CD2 posee un papel de transducción de señal (Hahn, 1993). En conjunto, las funciones de adhesión y transducción de señal favorecen una respuesta más eficiente a través de TCR/CD3, mejorando el contacto célula-célula y proporcionando una señal sinérgica con la estimulación vía TCR/CD3 (Bierer, 1988b; Moingeon, 1989b).

La expresión de CD2 se restringe a células de linaje T: se expresa ya muy tempranamente en la ontogenia (más del 95% de timocitos) y se mantiene virtualmente en todas

las células T maduras y en la mayoría de las células NK (Moingeon, 1989a).

Se han definido tres epítomos en la porción extracelular de la molécula CD2: T11.1, presente en todas las células T y relacionado con la unión a eritrocitos de carnero; es el sitio de unión para LFA-3 (CD58) y CD59. T11.2, presente también en todas las células T, y T11.3, expresado preferentemente en linfocitos T activados (Meuer 1984b). Los ligandos fisiológicos de CD2 son CD58 (Dustin, 1987) glicoproteína de superficie ampliamente distribuida en células endoteliales, epiteliales, células del tejido conjuntivo y en la mayoría de las células sanguíneas (linfocitos T, linfocitos B, granulocitos y eritrocitos) (Springer, 1987), y CD59 proteína leuco y eritrocitaria (Hahn, 1992).

#### II.2.2.3.- CD28

Inicialmente definido por el anticuerpo monoclonal (mAb) 9.3 (Hansen, 1980), CD28 es un homodímero de 89-90 kDa compuesto de dos subunidades de 44 kDa unidas por puentes disulfuro. En sangre periférica son CD28<sup>+</sup> un 80% de los linfocitos T: el 95% de las células CD4<sup>+</sup> son CD28<sup>+</sup>, y aproximadamente, un 50% de las células CD8<sup>+</sup> son CD28<sup>+</sup> (June, 1990b). Además un 5% de los timocitos inmaduros son CD3-CD28<sup>+</sup> (Pierrés, 1990) y a medida que maduran aumentan su expresión de superficie, fenómeno que también se da tras la activación celular T (Turka, 1990).

El ligando fisiológico de CD28 es una molécula denominada B7, que es un Ag temprano de activación de los linfocitos B (Linsley, 1990). También se ha detectado mRNA de B7 en macrófagos, así como B7 de superficie tras la activación de las APC por IFN- $\gamma$  (Freedman, 1991).

#### II.2.2.4.- CD25

Aunque se han descrito fenómenos proliferativos del linfocito T independientes de IL-2

(Laing, 1988), en líneas generales la proliferación de la célula T depende de forma mayoritaria de una adecuada producción de IL-2 y una correcta expresión de su receptor. Las células T al ser activadas por el Ag promueven no sólo su propia proliferación clonal, sino también la de otras células T que son activadas por el mismo Ag u otro relacionado, pero que no producen IL-2 (linfocitos T CD8<sup>+</sup>). Además, promueven la expansión de células previamente estimuladas que expresan bajos niveles de IL-2R de alta afinidad (linfocitos T de memoria) y de células no T que expresan IL-2R como son linfocitos B y timocitos (Minami, 1993).

El receptor de IL-2 es único entre los diversos receptores existentes y puede estar formado por 3 componentes diferentes: la cadena  $\alpha$  (IL-2R $\alpha$ ), la cadena  $\beta$  (IL-2R $\beta$ ) y la cadena  $\gamma$  (IL-2R $\gamma$ ). Los tres genes que codifican para los tres componentes del receptor de la IL-2 ya han sido caracterizados (Taniguchi, 1993).

La expresión del gen IL-2R $\alpha$  no se detecta en células T en reposo produciéndose su inducción tras la activación de la célula T. El gen IL-2R $\beta$  se expresa constitutivamente en células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> y no en células CD4 cooperadoras y es inducido también tras la activación de la célula T. IL-2R $\gamma$  sin embargo se expresa constitutivamente en todas las células linfoides (Takeshita, 1992), la cadena  $\gamma$  es además parte común a otros receptores de citocinas como son: IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 (Matthews, 1995).

En humanos, la expresión de diferentes combinaciones de esos tres componentes produce la generación de varias formas del receptor de la IL-2, mostrando cada uno de ellas diferentes afinidades de unión para la IL-2:

-Receptor de alta afinidad: formado por las tres cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , es la forma que presenta la mayor afinidad por la IL-2 ( $K_d = 10^{-11}$  M).

-Receptor de afinidad intermedia: formado por las cadena  $\beta$  y  $\gamma$  ( $K_d = 10^{-9}$  M)

-Receptor de baja afinidad: formado por la cadena  $\alpha$  ( $K_d = 10^{-8}$  M)

Estudios previos demuestran que las cadenas implicadas en la transmisión de la señal de

la IL-2 al interior celular son las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  (Nelson, 1994; Taniguchi, 1995) quedando claramente demostrado en la inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X (X-SCID) que está originada por mutaciones en la cadena  $\gamma$  (Noguchi, 1993). Esto provoca un fenotipo severo tanto celular como humoral siendo el pronóstico fatal a menos que se produzca un trasplante de médula ósea (Fischer, 1992).

**II.2.3.- CONSECUENCIAS FUNCIONALES EN LA ACTIVACION DE LA CELULA T.****II.2.3.1.- ACTIVACION FISIOLÓGICA A TRAVES DEL COMPLEJO TCR/CD3**

La unión del Ag al TCR/CD3, con la intervención de otras moléculas accesorias, inicia la transducción de señal y lleva a la célula T a su completa activación (expresión de Ags de activación, como CD25, síntesis y secreción de linfocinas por las células T colaboradoras, actividad citolítica en el caso de las CTLs, proliferación y expansión clonal).

Además, de por su ligando fisiológico, el TCR/CD3 puede ser activado por mAbs (Tsoukas, 1985) o por lectinas (PHA, Con A). En general, se acepta que la activación policlonal de los linfocitos T utilizando mAbs anti-CD3 equivale a la activación fisiológica por el Ag presentado por el MHC, que ocurre de forma clonal. Las lectinas actúan también como activadores policlonales, pero uniéndose a diferentes moléculas de superficie, entre las que se encuentran TCR/CD3 y CD2 (Chilson, 1989). Tanto la activación con mAbs como con lectinas requiere que exista un entrecruzamiento del receptor, reflejando así la necesidad de interacciones multivalentes entre el ligando y el complejo TCR/CD3 para conseguir una óptima activación (Manger, 1985).

Además, la capacidad funcional de los linfocitos T depende no solamente del TCR/CD3 sino también de las APC, que desempeñan varias funciones (Geppert, 1990):

- Inmovilización del mAb por la porción Fc de éste sobre la superficie de la APC. Esta función puede ser mimetizada con mAbs anti-TCR/CD3 pegados a plástico o unidos a bolas de Sefarosa. La forma inmovilizada del anticuerpo (Ac) sería análoga a la forma en la que el péptido antigénico, unido al MHC, es inmovilizado en la superficie de las APC cuando es presentado a los linfocitos T. Esto sugiere que la existencia del entrecruzamiento del receptor por el Ag, o por Ac inmovilizados, es importante para iniciar la activación. Alternativamente, la estimulación con ligando inmovilizado, más que con ligandos solubles, puede servir para prevenir la internalización del TCR y potenciar así la duración y magnitud del estímulo.

- Función accesoria. Las células T en reposo son incapaces de producir IL-2 y de proliferar en respuesta a lectinas mitogénicas o a mAbs anti-TCR/CD3 inmovilizados, a no ser que se añada IL-2 exógena (Tsoukas, 1985; Weiss, 1987). Es decir, para activar células T en reposo vía TCR/CD3 se necesita un estímulo adicional, proporcionado por las APC, para la producción de IL-2. Este otro estímulo pueden ser factores solubles o moléculas de superficie que interactúan entre el linfocito T y la APC. Entre los factores solubles se sitúa la IL-1 (Mizel, 1982). En algunos sistemas experimentales, la función accesoria ha sido sustituida por ésteres de forbol (PMA) (Hara, 1985a) o por IL-6 y Ac anti-CD28 (Baroja, 1988).

Como consecuencia de la activación mediada por TCR/CD3 se producen en el linfocito T una serie de eventos inmediatos o tempranos (a los segundos - minutos) y otros tardíos (a las horas-días).

#### II.2.3.1.1.- FENOMENOS TEMPRANOS

La ocupación del TCR da lugar a la activación de una tirosín cinasa, probablemente la p59 fyn, (Cooke, 1991) que activará la PLC por fosforilación (Weiss, 1991). Este fenómeno inicial se ve fuertemente potenciado por la agregación local de los correceptores CD4 (o CD8) y CD45 en las proximidades del TCR, probablemente debido a sus actividades fosforilasa (p56 lck) y fosfatasa (CD45) asociadas (Ledbetter, 1993). La PLC, a su vez, provoca la ruptura del enlace fosfodiéster de los inosíoles bifosfato (IP<sub>2</sub>) originando inosíoles trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG) (Isakov, 1987b). El IP<sub>3</sub> y el IP<sub>4</sub> (metabolito del anterior) dan lugar a un rápido incremento de la concentración intracitoplásmica de Ca<sup>++</sup>, tanto por la liberación desde depósitos intracelulares (Imboden, 1985), como por la entrada desde el exterior celular (Kuno, 1987). Ambos fenómenos parecen deberse a la activación de los canales de Ca<sup>++</sup> por IP<sub>3</sub> y IP<sub>4</sub> (Gardner, 1989a).

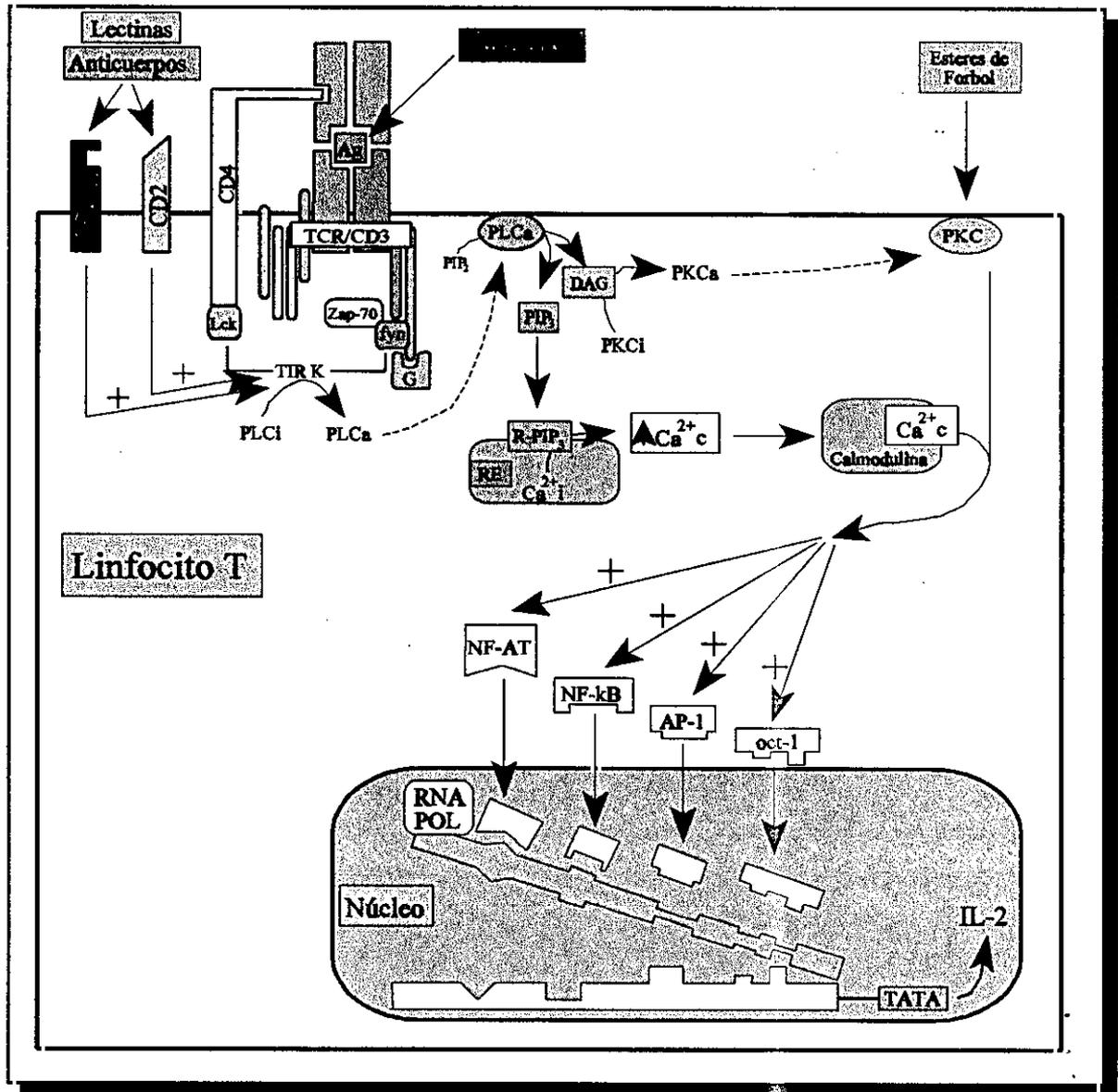


Figura 10. Activación del linfocito T.

El DAG, a su vez, activa una proteína citosólica, la proteína cinasa C (PKC) que se desplaza hacia la membrana donde adquiere su forma activa calcio-dependiente (Berridge, 1989). Estos efectos pueden ser mimetizados por agentes farmacológicos como los Ionóforos de Calcio (que posibilitan la entrada de Ca<sup>++</sup> desde el exterior de la célula) y los ésteres de forbol (análogos del DAG) (Chatila, 1989a). Existen varias subespecies de la PKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ ). Los linfocitos T expresan principalmente las formas  $\alpha$  y  $\beta$ . Es posible que diferentes subespecies de la PKC tengan distintas afinidades de sustrato y medien así diferentes respuestas funcionales (Alexander, 1989).

Además de la PKC (serina-treonina cinasa), existen otros sistemas enzimáticos con actividad tirosina o serina /treonina cinasa implicados en la activación T. Tres tirosín proteína cinasas diferentes han sido implicadas en la transducción de señal a través del complejo TCR/CD3: p56 lck, p59 fyn y ZAP-70.

La p56 lck está sólo presente en linfocitos T y se asocia con las glicoproteínas CD4 y CD8 (Veillette, 1988).

CD8 y CD4 actúan como correceptores debido a la interacción con el propio ligando del TCR: las moléculas de clase I y las de clase II respectivamente (Salter, 1990; König, 1992). En definitiva, el reconocimiento del antígeno presentado por las moléculas de MHC requiere la agregación física del complejo TCR/CD3 con el correspondiente correceptor, siendo esta interacción crucial para la activación de la célula T y para su maduración (Janeway, 1992).

En este complejo que se ha formado, la p56 lck que está asociada a CD4 o CD8 es activada, resultando en la fosforilación de diferentes sustratos incluyendo la isoforma  $\gamma$ -1 de PLC (Weber, 1992). Diferentes experimentos han demostrado la implicación directa de p56 lck en transducción de señal a través del complejo TCR/CD3 (Strauss, 1992).

La p56 lck también se asocia con otras moléculas de membrana además de CD4 y CD8 como son IL-2R (Hatakeyama, 1991) y CD2 (Mariecardine, 1992), esto implicaría posibles funciones en otras vías de activación.

La p59 fyn es otra tirosina proteína cinasa que presenta gran homología con p56 lck, pero que se asocia al complejo TCR/CD3 propiamente dicho (Samelson, 1990). Diferentes estudios han demostrado su papel en transducción de señal a través del complejo TCR/CD3 (Cooke, 1991).

Finalmente, Zap-70 se expresa exclusivamente en células T y NK (Chan, 1992). En células T, Zap-70 se asocia con componentes diferentes del complejo TCR/CD3 como son las cadenas  $\zeta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  de CD3, pero sólo cuando esas moléculas han sido previamente fosforiladas.

Esto sugiere que Zap-70 se activa en último lugar como consecuencia de la actuación previa de otras tirosín cinasas (p56 lck, p59 fyn), (Weiss, 1994). De hecho se ha demostrado recientemente el papel de p56 lck en la translocación y fosforilación de Zap-70 (Iwashima, 1994). En pacientes con déficit de Zap-70 (Arpaia, 1994), se impide la selección de células T CD8<sup>+</sup> pero no de las CD4<sup>+</sup> demostrando por tanto que esta tirosín cinasa está envuelta en los últimos pasos del desarrollo celular T en el timo.

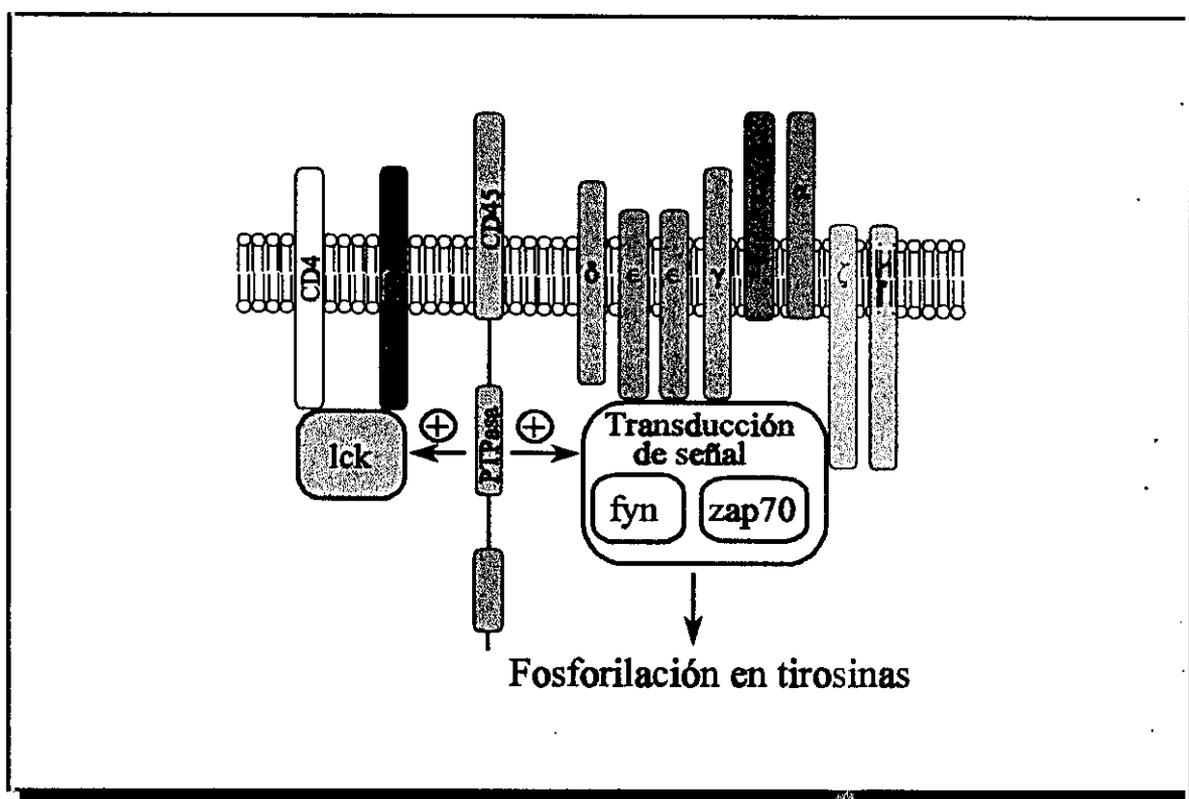
El campo de la transducción de señal a través del receptor antigénico se ha consolidado tras el descubrimiento de los ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) que son motivos de 16 aminoácidos los cuales están presentes: en las distintas subunidades del complejo TCR/CD3, en el receptor de la célula B (BCR), en el receptor para alta afinidad de IgE (FcεRI) y en el receptor para IgG de baja afinidad (CD16). En el complejo TCR/CD3 hay una distribución distinta de secuencias ITAM existiendo un motivo en todas las cadenas excepto la cadena ζ que contiene tres. La funcionalidad de los motivos ITAM es servir como sitios de unión específicos para las proteínas tirosín cinasas Zap-70 y Syc (Chan, 1996).

En la conexión entre TCR y PLC se concede un papel fundamental a las proteínas tirosín cinasas (p56 lck, p59 fyn y Zap-70) aunque no se descarta la intervención de un sistema de proteínas G (capaces de unir GTP/GDP) como intermediario (Cantrell, 1994), no siendo ambos sistemas excluyentes; así, se han descrito proteínas G asociadas a CD45 y p56 lck (Schraven, 1992), y otras implicadas en la activación del linfocito T como p21ras, que se ha demostrado regula la expresión de CD69 (marcador de activación de las células T, D'Ambrosia, 1994).

Considerando que ninguna de las subunidades del CD3 posee intrínsecamente actividad tirosín cinasa, es posible que los dominios intracelulares de CD3 se asocien con una o más tirosina cinasas citoplásmicas. Se sabe que ζ une al TCR/CD3 a diferentes rutas bioquímicas intracelulares (Irving, 1991) y que existe asociación de ζ con una tirosín cinasa, distinta de p59 fyn, que fosforilará a ζ (Chan, 1991); además ζ pertenece también al sistema de proteínas G; es

decir, tiene capacidad para unir nucleótidos guanosina (GTP/GDP); (Peter, 1992). Se puede pensar por tanto, que la interacción de CD3  $\zeta$  con tirosin-quinasas específicas, tirosin-fosfatasa u otras moléculas pueda estar regulada por su posibilidad de unir GTP/GDP. Por otra parte, se ha observado que complejos TCR/CD3 que carecen de  $\zeta$  funcional pueden transducir señal al citoplasma a través de CD3- $\gamma\delta\epsilon$  y originar liberación de IL-2 adecuadamente (Wegener, 1992).

Las fosforilaciones son un mecanismo básico para la modificación de las funciones proteicas en células eucariotas y juega un papel central en la regulación de la función del linfocito T tras su activación vía TCR. Se sabe por diversos trabajos (Chatila, 1988) que un gran número de moléculas de superficie pueden ser sustrato de la PKC: CD3  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD18, CD25, MHC-I y CD43.



**Figura 11. Proceso de transducción de señal mediado por proteínas tirosín cinasas.**

Considerando que la unión del Ag al TCR/CD3 implica también la unión de CD4 a MHC-II sobre las APC, esto activará a p56 lck que a su vez podría fosforilar a  $\zeta$  (Chan, 1996; Dianzani, 1992). Además la activación de la PKC causa fosforilación de la p56, y tanto la p56

lck como p59 fyn son activadas por CD45, molécula de superficie con actividad fosfatasa que también es esencial en la activación T (Mustelin, 1992).

El cómo las fosforilaciones proteicas regulan finalmente la expresión génica no está bien establecido. Las fosforilaciones inducen cambios alostéricos conformacionales y electrostáticos y éstos, a su vez, podrían regular las funciones transcripcionales de diversos factores (Hunter, 1992). Así, se ha propuesto que la fosforilación de CD3 $\gamma$  está implicada en la autoregulación del TCR (Kragel, 1987). También las fosforilaciones de CD3 $\gamma$  pueden alterar o modular la señal transmitida desde TCR, y se sabe que algunas de las proteínas fosforiladas por la PKC son importantes en el proceso necesario para la activación génica (Alexander, 1989), así como que las fosforilaciones en tirosina son indispensables para la liberación final de IL-2 (Taniguchi, 1993; Taniguchi, 1995).

#### **II.2.3.1.2.- FENOMENOS TARDIOS**

La cascada de fenómenos bioquímicos generados tras la estimulación del TCR activa un programa genético para el crecimiento de las células T y realización de sus diferentes funciones. El programa de activación del linfocito T incluye la activación transcripcional de gran número de genes (Kelly, 1995), que se pueden clasificar como tempranos (dentro de las dos primeras horas de contacto con el Ag e incluye la activación transcripcional de protooncogenes y citocinas) y tardíos (días después e incluye activación de genes como los de HLA-DR).

##### **a) PROTOONCOGENES**

Minutos después de la activación del linfocito T se activan oncogenes celulares como c-myc, c-fos, c-jun..., que codifican para proteínas cuya función no es bien conocida en todos los casos pero que probablemente controlen el ciclo celular. Se sabe, por ejemplo, que bloqueando la activación de c-myc se inhibe la entrada de la célula T en la fase de proliferación, y que los productos de c-fos junto con los de c-jun, están implicados en la activación del gen de

la IL-2 (Shibuya, 1992).

#### b) CITOCINAS

Se produce la activación de genes de citocinas: desde la IL-2 a la IL-6, así como del gen de IFN- $\gamma$ . Aunque todas estas citocinas participan en las comunicaciones intercelulares, sólo la IL-2 es responsable de la proliferación autocrina del linfocito T.

Tanto la activación del gen para la IL-2 como el de su receptor IL-2R son un requisito indispensable para la proliferación celular T. Aunque ambos genes son inducidos aproximadamente al mismo tiempo tras el estímulo inicial, hay claras diferencias en los requerimientos de uno y otro en lo que a su inducción se refiere: tanto los ésteres de forbol como los Ionóforos de calcio, separadamente, pueden originar activación del gen de IL-2R $\alpha$ , pero son necesarios ambos tipos de estímulos para la activación transcripcional del gen de la IL-2; además, la IL-2 regula la inducción del gen de su receptor pero no la de su mismo gen, es decir los requerimientos para la producción del receptor de la IL-2 son bastantes menores que para provocar la síntesis de IL-2 que requeriría la señal co-estimuladora a través de CD28 para estabilizar los mensajeros de IL-2 y aumentar el nivel transcripcional de los mismos (Whittington, 1993).

Se han descrito diferentes factores reguladores de la transcripción que se unen a las regiones genómicas correspondientes de las regiones promotora y potenciadora del gen de la IL-2: NF-AT, Oct, NF $\kappa$ B, AP-1, fos y CD28RE (Jain, 1995; Garrity, 1994). La inducción del gen de la IL-2 depende, por tanto de la síntesis, activación y/o translocación al ciclo celular de toda una serie de factores nucleares como resultado final de la cascada bioquímica de activación (Figura 12).

La regulación transcripcional del gen de la IL-2R $\alpha$  necesita solamente una señal, que pueda ser proporcionada por factores muy diversos: Ionóforos de Calcio, ésteres de forbol, mAbs anti-CD3, anti-CD2 ó anti-CD28, IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-2 entre otros (Isakov, 1987b;

Kumagai, 1987; Bagnasco, 1989; Ledbetter, 1990; Lubinski, 1988; Lee, 1987; Depper, 1985). Esto sugiere la existencia de diferentes secuencias reguladoras en el promotor del gen de la IL-2R $\alpha$ , con respecto al de la IL-2, y una regulación menos estricta.

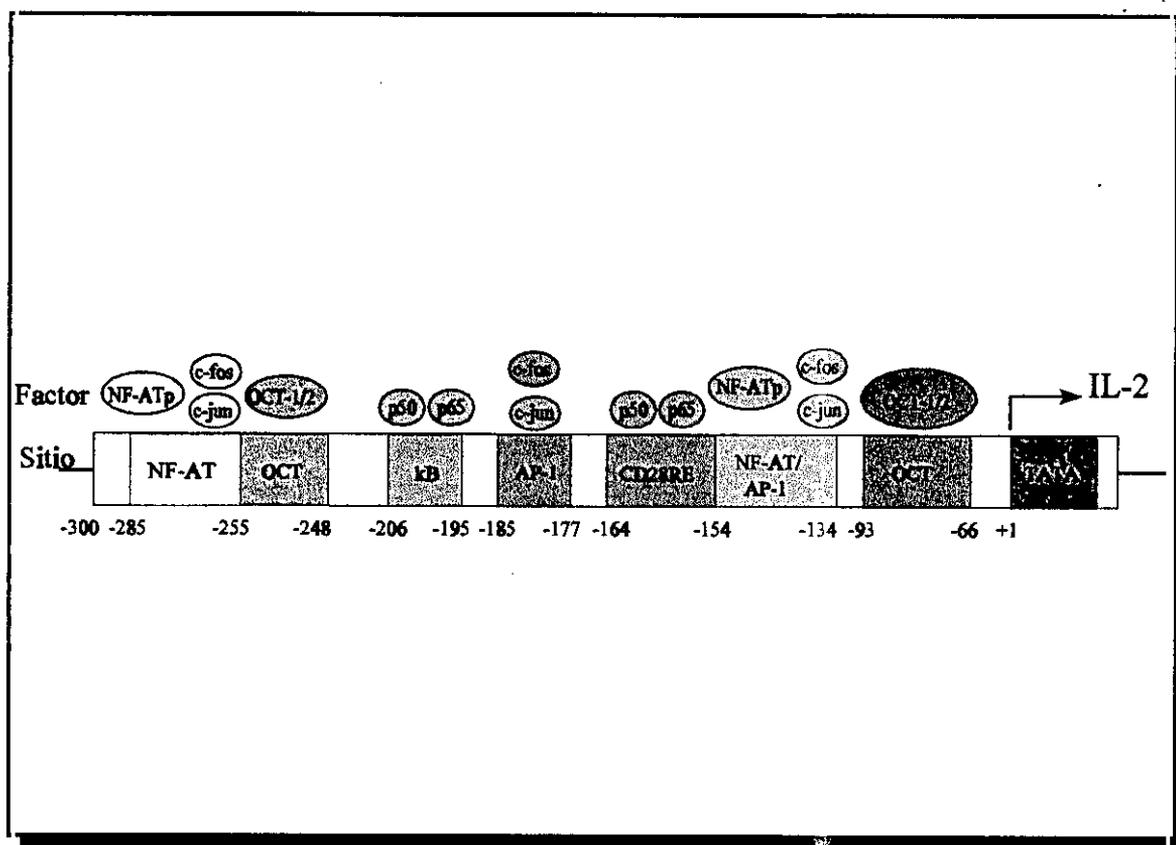


Figura 12. Promotor de la interleucina-2.

### II.2.3.2.- ACTIVACION A TRAVES DE CD2

Ciertas combinaciones de mAbs dirigidas contra CD2 pueden inducir proliferación IL-2 dependiente (Collins, 1994), cooperar en la formación de Ac (Meuer, 1984b) y en la actividad citolítica específica (CTLs) o inespecífica (NK) (Siliciano, 1985), y además, algunas combinaciones de Ac dirigidos contra determinados epítopos (T11.2 + T11.3) pueden originar proliferación en ausencia de células accesorias (Olive, 1986). A diferencia de los mAbs anti-TCR/CD3 solamente algunas combinaciones de mAbs anti-CD2, dirigidas contra determinados

epítomos son capaces de estimular los linfocitos T.

La interacción de los estímulos apropiados con el receptor (CD2) de membrana dan lugar, al igual que vía TCR/CD3, a secreción de IL-2, activación de la PKC (Bagnasco, 1989), apertura de canales de  $Ca^{++}$  (Gardner, 1989b), aumento del  $Ca^{++}$  intracitoplásmico (Alcover, 1986), producción de segundos mensajeros de la vía de los fosfoinositoles (Pantaleo, 1987), y diversas fosforilaciones proteicas incluyendo además la activación de p56 lck y p59 fyn (Carmo, 1993), entre las que se encuentran la fosforilación en tirosina de PLC $\gamma$ 1 (Kanner, 1992). Aunque, se ha comprobado que la activación a través de CD2 da como resultado un patrón de fosforilación de tirosinas y una cinética de fosforilación diferente respecto a cuando se usan anticuerpos anti-CD3 (Hubert, 1993).

La interrelación entre la vía clásica (TCR/CD3) y la de CD2 ha sido ampliamente investigada. Así, líneas celulares T CD3/TCR son incapaces de ser activadas por mAbs dirigidos contra TCR/CD3 ni contra CD2. Si se restaura la expresión de TCR/CD3 se recupera la capacidad de activación de ambas vías (Moretta, 1987). Sin embargo TCR/CD3 no depende de CD2 para su funcionalismo. Es decir, que:

- La expresión del complejo TCR/CD3 es necesaria para la transducción de señal vía CD2 (Alcover, 1988). Aunque no se han analizado todas y cada una de las cadenas del TCR/CD3 se sabe que CD3 $\gamma$  no es imprescindible para la activación de células T a través de CD2 (Pérez-Aciego, 1991) y que CD3 $\zeta$  sí es necesaria para la transducción de señal vía CD2 (Howard, 1992).

- La expresión de CD2 de en superficie no es una condición necesaria para que TCR/CD3 sea funcional (Moingeon, 1988). Esto no excluye el que existan señales aún no caracterizadas que a través de CD2 puedan influenciar la función de TCR/CD3 (Makni, 1991). Así mAbs dirigidos contra TCR/CD3 y CD2 pueden actuar sinérgicamente en la activación T (Bierer, 1988b), y no sólo como resultado de una mayor adhesión intercelular a través de

CD2/LFA-3 (Moingeon, 1991), sino también por señales activas generadas desde CD2 (Bierer, 1990).

La necesidad de expresión de TCR/CD3 sobre la superficie del linfocito T para una función adecuada de CD2 está bien establecida en las células T maduras, pero también se ha descrito que CD2 puede transducir señales de activación (dando lugar a un aumento de calcio intracelular, desarrollo del programa citolítico y expresión de CD25) en células que carecen de TCR/CD3 de superficie (Células NK CD3<sup>-</sup>CD2<sup>+</sup> y timocitos indiferenciados) (Siliciano, 1985; Ohno, 1991). Tal vez, en estas últimas situaciones CD2 medie una señal de activación directamente, ya sea por una vía de transducción diferente a la del TCR/CD3 o por interacción con una molécula aún no conocida que funcione en lugar de los componentes del TCR para activar la maquinaria de transducción. Al menos en el caso de las células NK y en líneas celulares T Jurkat, CD2 utiliza los dímeros  $\zeta\zeta$  para su activación (Howard, 1992).

### II.2.3.3.- ACTIVACION A TRAVES DE CD28

La activación a través del complejo TCR/CD3 es por si misma insuficiente para una óptima producción de IL-2, se sabe que la co estimulación a través de CD28 juega un papel crítico en la activación de la célula T y en la prevención de anergia (Linsley, 1993).

CD28 interacciona con una molécula situada sobre la superficie de las células B activadas que pertenece a la familia B7 (B7-1, CD80; B7-2, CD86) cuya expresión se ve aumentada por la agregación de MHC-II (Koulova, 1991), así como por IFN- $\gamma$  (Freedman, 1991) y por IL-2 e IL-4 (Allison, 1994); mediante esta interacción se contribuye a la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas secretoras de Igs (Damle, 1991). Además, la unión de B7 a CD28 incrementa la producción de mRNA para IL-2 y, subsiguientemente, la proliferación T (Linsley, 1991).

Inicialmente, fue descrita la capacidad comitogénica de mAbs dirigidos contra CD28 y

PHA (Lesslauer, 1986), posteriormente se describió la capacidad comitogénica junto con mAbs anti-TCR/CD3 y otras lectinas (Baroja, 1989), con ésteres de forbol (Hara, 1985b) y con mAbs anti-CD2 (Van Lier, 1988). Su capacidad de aumentar la respuesta proliferativa unido a anti-CD3 o a anti-CD2 no se limita a linfocitos B maduros, sino que se da también en timocitos (Turka, 1990). Sin embargo, la activación a través de CD28 aisladamente no es mitogénica *per se* (no induce liberación de IL-2) a no ser que exista un alto grado de agregación de la molécula (Ledbetter, 1990).

La señal originada desde CD28 sería diferente de la originada desde otras moléculas accesorias como CD5 y CD44, las cuales parecen actuar aumentando las señales transmitidas por el TCR y no originar funciones diferentes de las iniciadas vía TCR/CD3. Es probable que CD28 regule la activación de células T iniciando diferentes cascadas de señales que incluirían la activación p21 ras y de la PI 3-cinasa (Nunes, 1994; Ward, 1993).

Por otra parte la vía iniciada a través del CD28 no parece depender de la modulación del CD3 ni de la del CD2 (Ledbetter, 1990). Y según algunos autores las células T que expresan CD28 no serían capaces de activar al gen de la IL-2 tras la estimulación vía TCR/CD3, a no ser que exista además interacción CD28/B7 (Fraser, 1992).

El CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte Antigen 4) es una molécula homóloga a CD28 pero que sólo se expresa en células T activadas y parece estar implicada en el control de la proliferación de las células T (Waterhouse, 1995; Tivol, 1995). Se ha descrito recientemente que ratones deficientes en CTLA-4 mueren de un desorden linfoproliferativo muy agresivo, más severo incluso que el asociado con el defecto en el ligando del Fas (FasL). La función concreta del CTLA-4 permanece oscura, aunque se sabe que anticuerpos anti-CTLA-4 no coestimulan las células T pero si tienen efecto coestimulador cuando se añaden junto con anticuerpos anti-CD28 (Linsley, 1992). Parece ser, por tanto, que la señal coestimuladora de CD28 en principio sería regulada negativamente por CTLA-4 (Allison, 1995)

### IL.2.3.4.- ACTIVACION A TRAVES DE CD25

Las citocinas son factores reguladores muy potentes de la función celular, siendo muy interesante el mecanismo de transducción de señal a través de los receptores de dichas citocinas. En general, la mayoría de citocinas, interferones y hormonas de crecimiento se unen a sus receptores y activan unas proteínas tirosín cinasas de la familia Janus (más conocidas como Jak) las cuales a su vez fosforilan y activan distintos factores de transcripción conocidos como STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription).

Se conocen al menos cuatro tirosín cinasas directamente implicadas en la señalización a través del receptor de la IL-2: p56 lck, SyK, Jak1 y Jak3 (Karnitz, 1995). Recientemente se ha descubierto que IL-2 e IL-4 al unirse a su receptor inducen la activación de las proteínas tirosín cinasas Janus (Jak1 y Jak3), más concretamente se ha visto que la cadena IL-2R $\beta$  posee un dominio citoplasmático capaz de unir JAK1, y la cadena IL2R $\gamma$  es capaz de unir Jak3 (Taniguchi, 1995). La estimulación con IL-2 provoca la asociación de los dominios citoplásmicos de IL-2R $\beta$  e IL-2R $\gamma$ , esta asociación de cadenas que además aproximaría Jak1 a Jak3 promovería la transmisión de la señal de activación de la IL-2.

Descubrimientos recientes muestran que alteraciones de Jak3 provocan un déficit severo en la activación celular a través del receptor de la IL-2, produciendo al igual que en la cadena IL-2R $\gamma$ , SCID en humanos. Esto demuestra el importante papel de ésta tirosín cinasa en la transmisión de señal a través del receptor de la IL-2 (Macchi, 1995; Russell, 1995) y del resto de receptores de citocinas que contienen la cadena  $\gamma$  como parte del receptor (IL-4, IL-7, IL-9, IL-15).

Tras los eventos tempranos, el proceso de activación continúa con la traslocación de factores nucleares como son : nuclear factor of activated T cells (NFAT), Oct, activating protein-1 (AP-1) y NF $\kappa$ B donde ya en el núcleo se unen sobre secuencias identificadas del promotor de la IL-2 induciendo la transcripción de diversos genes incluido el de la IL-2. (Jain,

1995).

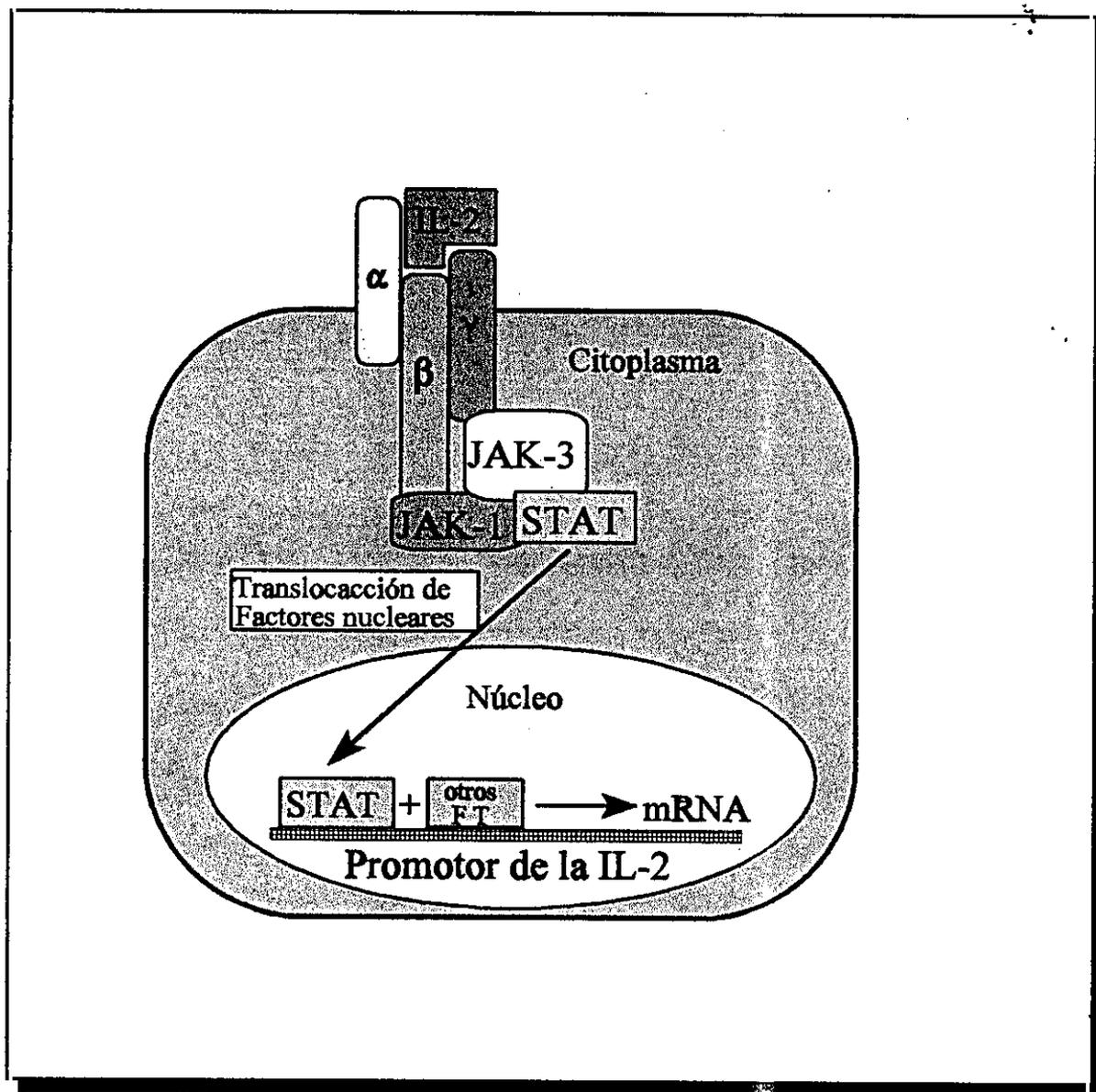


Figura 13. Componentes del receptor de la IL-2 y su mecanismo de acción asociado.

### **II.2.4.- MOLECULAS INMUNOLOGICAS INDUCIDAS O REPRIMIDAS POR RETINOIDES.**

Los retinoides son capaces de inducir o reprimir la transcripción de genes mediante su unión a receptores nucleares específicos (RAR, RXR) los cuales se asocian entre si formando una variedad de dímeros que activan o reprimen la transcripción de diferentes genes diana sobre los que ejercen su función.

La cantidad de genes controlados por los retinoides es amplia debido a su vez a la capacidad de RAR y RXR de controlar la expresión de otros genes que codifican para factores activadores como los genes Hox, los protooncogenes y las proteínas unidoras de octámeros relacionadas con el desarrollo (Boncinelli, 1991; de Groot, 1991; Okazawa, 1991).

La regulación transcripcional producida por RAR y otros receptores nucleares también ocurre mediante la interacción con factores antagonistas o sinérgicos de distintas familias de factores transcripcionales (como AP-1; Schüle, 1991).

#### **II.2.4.1.- REGULACION DE LA TRANSCRIPCION DEL GEN DE LA IL-2.**

La influencia de los RAR en la diferenciación y el crecimiento de la célula T se debe a la capacidad del ácido retinoico de modular la expresión de los genes (humano y murino) que codifican para la IL-2, que es el factor de crecimiento principal de las células T (Felli, 1991).

El promotor de la IL-2 contiene varios elementos de control (factores transcripcionales) que requieren una previa activación para su funcionalidad por parte de la PKC y de las señales liberadas como consecuencia del aumento del calcio intracelular (Fraser, 1993; figura 10).

Se ha descrito que la inhibición mediada por RAR $\alpha$  en la activación del promotor de la IL-2 consiste en la represión del factor de transcripción AP-1, el cual media en las señales de proliferación celular (de Grazia, 1994); a su vez se conoce que los diferentes retinoides sintetizados químicamente tienen capacidades variables de inhibición del factor AP-1 y por tanto

diferente efecto anti-proliferativo (Fanjul, 1994).

La nueva generación de retinoides con efecto anti-AP-1, es decir con capacidad anti-proliferativa son la nueva terapia empleada en una gran variedad de procesos tumorales.

#### **II.2.4.2.- REGULACION DE LA TRANSCRIPCION DEL GEN DEL IFN- $\gamma$ .**

El interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) es una citocina inmunoreguladora de crucial importancia en la respuesta inmune inflamatoria. La expresión de IFN- $\gamma$  está restringida principalmente a linfocitos T activados, y su expresión puede ser regulada por una serie de compuestos como son: la ciclosporina, los corticoesteroides y las prostaglandinas.

También se ha demostrado; la regulación transcripcional negativa del promotor del IFN- $\gamma$  por receptores del ácido retinoico (RAR); se cree que el mecanismo a través del cual el ácido retinoico regula este proceso es vía segunda señal (CD28) y no vía TCR, con lo que en este caso se regula por ácido retinoico el elemento de respuesta a CD28 (CD28 RE); parece, por tanto, que los mecanismos reguladores por parte de los retinoides de la transcripción de estas dos citocinas claves en la respuesta inmunológica son diferentes (Cippitelli, 1996).

#### **II.2.4.3.- REGULACION DE LA TRANSCRIPCION DEL GEN DE LA CADENA $\beta$ DE LFA-1 (CD18).**

Las moléculas de adhesión leucocitarias (LFA-1, Mac1 y p150, 95) son miembros especializados de la familia de las integrinas cuya expresión se restringe exclusivamente a células del sistema inmune. Estas moléculas forman heterodímeros compuestos por una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ . Hasta el momento hay descritas 3 cadenas  $\alpha$  llamadas: CD11a, CD11b, CD11c y una cadena  $\beta$  común conocida como CD18.

La importancia de las integrinas leucocitarias se demuestra en el déficit de adhesión leucocitaria (LAD) donde mutaciones en el gen que codifica para CD18 impiden la formación

del heterodímero disminuyendo o desapareciendo la expresión de las moléculas de adhesión (LFA-1, Mac1 y p150, 95), lo que se traduce en una imposibilidad de las células del sistema inmune para llegar a los sitios de inflamación.

El CD18 está regulado transcripcionalmente por el ácido retinoico. Esto se ha observado en las células HL-60 (línea celular promielocítica humana); y la evidencia experimental se ha confirmado al descubrirse en el promotor del gen del CD18 la presencia de 10 sitios RARE; estas secuencias representan sitios de unión para RAR que por su unión a ácido retinoico activaría la transcripción de esta molécula (Agura, 1992).

#### **II.2.4.4.- REGULACION DE LA TRANSCRIPCION DEL GEN DE LA MOLECULA ICAM-1.**

Las moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3) se unen a las moléculas de superficie leucocitarias (LFA-1). Esta interacción de ICAM-1/LFA-1 modula una gran variedad de respuestas biológicas como por ejemplo el reclutamiento de linfocitos activados y macrófagos a los sitios de infección, el reconocimiento por parte de las células T de antígenos sobre las células presentadoras y la vigilancia inmunológica de los linfocitos T citotóxicos frente a tumores.

ICAM-1 se expresa constitutivamente en pocos tipos celulares, pero su expresión se induce rápidamente en muchas células como consecuencia de estímulos proinflamatorios como son IL-1, TNF, IFN- $\gamma$  y LPS.

El ácido retinoico induce la expresión de ICAM-1; el significado fisiológico de esta inducción se desconoce, sin embargo el ácido retinoico se usa terapéuticamente contra el cancer incrementando la expresión de ICAM-1 lo que hace que las células tumorales sean más susceptibles al ataque por parte del sistema inmune (Webb, 1991).

Al igual que en el caso del CD18, la capacidad del ácido retinoico de incrementar los

niveles de mRNA de ICAM-1 implican la existencia en su promotor de un elemento de respuesta a ácido retinoico (RARE) que media su inducción a través de la formación del complejo RA-RAR sobre dicha secuencia (Cilenti, 1995).

## ***III.- OBJETIVOS***

Los retinoides en general ejercen funciones muy importantes en la regulación, diferenciación y homeostasis del desarrollo de los vertebrados; además, cada vez se implica más a estas moléculas en el desarrollo y maduración de gran variedad de tipos celulares (incluidas las del sistema inmune), así como en el tratamiento de diversas patologías como son el cancer, las enfermedades dermatológicas y las inmunodeficiencias.

Por ello, en el presente trabajo, nos propusimos:

- a) Analizar el efecto del retinol en la activación de los linfocitos T humanos.
- b) Observar si los efectos del retinol "in vitro" pueden ser aplicados para el tratamiento de patologías inmunológicas.

De modo más específico, nuestros **objetivos** fueron los siguientes:

1.- *Establecer las condiciones experimentales óptimas (medio de crecimiento, sistema celular, dosis de retinol utilizado, tiempo de adición de retinol) para estudiar el efecto de los retinoides en la activación de los linfocitos T humanos.*

2.- *Analizar el efecto de los retinoides en las diferente vías de activación del linfocito T, en un grupo control de individuos sanos mediante la utilización de antígenos y mitógenos, tanto de membrana (lectinas, citocinas, y anticuerpos monoclonales), como intracelulares (activadores de la PKC) y sus combinaciones.*

3.- *Caracterizar inmunológicamente la acción del retinol sobre linfocitos T periféricos previamente estimulados vía CD3.*

4.- *Caracterizar (a nivel inmunoquímico, fenotípico y funcional) el sistema inmune periférico de un grupo de pacientes con diferentes inmunodeficiencias (primarias o secundarias) y estudiar el efecto "in vitro" del retinol en los linfocitos de estos pacientes y las posibles implicaciones terapéuticas del mismo.*

## ***IV.- MATERIALES Y METODOS***

## IV.1.- GRUPOS DE POBLACION ESTUDIADOS

### IV.1.1.- INDIVIDUOS SANOS

Se estudiaron un total de 32 individuos sanos de edades comprendidas entre los 10 y los 45 años. Sin ninguna patología en el momento de la extracción sanguínea.

### IV.1.2.- PACIENTES ANALIZADOS

Como grupo de pacientes se han seleccionado varios niños que presentan diferentes inmunodeficiencias tanto primarias como secundarias.

Dentro de los pacientes con inmunodeficiencia primaria hemos analizado:

- 3 niñas con inmunodeficiencia variable común (CVI)
- 1 niño con síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS)
- 1 niño con deficiencia de CD3 $\gamma$  (CD3 $\gamma$ )
- 2 niños y 1 niña con el síndrome Papillon-Lefèvre (SPL)

Respecto a los pacientes con inmunodeficiencia secundaria estudiamos:

- 1 niña con anorexia nerviosa (AN)

#### Inmunodeficiencia variable común (ICV)

Esta inmunodeficiencia representa un grupo heterogéneo de enfermedades, familiares o esporádicas, caracterizadas por una disfunción de las células B consistente en bajos niveles séricos de inmunoglobulinas e incapacidad de los linfocitos B para diferenciarse en células plasmáticas. Clínicamente los pacientes presentan amenudo bronquiectasias (dilatación bronquial) (generalmente debido a infecciones por *Giardia lamblia*), alta

incidencia de tumores gastrointestinales y fenómenos autoinmunes. En el 50% de los casos se encuentran alteraciones asociadas de los linfocitos T. Se han estudiado tres pacientes que se nombrarán como ICV-1, ICV-2 e ICV-3.

#### Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS)

El síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) es una enfermedad que presenta una herencia ligada al sexo (cromosoma X) caracterizada por infecciones de repetición que comienzan en el primer año de vida, dermatitis (eczema) y diarrea sanguinolenta. También presenta trombocitopenia asociada a un tamaño plaquetario reducido y una funcionalidad deficiente de sus plaquetas.

Los principales hallazgos inmunológicos a nivel humoral son: concentraciones bajas de IgM y de isohemaglutininas (anticuerpos contra antígenos del grupo sanguíneo), altas concentraciones de IgA e IgE, niveles de IgG normales o ligeramente disminuidos. Estos pacientes además son incapaces de producir anticuerpos específicos en respuesta a antígenos polisacáridicos (un fenómeno que se sabe es T-independiente), mientras que la respuesta a antígenos proteicos es normal.

La funcionalidad de los linfocitos T está alterada "in vitro": falta de respuesta en la vía de activación del CD3; y en las subpoblaciones linfocitarias se observa un número reducido de linfocitos T CD4.

#### Déficit de CD3 $\gamma$

La alteración en la cadena CD3 $\gamma$  fue el primer caso en el que se conocieron las bases moleculares de un defecto asociado al complejo TCR/CD3 (Pérez-Aciego, 1991).

Los principales hallazgos inmunológicos fueron, una disminución del 50% del número de moléculas de membrana del complejo TCR/CD3 asociado a un número reducido de células vírgenes (CD4<sup>+</sup>

CD45RA<sup>+</sup>) y de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>.

La pérdida de CD3 $\gamma$  también está asociado a una disminución en la subclase IgG2 y una defectuosa producción de anticuerpos en respuesta a antígenos polisacáridicos.

A nivel funcional se ha descrito también una activación defectuosa del linfocito T en respuesta a lectinas.

### Síndrome Papillon-Lefèvre (SPL)

El síndrome Papillon-Lefèvre es una enfermedad con una herencia autosómica recesiva que se caracteriza por un cuadro de hiperkeratosis palmoplantar y periodontitis prepuberal, además en el 25% de los casos hay una alta susceptibilidad a padecer infecciones bacterianas.

En estos pacientes el fenotipo celular T es anormal observando un reducido número de células de memoria (CD29<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup>) y una densidad media de expresión disminuida de las moléculas CD2 y LFA-1 (Góngora, 1994).

La activación celular T utilizando diferentes mitógenos y sus combinaciones es normal.

### Anorexia nerviosa

La anorexia nerviosa (AN) es un síndrome psiquiátrico bastante común entre las niñas adolescentes. La AN se caracteriza por una reducción en la ingesta de alimento (principalmente carbohidratos) como consecuencia de un sentido de la delgadez distorsionado.

El curso de la enfermedad está además asociado con desorden en la función neuroendocrina, deficiencias nutricionales, stress y depresión.

En los pacientes diagnosticados de AN se han observado distintas alteraciones en el sistema inmunológico, aunque sorprendentemente la mayoría de los pacientes presentan un estado saludable y

libre de infecciones, en estados avanzados de desnutrición sufren una serie de características típicas de la enfermedad como: amenorrea, pelo lanugo, bradicardia, fenómenos compulsivos e infecciones como consecuencia de una alteración de su sistema inmunológico.

Las principales alteraciones del sistema inmunológico son: reducción en el número absoluto de linfocitos que afecta fundamentalmente a las subpoblaciones celulares T CD4 y CD8, (disminución del cociente CD4/CD8).

La respuesta funcional de los linfocitos T también está alterada, principalmente vía CD2. Algunos pacientes presentan niveles séricos de inmunoglobulinas disminuidos.

## IV.2.- OBTENCION DE MUESTRAS

### IV.2.1.- SUERO Y LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA

De cada uno de los individuos estudiados se extrajo sangre venosa al vacío (sistema Venoject) con diferentes anti-coagulantes (EDTA y heparina) y sin ellos.

- La sangre con EDTA se utilizó por una parte para las determinaciones de moléculas de superficie por citometría de flujo y por otra para la realización del recuento de las células sanguíneas (hematíes, plaquetas, granulocitos, linfocitos y monocitos).

- De la sangre sin anti-coagulantes se obtuvo suero mediante centrifugación durante 5 minutos a 2.500 rpm (revoluciones por minuto) en una centrífuga Sorvall. El suero se utilizó para las determinaciones inmunoquímicas, conservándose a 4° C y/o a -80°C (para la determinación de CHI00).

- La sangre heparinizada fue diluida a la mitad en medio RPMI-1640 (Gibco, Painsley, Reino Unido) suplementado con 1% de antibiótico (ampicilina 12,5 mg/mL,

cloxacilina 12,5 mg/mL, gentamicina 4 mg/mL, fungizona 25 µg/mL). La separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se hizo mediante centrifugación en gradiente de ficoll (Lymphoprep, Nyegaard Co, Oslo, Noruega): 6 mL de sangre diluida fueron colocados sobre 3 mL de Lymphoprep y centrifugados durante 40 minutos a 1.800 rpm. Desde la interfase se aislaron los linfocitos, que fueron después lavados dos veces con medio RPMI-1640 durante 10 min. a 1.200 rpm.

Posteriormente, los linfocitos se resuspendieron a una concentración de  $0,5 \times 10^6$  células/mL en el medio AIMV (Gibco, Paisley, Reino Unido) suplementado con un 1% de antibiótico y 1% de L-glutamina 200mM (Biowhittaker, Walkersville, MD).

#### IV.2.2.- OBTENCION DEL MATERIAL GENETICO

##### IV.2.2.1.- EXTRACCION DEL RNA CITOPLASMATICO TOTAL

Básicamente se utilizó el protocolo descrito por Sambrook, 1989:

-Para cada 10 a 30 millones de células se obtiene un precipitado seco en un tubo de 1,5 ml.

-Se resuspende en 250 µL de tampón de lisis (para romper las membranas celulares) y 250 unidades de inhibidor de RNAasas.

-Se incuba en hielo 1 minuto.

-Se centrifuga a 14.000 rpm durante 2 minutos a 4° C.

-El precipitado contiene los núcleos celulares, y puede utilizarse para extraer DNA. El sobrenadante, transparente, se procesa para RNA de la siguiente forma:

-Añadir 250 µl de tampón de la proteinasa K.

-Añadir 20 µl de proteinasa K (preparada a 10mg/ml en Tris, pH 7,5; 20 mM)

-Incubar a 37° C durante 30 minutos.

-Añadir 1 volumen de fenol-cloroformo (500 µl).

-Agitar vigorosamente e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

-Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4° C.

-Pasar la fase acuosa (superior) a un tubo limpio.

-Repetir la extracción con fenol-cloroformo.

-Añadir 50 µl de Acetato sódico, pH 5,5; 3M.

-Añadir 1 ml de etanol absoluto y agitar bien.

-Incubar a -80° C durante 30 minutos o a -20° C toda la noche.

-Centrifugar a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4° C y aspirar el sobrenadante a vacío.

-Añadir 500 µl de etanol al 70% (pre-enfriado a -20° C), agitar suavemente y volver a centrifugar 5 minutos.

-Aspirar el sobrenadante, secar el precipitado y resuspenderlo en 20 µl de agua bidestilada.

-Añadir 180 µl de TE a los 20 µl anteriores + 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 1M + 2µl de DTT 10 mM (concentración final de 10 mM y 0,1 mM respectivamente).

-Añadir 200 unidades de inhibidor de RNAasas.

-Añadir DNAasa de *E coli* para que quede a una concentración final de 2 µg/ml.

-Incubar a 37° durante 60 minutos.

-Añadir 25 µl de EDTA 100mM y 25 µl de SDS al 2%.

-Añadir 250 µl de fenol-cloroformo y agitar intermitentemente durante 5 minutos.

-Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.

-Pasar la fase acuosa a un tubo limpio.

-Añadir 25 µl de Acetato sódico, pH 5,2; 3M y 500 µl de etanol absoluto.

-Incubar a -80° C durante 30 minutos.

-Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4° C.

-Lavar con etanol al 70 % pre-enfriado a -20° C.

-Secar totalmente el precipitado y

resuspenderlo en 20 µl de agua bidestilada.  
-Calcular la concentración midiendo la absorbancia.

#### IV.2.2.2.- OBTENCION DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA).

El RNA monocatenario no sirve como sustrato para la Taq-polimerasa y en general para ninguna DNA polimerasa. Por ello, para las amplificaciones por PCR es necesario sintetizar una hebra de cDNA usando como molde la hebra de RNA. Esto se realiza en un volumen final de 20 µl que contiene:

- 0,2 a 2 µg de RNA citoplasmático total.
- 5 unidades de inhibidor de RNAasas.
- 1 mM de cada deoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP).
- KCl 50 mM.
- Tris-Cl 20 mM.
- MgCl<sub>2</sub> 20 mM.
- 0,1 µg de oligo (dT)<sub>15</sub>, que sirve como cebador específico de los mRNA uniéndose a la cola poli-A.
- 100 unidades enzimáticas de transcriptasa inversa (AMV).

Esta mezcla se incuba durante 1 hora a 42° C. Posteriormente se inactiva la enzima por calentamiento (10 minutos a 65° C). Sin necesidad de purificación, el 25% de esta mezcla se puede usar para una reacción de PCR.

#### IV.2.2.3.- REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La PCR (Saiki, 1985) es un método muy poderoso y sencillo para amplificar fragmentos de ácidos nucleicos. La técnica consiste en la repetición *n* veces de un ciclo básico que consta de las siguientes etapas:

- a) Desnaturalización de las hebras del ácido nucleico.
- b) Anillamiento o hibridación de los

cebadores.

- c) Elongación o polimerización.

En la primera etapa, la muestra se somete a altas temperaturas (93-97° C) para separar las dos hebras del sustrato (DNA). A continuación la temperatura baja lo suficiente como para permitir la renaturalización de las hebras (45-65° C). Si en la disolución hemos puesto oligonucleótidos complementarios de alguna región del DNA a una elevada concentración, la probabilidad de que hibriden con la secuencia correspondiente e impidan la renaturalización de las hebras es bastante alta. A continuación, se vuelve a aumentar la temperatura (68-72° C) y la DNA polimerasa puede iniciar la polimerización usando como cebadores o "primers" los oligonucleótidos elegidos por nosotros, y como molde la hebra complementaria de DNA. La elongación ocurre en dirección 5' a 3', y la reacción necesita también una mezcla de los cuatro deoxinucleótidos trifosfatos (dNTP). Se necesitan dos cebadores, uno en cada flanco del fragmento que queremos analizar, y su secuencia ha de ser complementaria a la del DNA sustrato en esa zona. Además, las secuencias de los oligonucleótidos no pueden ser complementarias entre sí para evitar que se autohibriden.

Con la utilización como DNA polimerasa de la Taq-polimerasa (obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus*), capaz de soportar altas temperaturas sin degradarse, el proceso se pudo automatizar, ya que no se necesitaba la adición de enzima después de cada ciclo.

#### IV.2.2.4.- OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS.

A continuación se presenta una serie de oligonucleótidos empleados para PCR en este trabajo:

#### A) PCR competitiva de los mensajeros de

**IL-2 e IFN- $\gamma$ :**

A.1) Pareja de primers para amplificar la IL-2:

Primer IL-2-5': CAT TGC ACT AAG  
TCT TGC ACT TGT CA

Primer IL-2-3': CGT TGA TAT TGC  
TGA TTA AGT CCC TG

Con esta pareja de primers se amplificaron las 305 pares de bases del cDNA del gen de la IL-2 de las muestras que se quiere conocer su concentración, y 452 del fragmento de DNA competitivo.

A.2) Pareja de primers para amplificar el IFN- $\gamma$ :

Primer IFN- $\gamma$ -5': GCA TCG TTT TGG  
GTT CTC TTG GCT GTT ACT GC

Primer IFN- $\gamma$ -3': CTC CTT TTT CGC  
TTC CCT GTT TTA GCT GCT GG

Con esta pareja de primers se amplificaron las 427 pares de bases del cDNA del gen del IFN- $\gamma$  de las muestras de las que se quiere calcular su concentración, y 570 del fragmento de DNA competitivo.

**B) PCR de los mensajeros de los receptores nucleares:**

B.1) Para la amplificación del receptor RXR $\alpha$  se diseñó la siguiente pareja de primers, a partir de la secuencia original descrita por Manglesdorf, 1990, cuyo nombre y número de acceso son respectivamente, HSRARLP-X52773:

Primer HRXRA-5': GGG CAT GAG TTA  
GTC GCA GAC

Primer HRXRA-3': ACA AAG GAT GGG  
CCC GCA GGC

B.2) La amplificación del receptor RAR $\alpha$ , se realizó con la siguiente pareja de primers, a partir de la secuencia original descrita por Brand, 1990; cuyo nombre y número de secuencia son respectivamente, HSRARA1-X56057:

Primer HRARA-5': TTC TGA CTG TGG  
CCG CTT GGC

Primer HRARA-3': CTG TGT CCA TGT  
GGC GTG GGC

B.3) Para la amplificación del receptor RAR $\gamma$  se diseñaron los siguientes primers, a partir de la secuencia original descrita por Krust, 1989, cuyo nombre y número de acceso son respectivamente, HSHRARC-M24857:

Primer HRARGC-5': CCG TGG AGA  
CAC AGA GC CCA

Primer HRARG 1 -5': GGG ACT CTC  
ACA CCG CAG CTG

Primer HRARG1-3': TGG TCA GGC  
TGG GGA CTT CAG

**IV.2.2.5.- REACCIONES DE AMPLIFICACION DEL cDNA.**

La mezcla de reacción para amplificar por PCR el cDNA constaba en todos los casos de (volumen de reacción 100 $\mu$ L):

- 1 $\mu$ g de cDNA (en el caso de la PCR competitiva se añadía también 1 $\mu$ g de competidor)
- KCl 50 mM
- Tris, pH8,3; 10 mM
- MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM
- dATP 200 $\mu$ M
- dCTP 200 $\mu$ M
- dGTP 200 $\mu$ M
- dTTP 200 $\mu$ M
- Primer 1, 1  $\mu$ M

- Primer 2, 1  $\mu$ M
- Taq polimerasa (Perkin Elmer Cetus, USA)  
2,5 unidades

Las mezclas anteriores se amplificaron en un termociclador automático (Perkin Elmer 9600).

### **IV.3.- DETERMINACIONES INMUNOQUIMICAS**

#### **IV.3.1.- INMUNOGLOBULINAS TOTALES**

La muestra de suero se utilizó para la medición de los niveles séricos de Igs (IgG, IgA, IgM) mediante nefelometría cinética (Beckman, Brea, CA).

#### **IV.3.2.- COMPONENTES DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO**

Los niveles de C3 y C4 se midieron por nefelometría cinética. La actividad hemolítica del complemento (CH100) se midió mediante un ensayo estandarizado de lisis de hematíes de carnero (Actividad hemolítica total del complemento, The binding Site Limited, Birmingham, Reino Unido) con sueros control y problema.

### **IV.4.- DETERMINACIONES FENOTIPICAS**

#### **IV.4.1.- RECUENTO LEUCOCITARIO TOTAL Y DIFERENCIAL**

Las muestras de sangre venosa se analizaron en un Coulter Counter S-plus (Coulter Electronics, Hialeah, FL) para el recuento total. 200 leucocitos se diferenciaron en extensiones teñidas con el colorante de Wright (Sigma, St. Louis,

MO).

#### **IV.4.2.- CITOFUOROMETRIA**

Para las PBMC aisladas se utilizó la técnica de inmunofluorescencia directa con tres colores. Las PBMC se estimularon con anti-CD3, añadiendo retinol tras 36 horas de iniciado el cultivo. Después de 3 días de cultivo las células fueron marcadas con los anticuerpos monoclonales correspondientes (Tabla 1).

En el caso del análisis de las células de los pacientes seleccionados se realizó el marcaje con anticuerpos monoclonales en sangre completa mediante el sistema Q-prep (Coulter). Este sistema lisa los glóbulos rojos manteniendo, la morfología de los leucocitos y los marcadores de superficie. El panel de anticuerpos monoclonales utilizados se detalla en la tabla 2.

Todas las preparaciones se analizaron en un citómetro de flujo Epics XL (Coulter, Hialeah, FL). Los resultados se expresan en histogramas de fluorescencia unidimensionales donde la abcisa representa intensidad de fluorescencia en una escala logarítmica (en unidades arbitrarias) y en ordenadas el número de células (en unidades arbitrarias) (Shapiro, 1988) o bidimensionales donde tanto la abcisa como la ordenada representa la intensidad de fluorescencia correspondiente a cada anticuerpo monoclonal utilizado con fluoróforos diferentes pudiendo obtenerse, según las combinaciones de anticuerpos empleadas, las distintas subpoblaciones linfocitarias.

**Tabla 1. Anticuerpos monoclonales empleados para el marcaje de PBMC aisladas**

Especificidad	Fluoróforo	Clon	Fuente
CD2	PE	SFCI3Pt2H9	Coulter
CD3	Cy-5	MEM57	Caltag
CD18	FITC	MHM23	DAKO
CD25	FITC	1HT44H3	Coulter
CD29	FITC	4B4LDC9LDH8	Coulter
CD45RO	PE	UCHL1	Becton-Dick.
HLA-DR	PE	L243	Becton-Dick.

**Tabla 2. Anticuerpos monoclonales empleados para el marcaje de células de sangre total.**

Especificidad	Fluoróforo	Clon	Fuente
<i>Linfocitos T</i>			
CD2	PE	SFCI3Pt2HP	Coulter
CD3	Cy-5	MEM57	Caltag
CD4	PE	SK3	Coulter
CD45RA	FITC	2H4LDH11LDB9	Coulter
CD45RO	PE	UCHL1	Becton-Dick.
CD8	FITC	SFCI21Thy	Coulter
<i>Linfocitos B</i>			
CD19	Cy-5	SJ25-C1	Caltag
HLA-DR	PE	L243	Coulter
<i>Linfocitos NK</i>			
CD16	FITC	DJ130C	Dako
CD57	FITC	HNK-1	Becton-Dick.

Las células que presentaban intensidades de fluorescencia por encima del límite superior de la distribución del control negativo se consideraron positivas. La intensidad media de fluorescencia de las células positivas se calculó automáticamente.

#### IV.5.- DETERMINACIONES FUNCIONALES EN PBMC

##### IV.5.1.- RESPUESTA PROLIFERATIVA A MITOGENOS

Los linfocitos totales, aislados de sangre periférica, se contaron en cámara de Neubauer y se ajustaron a una

concentración de  $0,5 \times 10^6$  células/mL en un medio libre de suero (AIMV) suplementado con 1% de antibiótico y 1% de glutamina. Los medios se esterilizaron mediante filtración a través de Millipore GS de diámetro de poro  $0,22 \mu\text{M}$ . Se repartieron en placa de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) añadiendo  $160 \mu\text{L}$  de células ajustadas a  $0,5 \times 10^6$  (que equivale a 80.000 células por pocillo).

A continuación y por triplicado, se añadieron los reactivos enumerados en la Tabla 3 o sus combinaciones (Tabla 4).

En los experimentos en los que se utilizaron retinoides, se añadió  $20 \mu\text{L}$  de retinol o AT-RA a una concentración final de  $10^{-7} \text{ M}$  a cada pocillo a las 48, 60 y 72 horas tras el inicio de cada experimento. La

incubación se realizó en una estufa con humedad controlada, 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C

La proliferación celular se midió por incorporación de timidina tritiada tras un pulso de 18 horas con 1 µCi de <sup>3</sup>H-timidina por pocillo, midiéndose en un contador de centelleo líquido LS 1801 (Beckman). Los resultados son expresados como el valor medio de los triplicados.

Los anticuerpos monoclonales 1XE,

IOT3b y Leu-4 fueron utilizados inmovilizándolos por previa unión del anticuerpo al fondo del pocillo tras incubarlo durante 18 horas a 4°C en Tris-HCL 50mM (pH8). Las placas con el anticuerpo pegado fueron lavadas 3 veces con medio RPMI en el momento de su uso para eliminar el anticuerpo no unido a la placa.

**Tabla 3. Reactivos utilizados en el análisis funcional**

Reactivo	Nombre	Concentración final	Fuente
<i>Anticuerpos Monoclonales</i>			
Anti-CD3	OKT3	12,5 ng/mL	Ortho
	1XE	1:2000 final	CLB
	IOT3	0,04 ng/mL	Immunotech
	IOT3b	5 ng/mL	Immunotech
	Leu-4	10 ng/mL	Becton-Dick
Anti-CD28	Kolt-2	50ng/mL	CLB
Anti-CD2	T11-1.1	1:600 final	CLB
	T11-1.2	1:600 final	CLB
Anti-CD26	Ta-1	0,2 µg/mL	Coulter
Anti-CD69	Leu-23	7,5 µg/mL	Becton
<i>Lectinas</i>			
Fitohemaglutinina	PHA	1:100 final	Difco
Pokeweed	PWM	1 ng/mL	Difco
Concanavalina A	ConA	10 µg/mL	Calbiochem
<i>Superantígenos</i>			
Enterotoxina A	EA	1 ng/mL	Serva
Enterotoxina C1	EC1	1 ng/mL	Serva
<i>Esteres de forbol</i>			
Acetato de forbol mirístico	PMA	10 ng/mL	Sigma
<i>Interleucinas</i>			
Interleukina-2	rIL-2	50 U/mL	Genzyme

**Tabla 4. Combinaciones mitogénicas utilizadas.**

	-	IL-2	PMA	anti-CD28
anti-CD3	+	+	+	+
anti-CD2	+	+	+	+
anti-CD26	-	-	+	-
anti-CD69	-	-	+	-
PHA	+	+	+	-
PWM	+	-	+	-
PMA	+	-	-	+

#### IV.5.2.- PRODUCCION DE INTERLEUCINAS

##### IV.5.2.1.- A NIVEL DE PROTEINA

Las PBMC se estimularon bajo las mismas condiciones que las descritas para los ensayos de proliferación celular. El retinol se añadió a una concentración final de  $10^{-7}$  M tras 36 horas de iniciado el cultivo celular, en 2 dosis independientes (cada 12 horas).

Después de 3 días de cultivo los sobrenadantes celulares se recogieron y las citocinas producidas por esas células fueron medidas por duplicado mediante un sistema de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Las citocinas cuantificadas fueron las siguientes: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 (RD

system, Minneapolis, MN) e IFN- $\gamma$  (Endogen, Boston, MA).

##### IV.5.2.2.- A NIVEL DE RNA

Las PBMC se estimularon con anti-CD3 bajo las mismas condiciones que los ensayos de proliferación, en este caso el retinol se añadió al cultivo cada 9 horas en dos dosis independientes a una concentración de  $10^{-7}$  M. Las células se recogieron tras 18 horas de cultivo y se procesaron para la extracción del RNA (Sambrook, 1989); el RNA citoplasmático extraído fue retro-transcrito a cDNA utilizando la enzima AMV (Promega, Madison, WI).

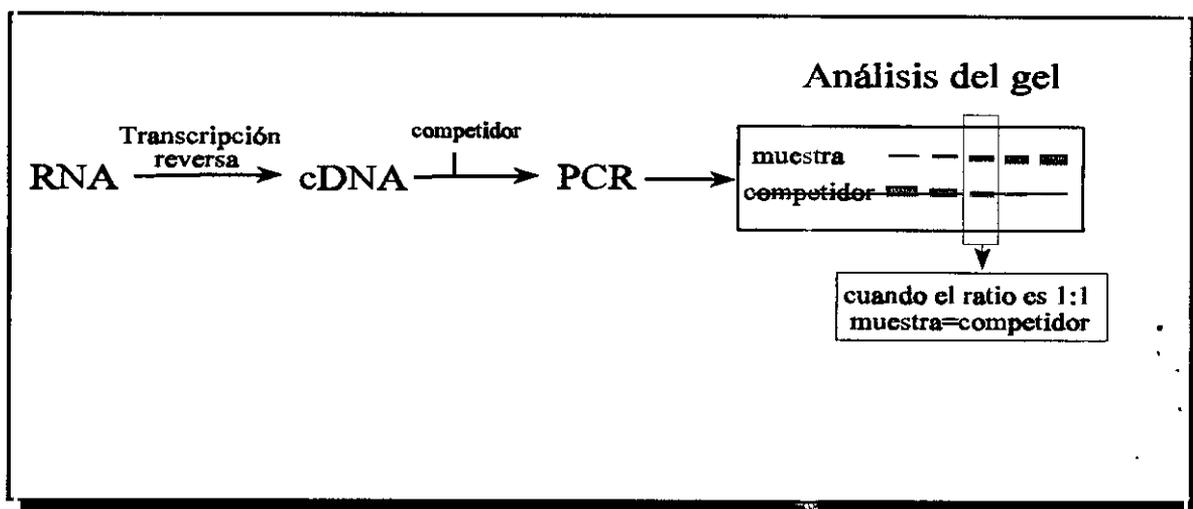


Figura 14. Secuencia del proceso de cuantificación de los mRNA de IL-2 e IFN- $\gamma$

La cuantificación de los mensajeros de IL-2 e IFN- $\gamma$  se realizó utilizando un ensayo comercial competitivo MIMICS (Clontech, Palo Ato, CA; Figura 14).

Se empleó esta metodología ya que la cuantificación de los niveles de RNA o los cambios de niveles de éstos no pueden ser fácilmente medidos debido al aumento exponencial del producto de PCR, donde las pequeñas variaciones de los mRNA pueden ser igualadas con un número alto de ciclos de PCR. Para resolver este problema se usan una serie de controles internos para comparar la eficacia de la PCR en distintas reacciones. Estos controles son fragmentos homólogos al DNA que se va a amplificar y emplean la misma pareja de cebadores, por lo que funcionan como competidores. Las amplificaciones las podemos detectar en el

gel de agarosa ya que el competidor de DNA está diseñado para generar un producto de PCR de un tamaño diferente que el DNA problema.

Los cDNAs y los primers sintetizados (ver materiales y métodos sección IV.2.2) se utilizaron para PCR en un termociclador automático (Perkin, Elmer 9600) con las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°.
- 30 ciclos de:
  - + desnaturalización, 30 segundos a 95° C.
  - + anillamiento, 30 segundos a 55° C.
  - + extensión, 1 minuto a 72° C.
- Extensión final de 5 minutos a 72° C.

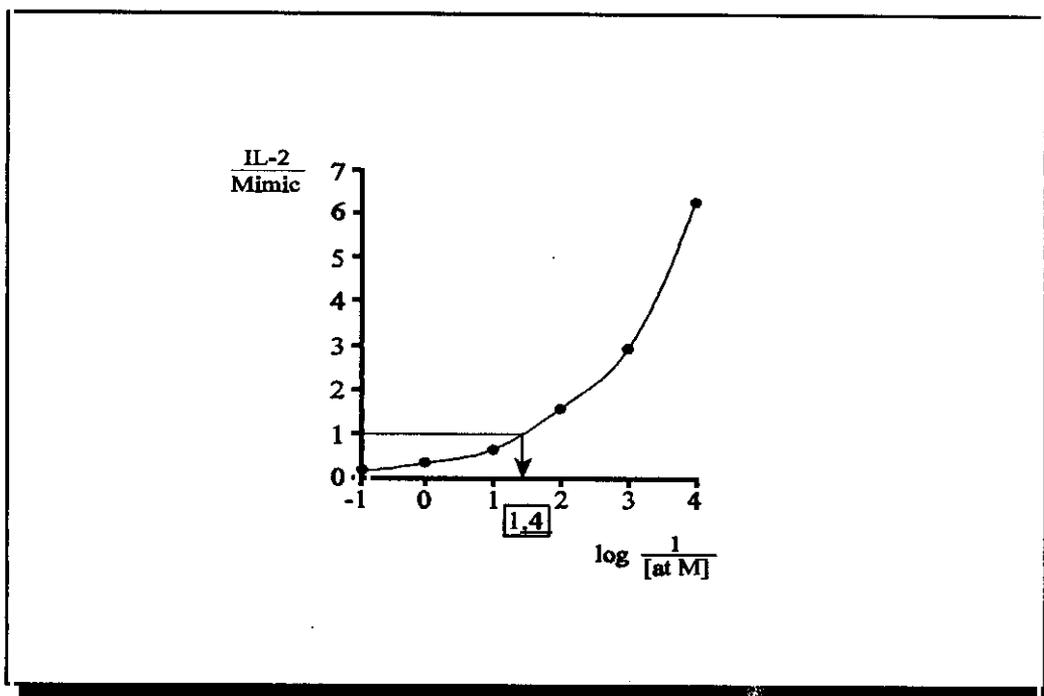


Figura 15. Cálculo de la [atomolar] de los mRNAs de IL-2.

Como se observa en la figura 15, el cálculo de las concentraciones de mensajero se realizó en una gráfica cuyo eje X representa el logaritmo de la inversa de la concentración del competidor, y el eje Y la relación IL-2/Competidor de las cpm

obtenidas al densitometrar el gel.

Las bandas obtenidas serán exactamente de la misma intensidad (es cuando conoceremos la concentración) cuando la relación IL-2/Competidor sea igual a 1, se interpola por tanto este valor en el eje Y y

obtenemos un valor de X de 1,4. La concentración real será:  $1/\text{antilog}1,4=0,04$ . Este valor representa la concentración atómica ( $1 \text{ atomo} = 10^{-18} \text{ M}$ ), de los mensajeros de IL-2 de PBMC estimuladas con OKT3 en presencia de retinol.

#### IV.5.3.- ENSAYOS DE FRAGMENTACION DE DNA

Los linfocitos aislados (80.000) se estimularon con anti-CD3 (OKT3, Ortho) en presencia y ausencia de una concentración  $10^{-7} \text{ M}$  de retinol, empleando las mismas condiciones descritas que para

los ensayos de proliferación.

Las células se cultivaron durante 3 días y, posteriormente, se realizó el ensayo de apoptosis mediante el estudio de la fragmentación del DNA. El ensayo consiste en marcar el DNA con Ioduro de propidio (PI) (un producto que se intercala entre las bases y es capaz de ser excitado por un láser y emitir fluorescencia) en un medio hipotónico (0,1% de citrato sódico, 0,1% Triton X-100), tras este proceso las muestras son analizadas por citometría de flujo calculando el porcentaje de apoptosis de cada muestra del siguiente modo:

$$\frac{100 \times [\text{incorporación de PI en la muestra a analizar (\%)} - \text{incorporación espontánea de PI en las muestras sin estimular (\%)}]}{[100\% - \text{incorporación espontánea de PI en las muestras sin estimular (\%)}]}$$

, tomando los porcentajes de la región sub- $G_0/G_1$  (Figura 16).

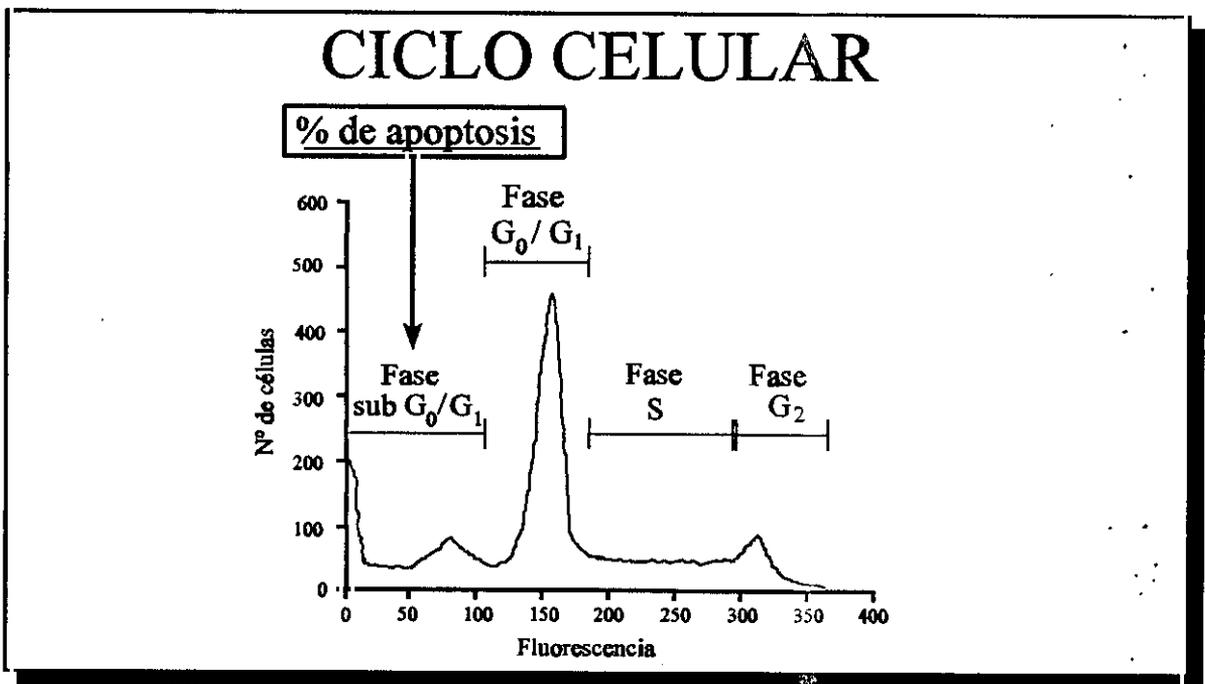


Figura 16. Fases del ciclo celular, las células apoptóticas se sitúan en la fase sub  $G_0/G_1$

## IV.6.- FUNCIONALIDAD DE LINFOCITOS T-HVS

### IV.6.1- INMORTALIZACION DE LINFOCITOS CON HERPES VIRUS SAIMIRI (HVS)

Las PBMC de los pacientes y controles que se quieren inmortalizar con el Herpes Virus Saimiri (HVS) se ajustaron a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/mL en medio RPMI-1640 y medio CG (Vitromex, Vilshofen, Alemania) (1:1) suplementado con un 10% de FCS (Fetal Calf Serum), 1% de L-glutamina, 1% de antibiótico y  $1 \mu\text{g/mL}$  de PHA. A los 3 días de estimulación, las células fueron resuspendidas a  $10^6$  células/mL en un medio que contiene 50 U/mL de IL-2 humana recombinante (Boehringer Mannheim, Alemania) y colocadas en placas de 24 pocillos ( $10^6$  por pocillo; Costar, Cambridge, MA). La infección se produjo cuando se inoculó 1 mL del sobrenadante producido por las células OMK (son células de riñón del mono buho) que son las células infectadas líticamente por el virus con HVS cepa C 488.

Tras la inoculación las células se cambiaron regularmente de medio de crecimiento (medio RPMI-1640 y medio CG (1:1) suplementado con un 10% de FCS, 1% de L-glutamina, 1% de antibiótico y 50U/ml de rIL-2). Tras 3 meses de crecimiento las líneas celulares estaban completamente establecidas y presentaban una morfología estable.

### IV.6.2.- RESPUESTA PROLIFERATIVA EN LÍNEAS T-HVS

Para este ensayo, las células infectadas con HVS se mantuvieron en reposo durante 1 semana (en un medio sin rIL-2) se ajustaron a  $250 \times 10^3$  células/mL en medio AIM-V y se añadieron  $160 \mu\text{L}$  por pocillo (40.000 células/pocillo); posteriormente, se depositaron en placas de

96 pocillos donde previamente se había pegado IOT3b (a una concentración de 0,1  $\mu\text{g/pocillo}$ ) y se crecieron durante 2 días, a las 24 horas de iniciado el cultivo se añadió  $^3\text{H}$ -timidina y se calculó la respuesta proliferativa.

Para observar el efecto del retinol sobre la respuesta proliferativa en esta línea celular, se añadió retinol al inicio de cultivo en 2 dosis independientes cada 12 horas.

### IV.6.3.- SINTESIS DE RNAs ESPECIFICOS DE RECEPTORES NUCLEARES DE RETINOIDES

Las líneas celulares infectadas con HVS se utilizaron para estimar la síntesis de RNAs específicos de receptores nucleares de retinoides.

Para ello, las células infectadas con HVS se mantuvieron en reposo durante 1 semana (en un medio sin rIL-2) se ajustaron a  $250 \times 10^3$  células/mL y se añadieron  $160 \mu\text{L}$  por pocillo (40.000 células/pocillo); posteriormente, se depositaron en placas de 96 pocillos y se crecieron durante 18 horas; para estimar el efecto del retinol, se añadió al inicio del cultivo en 2 dosis independientes cada 9 horas. Se recogieron las células, se eliminó el sobrenadante y se extrajo el RNA citoplasmático (Sambrook, 1989), se realizó la retro-transcripción a cDNA y se realizó una PCR con las siguientes parejas de cebadores específicos:

HRARA-5'; RAR $\alpha$ , amplificado de 1433 pb  
HRARA-3'

HRARGC-5'; RAR $\gamma$ 1, amplificado de 1173  
HRARG1-3'

HRARAG1-5'; RAR $\gamma$ 1, amplificado de 1391  
HRARAG1-3'

HRXRA-5'; RXR $\gamma$ , amplificado de 1431  
HRXRA-3'

Los cDNAs sintetizados (ver

materiales y métodos, sección IV.2.2), se amplificaron por PCR, con los primers anteriormente descritos, con las siguientes condiciones de PCR:

- Desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°.
- 25 ciclos de:
  - + desnaturalización, 30 segundos a 95° C.
  - + anillamiento, 30 segundos a 55° C.
  - + extensión, 1,5 minuto a 72° C.
- Extensión final de 5 minutos a 72° C.

Las bandas de amplificación específicas obtenidas pertenecientes a cada pareja de primers se densitometraron, observando así, si el retinol induce diferencias en la síntesis de mensajeros de los receptores nucleares respecto a las células no tratadas con retinol.

Como control positivo de amplificación se emplearon primers de  $\beta$ -actina.

## ***V.- RESULTADOS***

## V.1.- PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA DE ESTIMULACION CON RETINOIDES

### V.1.1.- RETINOL-ACIDO RETINOICO

El retinol y el ácido retinoico (ver materiales y métodos) se han empleado para establecer las condiciones óptimas de funcionamiento en el sistema celular diseñado, que consiste en células mononucleares aisladas de sangre periférica (PBMC).

Aunque la molécula funcionalmente activa y última en ejercer las diversas funciones biológicas es el ácido retinoico, el retinol en nuestro sistema celular ha mostrado ser más eficiente que el ácido retinoico. El retinol en otros sistemas experimentales (keratinocitos; Chen, 1995) también es más potente, debido a su mejor forma de entrada en la célula y a su facilidad de transporte hasta las proximidades del núcleo donde es oxidado a ácido retinoico.

Como se puede ver en la tabla 5, el efecto proliferativo del retinol es ligeramente mayor que el del ácido retinoico sobre las PBMC estimulas con OKT3, posteriormente se verá como se han establecido estas condiciones de crecimiento.

**Tabla 5. Efecto del retinol y del ácido retinoico ( $10^{-7}$  M) en la proliferación celular (c.p.m. $\times 10^{-3}$ ) de PBMC estimuladas (OKT3) y sin estimular (Medio).**

Estímulo\Medio	AIM-V	AIM-V+ROL	AIM-V+AR
Medio	1,4	0,9	1,0
OKT3	33,0	70,4	65,4

AIM-V representa el medio de crecimiento compuesto por: 98% de AIM-V, 1% de glutamina y 1% de antibiótico, suplementado con retinol (ROL) o ácido retinoico (AR).  
Un ejemplo representativo de 5 realizados.

### V.1.2.- MEDIO DE CRECIMIENTO LIBRE DE SUERO

Para la puesta a punto del sistema celular fue necesario utilizar un medio de crecimiento celular (AIM-V) libre de cualquier forma de retinoide y carotenoide, así somos capaces de controlar: el retinoide que queremos probar, su dosis y su tiempo de adición sobre las PBMC.

El medio de crecimiento utilizado (AIM-V) se trata de un medio libre de suero, es decir lleva los requerimientos necesarios para emplearlo sin necesidad de suplementarlo con suero de

ternera fetal (FCS), lo que es muy importante debido a que el FCS contiene distintas formas de retinoides que nos haría incontrolable el sistema.

Para ello y como se muestra en la tabla 6 (ejemplo representativo), se probaron distintos medios de crecimiento (no se muestran todos los resultados), observando en todos los casos cómo en los medios de crecimiento donde intrínsecamente ya existía algún tipo de retinoide (es el caso del medio RPMI que se suplementa con FCS, ver pie de tabla) su adición exógena según las condiciones establecidas (ver posteriormente) no suponía efecto adicional. Por el contrario, utilizando el medio de crecimiento AIM-V sí obtenemos diferencias claras al adicionar retinol, en las PBMC estimuladas con OKT3.

**Tabla 6. Efecto del medio de crecimiento utilizado sobre la proliferación celular (c.p.m.  $\times 10^{-3}$ ) con y sin retinol  $10^{-7}$  M (ROL).**

Estímulo\Medio	AIM-V	AIM-V+ROL	RPMI	RPMI+ROL
Medio	1,4	0,9	1,3	1,3
OKT3	33,0	70,4	45,3	46,7

AIM-V representa el medio de crecimiento compuesto por: 98% de AIM-V, 1% de L-glutamina y 1% de antibiótico. RPMI: 88% de RPMI, 10% de FCS, 1% de L-glutamina y 1% de antibiótico. Un ejemplo representativo de 5 realizados.

### V.1.3.- TIEMPO DE ADICION

El incremento en la respuesta proliferativa inducido en las PBMC estimuladas con OKT3 fue totalmente dependiente del tiempo al cual el retinol era añadido al cultivo (Figura 17):

- si se añade al inicio del cultivo (junto con el OKT3) no se produce incremento en la respuesta proliferativa, es más se produce una pequeña inhibición de la proliferación celular.

- no hubo efecto adicional del retinol añadiéndolo sobre PBMC estimuladas con OKT3 tras 24 horas de iniciado el cultivo.

- la proliferación celular de las PBMC estimuladas con OKT3 aumenta significativamente adicionando retinol transcurridas 48 horas del inicio del cultivo. A partir de ese momento se añade una dosis cada 12 horas (hasta un total de 3). Las 3 dosis son necesarias ya que en el

medio de crecimiento utilizado el retinol no está protegido por sus proteínas fisiológicas de unión (RBP y TTR) con lo que es altamente lábil disminuyendo su bioactividad a la mitad en menos de 24 horas.

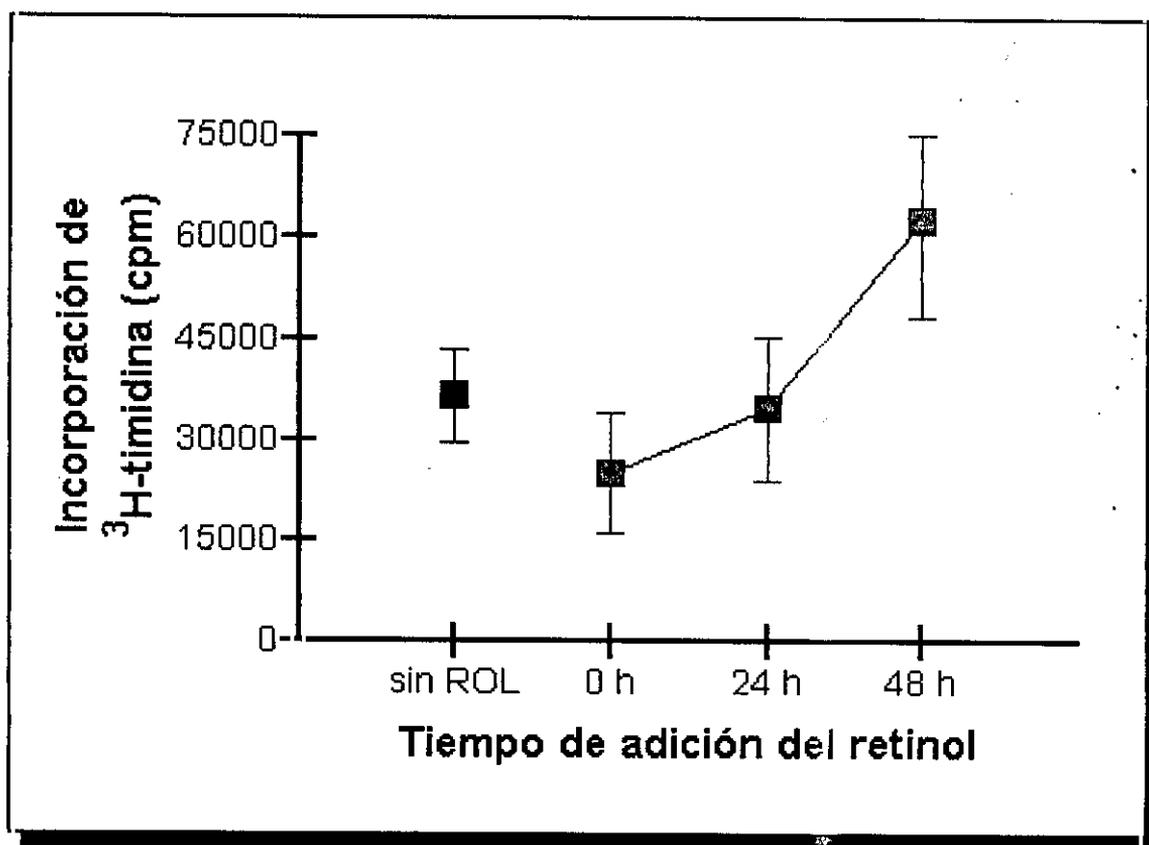


Figura 17. Proliferación de PBMC estimuladas con OKT3 a distintos tiempos de adición de retinol  $10^{-7}\text{M}$  (a 0, 24 y 48 horas del inicio del cultivo). Las barras representan la desviación estandar de los triplicados obtenidos en cinco donantes.

En las PBMC aisladas de 5 individuos sanos (tablas 5 y 6) se muestra que la adición de retinol sin previa activación con OKT3 no induce proliferación, es la estimulación con OKT3 y la adición de retinol 48 horas tras el inicio del cultivo celular (en 3 dosis, una cada 12 horas) lo que provoca la respuesta proliferativa vía CD3.

En los sistemas celulares establecidos donde se ha visto la importancia de los retinoides en algún proceso celular, las pautas de adición de retinoides son variables en cada caso. En ciertos modelos el efecto celular es apreciable cuando la adición de retinoides se produce en el inicio del experimento (Garbe, 1992.), mientras que en otros sistemas es el retraso en su adición

lo que supone la inducción del efecto (Ballow, 1996).

#### V.1.4.- CONCENTRACIONES OPTIMAS DE RETINOL

Los experimentos realizados han demostrado que las PBMC estimuladas con OKT3 junto con la coestimulación continua de retinol en el cultivo produce un incremento significativo de la proliferación celular. Para conocer cual es la concentración de retinol más potente a la hora de co-estimar las PBMC que se han activado previamente con OKT3 se ha realizado una cinética utilizando 9 concentraciones diferentes de retinol que van desde  $10^{-3}$  M a  $10^{-10}$  M (Figura 18).

El incremento de proliferación ha resultado ser dosis-dependiente alcanzando el máximo entre las concentraciones de  $10^{-6}$  a  $10^{-8}$  M, consiguiéndose la máxima capacidad proliferativa de las PBMC a la dosis de  $10^{-7}$  M; éstos resultados son coherentes con los obtenidos por otros autores en timocitos humanos (Sidell, 1988) y timocitos de ratón (Garbe, 1992).

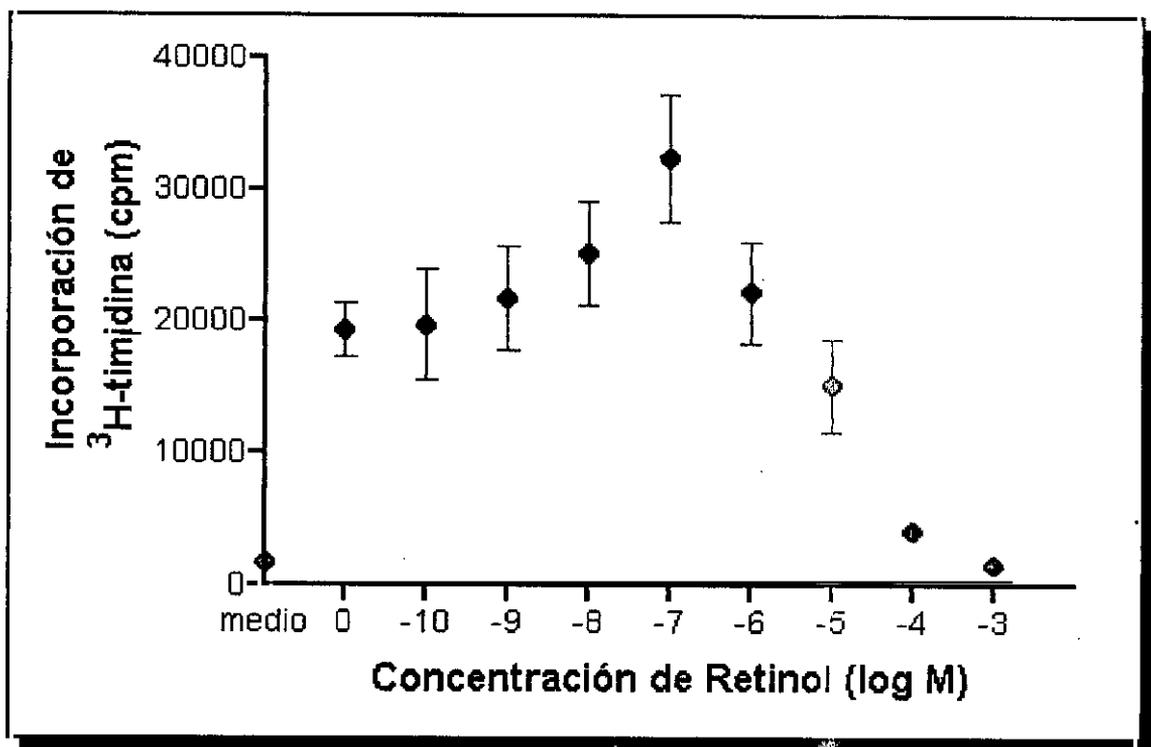


Figura 18. Cinética de proliferación de PBMC estimuladas con OKT3 a distintas concentraciones de retinol, adicionadas 48 horas tras el inicio del cultivo. Las barras representan la desviación de los triplicados de 3 donantes sanos.

Por el contrario, las concentraciones muy elevadas de retinoides ( $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  M) provocaron una inhibición en la proliferación celular debido al efecto tóxico que supuso para las células.

Es muy importante reseñar que las concentraciones óptimas que hemos establecido "in vitro" son similares a las existentes "in vivo" en sangre periférica ( $1-2 \times 10^{-6}$  M).

## V.2.- EFECTO DEL RETINOL EN LAS VIAS DE ACTIVACION DE LOS LINFOCITOS T

Sobre PBMC estimuladas con una serie de mitógenos y antígenos se testó el efecto del retinol (tabla 7), añadiéndose al cultivo a distintos tiempos (a las 0, 24 y 48 horas de iniciada la estimulación).

**Tabla 7. Respuesta proliferativa a distintos tiempos de la adición del retinol ( $10^{-7}$  M) en un panel de mitógenos y combinaciones mitogénicas (c.p.m.  $\times 10^{-3}$  M).**

Estímulo	Sin ROL	48H-ROL	24H-ROL	0H-ROL
Control	1,4	0,9	0,7	0,8
PMA	23,3	18,3	21,6	9,9
IL-2	21,9	17,8	23,6	10,0
EA	143,7	100,8	54,3	26,9
EC1	111,3	88,4	54,5	30,1
CD3	33,0	<b>70,4</b>	29,3	23,3
CD3+IL-2	50,1	<b>76,1</b>	51,6	43,8
CD3+PMA	91,1	66,1	55,8	48,7
CD3+CD28	54,1	<b>85,4</b>	52,1	47,4
CD2+IL-2	48,9	46,9	40,8	21,0
CD2+PMA	46,6	29,5	27,8	21,5
CD2+CD28	52,7	45,7	35,5	26,0
CD28+PMA	78,3	76,1	65,7	55,6
PHA	64,6	54,2	21,1	14,1
PHA+IL-2	74,5	62,8	52,5	40,8
PHA+PMA	82,0	59,9	52,3	45,7
ConA	99,5	92,1	54,4	32,8
ConA+IL-2	109,3	96,4	72,5	55,0
PWM	24,4	19,9	14,6	13,1
PWM+PMA	36,1	29,7	27,6	24,9

Se muestra un ejemplo representativo de los 5 realizados

**Tabla 8. Respuesta proliferativa de PBMC estimuladas con diferentes mitógenos en ausencia de retinol (sin ROL) y en presencia de retinol (con ROL).**

Estímulo	cpm $\times 10^{-3}$ <sup>a</sup>		p
	sin ROL	con ROL	
Medio	1.2 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.5	N.S.
PMA	11.8 $\pm$ 6	10.1 $\pm$ 5	N.S.
rIL-2	13.0 $\pm$ 5	10.5 $\pm$ 5	N.S.
EA	64.7 $\pm$ 42	51.6 $\pm$ 40	N.S.
EC1	39.3 $\pm$ 30	33.4 $\pm$ 29	N.S.
$\alpha$ -CD3	<b>38.4 <math>\pm</math> 26</b>	<b>61.1 <math>\pm</math> 39</b>	<b>0.0042</b>
$\alpha$ -CD3 + rIL-2	48.1 $\pm$ 29	58.7 $\pm$ 37	N.S.
$\alpha$ -CD3 + PMA	65.3 $\pm$ 38	56.9 $\pm$ 34	N.S.
$\alpha$ -CD3 + $\alpha$ -CD28	<b>54.3 <math>\pm</math> 42</b>	<b>72.9 <math>\pm</math> 47</b>	0.0516
$\alpha$ -CD28 + PMA	72.3 $\pm$ 42	66.3 $\pm$ 43	N.S.
$\alpha$ -CD26 + PMA	79.5 $\pm$ 42	71.3 $\pm$ 41	N.S.
$\alpha$ -CD69 + PMA	63.7 $\pm$ 41	57.2 $\pm$ 39	N.S.
PHA	84.7 $\pm$ 50	86.8 $\pm$ 44	N.S.
PHA + rIL-2	91.8 $\pm$ 48	85.2 $\pm$ 45	N.S.
PHA + PMA	76.0 $\pm$ 39	63.3 $\pm$ 35	N.S.
Con A	189.0 $\pm$ 64	153.5 $\pm$ 49	<b>0,015</b>
PWM	15.4 $\pm$ 9	15.8 $\pm$ 10	N.S.
PWM + PMA	29.8 $\pm$ 14	25.8 $\pm$ 13	N.S.
$\alpha$ -CD2 + PMA	59.1 $\pm$ 55	46.6 $\pm$ 40	N.S.
$\alpha$ -CD2 + rIL-2	43.4 $\pm$ 29	39.5 $\pm$ 29	N.S.
$\alpha$ -CD2 + $\alpha$ -CD28	68.9 $\pm$ 55	62.4 $\pm$ 48	N.S.

<sup>a</sup>Los resultados son expresados como media  $\pm$  desviación estandar. 32 individuos sanos no relacionados se ensayaron para cada estímulo excepto CD2 y sus combinaciones (16 individuos). Los valores significativos de p se destacan en negrita, el resto representan diferencias no significativas (N.S.).

En la tabla 7 se observa que la co-estimulación del retinol es efectiva solamente cuando se adiciona retinol 48 horas tras la estimulación de las PBMC con OKT3 y sus combinaciones (excepto OKT3+PMA).

Por lo que, una vez establecidas las condiciones óptimas de co-estimulación (utilización de retinol  $10^{-7}$  M, y adición tras 48 horas de iniciado el cultivo) se procedió a su ensayo en un panel de 32 individuos sanos no relacionados entre si (Tabla 8), observando nuevamente el efecto del retinol cuando se emplea OKT3 y sus combinaciones (excepto OKT3+PMA). Aunque sólo se consiguieron diferencias significativas cuando las PBMC se estimularon con OKT3 en presencia de retinol, respecto a las células sin retinol. Ningún otro incremento se observó en las restantes combinaciones ensayadas al añadir retinol.

Con la finalidad de asegurar que el efecto co-estimulador del retinol afecta sólomente a la vía de activación del CD3, se testaron concentraciones subóptimas de todos los estímulos y sus combinaciones con las condiciones establecidas de retinol previamente descritas; no se obtuvo ninguna co-estimulación más del retinol sobre las PBMC activadas con los diferentes mitógenos probados (datos no mostrados).

### V.3.- EFECTO DE DIFERENTES ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA ACTIVAR VIA CD3: ESPECIFICIDAD DE LA ACCION DEL RETINOL.

Para confirmar la co-estimulación del retinol en la activación a través de CD3, se ensayó un panel de 5 anticuerpos monoclonales anti-CD3 diferentes (Materiales y métodos) solubles y pegados a plástico según los casos. Con la característica que en ciertos casos estos anticuerpos reconocen epítomos diferentes, observándose que el efecto del retinol no parece ser específico de la cadena que es reconocida por el anticuerpo monoclonal ni de su empleo: inmovilizado en placa o soluble (Tabla 9).

**Tabla 9. Anticuerpos anti-CD3 utilizados.**

Anticuerpo anti-CD3	Epítomo reconocido	Clon	Subclase de IgG	Forma de utilización
OKT3	CD3 $\gamma\epsilon$ + CD3 $\delta\epsilon$	P3	IgG2a	S
1XE	CD3 $\delta$	1XE	IgG1	S y P
IOT3	CD3 $\epsilon$	X35	IgG2a	S
IOT3b	CD3 $\epsilon$	UCHT1	IgG1	P
Leu-4	CD3 $\epsilon$	SK7	IgG1	P

La forma de utilización de los anticuerpos fue S (Soluble) y P (Pegado a plástico).

La razón por la cual se pegan ciertos monoclonales a una placa es para que la inducción de la proliferación sea más potente, debido a que los anticuerpos con subtipos IgG1 (subtipo de la inmunoglobulina a la cual pertenece el anticuerpo monoclonal de ratón utilizado) tienen una menor capacidad para pegarse al receptor para Fc de inmunoglobulinas de los monocitos en PBMC fundamentalmente, produciendo una menor capacidad proliferativa de esos subtipos.

Los 5 anticuerpos monoclonales anti-CD3 se testaron a diferentes diluciones para observar el efecto del retinol en la co-estimulación a través de CD3 sobre las PBMC de 3 individuos sanos (Tablas 10, 11, 12, 13, 14, 15).

**Tabla 10. Proliferación inducida por IXE soluble en presencia y ausencia de retinol (c.p.m.x10<sup>-3</sup>).**

dil.IXE final	sin ROL	con ROL
Medio	3,0	2,3
<b>1:2.000</b>	<b>49,2</b>	<b>87,6</b>
1:5.000	51,5	80,3
1:10.000	56,7	77,2
1:20.000	49,8	69,0
1:40.000	45,3	49,2
1:100.000	39,2	42,2

**Tabla 11. Proliferación inducida por IOT3b pegado en presencia y ausencia de retinol (c.p.m.x10<sup>-3</sup>).**

[IOT3b]ng/mL	IOT3b	IOT3b+rol
Medio	3,6	2,2
50	148,1	124,2
10	113,2	122,6
<b>5</b>	<b>106,3</b>	<b>121,4</b>
2,5	36,5	41,1
1	8,4	7,3
0,5	7,9	5,8

**Tabla 12. Proliferación inducida por IXE pegado en presencia y ausencia de retinol (c.p.m.x10<sup>-3</sup>).**

dil.IXE final	sin ROL	con ROL
Medio	3,6	2,1
<b>1:400</b>	<b>69,4</b>	<b>108,9</b>
1:1.000	66,3	102,3
1:2.000	62,4	91,0
1:4.000	47,5	60,0
1:8.000	46,1	51,6
1:20.000	39,1	47,1

**Tabla 13. Proliferación inducida por Leu-4 pegado en presencia y ausencia de retinol (c.p.m.x10<sup>-3</sup>).**

[Leu-4]ng/mL	sin ROL	con ROL
Medio	4,2	3,1
50	11,7	10,5
<b>10</b>	<b>17,2</b>	<b>14,1</b>
5	15,9	12,9
2,5	15,3	11,7
1	9,2	8,8
0,5	7,1	4,0

**Tabla 14. Proliferación inducida por IOT3 soluble en presencia y ausencia de retinol (c.p.m.x10<sup>-3</sup>).**

[IOT3]ng/mL	sin ROL	con ROL
Medio	3,1	2,3
2	42,9	53,6
0,4	47,1	75,9
0,2	48,4	76,2
0,1	50,5	79,8
<b>0,04</b>	<b>47,3</b>	<b>91,4</b>
0,02	59,9	91,6

Se muestran los resultados de un ejemplo representativo de los 3 realizados.

**Tabla 15. Proliferación inducida por OKT3 soluble en presencia y ausencia de retinol (c.p.m.x10<sup>-3</sup>).**

[OKT3]ng/mL	sin ROL	con ROL
Medio	2,1	1,4
<b>12,5</b>	<b>22,9</b>	<b>34,8</b>
6,25	19,0	23,0
4,2	16,1	18,6
1,25	20,2	29,0
0,25	10,1	11,5
0,12	4,6	5,8
0,06	2,7	2,3

La respuesta proliferativa con los anticuerpos anti-CD3 testados fue favorablemente influenciada por la presencia de retinol (excepto con Leu-4, que se conoce es el monoclonal menos mitogénico de los ensayados). En la figura 19 se representan las concentraciones

óptimas elegidas de anticuerpos anti-CD3 (en negrita en las tablas 10, 11, 12, 13, 14, 15) donde se han observado mayores diferencias en la proliferación celular de PBMC coestimuladas con retinol respecto a sin él.

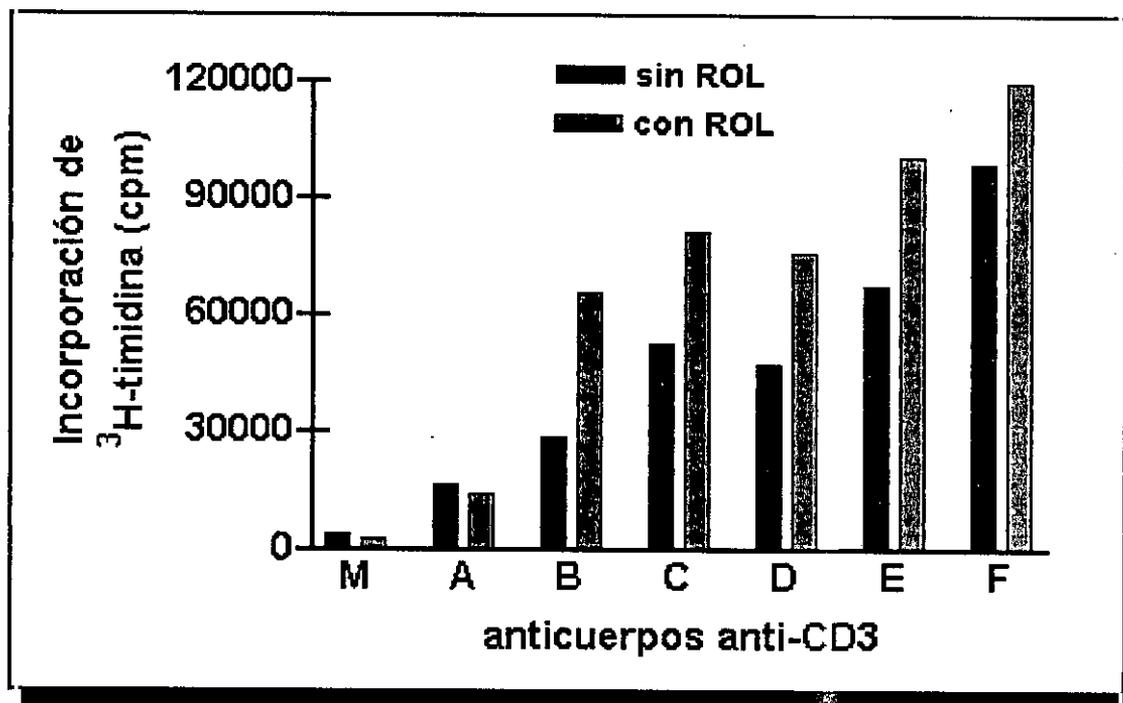


Figura 19. Respuesta proliferativa de PBMCs estimuladas con diferentes anticuerpos anti-CD3: A (Leu-4 pegado), B (OKT3 soluble), C (1XE soluble), D (IOT3 soluble), E (1XE pegado) y F(IOT3b pegado) en presencia y ausencia de retinol (ROL)  $10^{-7}$ M. La figura es un experimento representativo de los 3 realizados.

#### V.4.- LA CO-ESTIMULACION PRODUCIDA POR EL RETINOL NO ES DEBIDA A UNA DISMINUCION DE LA APOPTOSIS.

Con la finalidad de esclarecer si el retinol incrementa la proliferación linfocitaria a través de acosta de inhibir la apoptosis inducida por esta vía, se realizó un ensayo de fragmentación de DNA en 5 individuos sanos no relacionados. A la concentración de OKT3 ensayada (2 ng por pocillo) sólo un 4,7% de los núcleos celulares mostraban fragmentación en ausencia de retinol, mientras que la adición de retinol no supuso un aumento significativo (6,4%). Lo cual contrasta con el aumento significativo de la incorporación de timidina co-estimulando esas mismas células en presencia de retinol (39,4%) respecto a con OKT3 sólo (19,8%) (Figura 20).

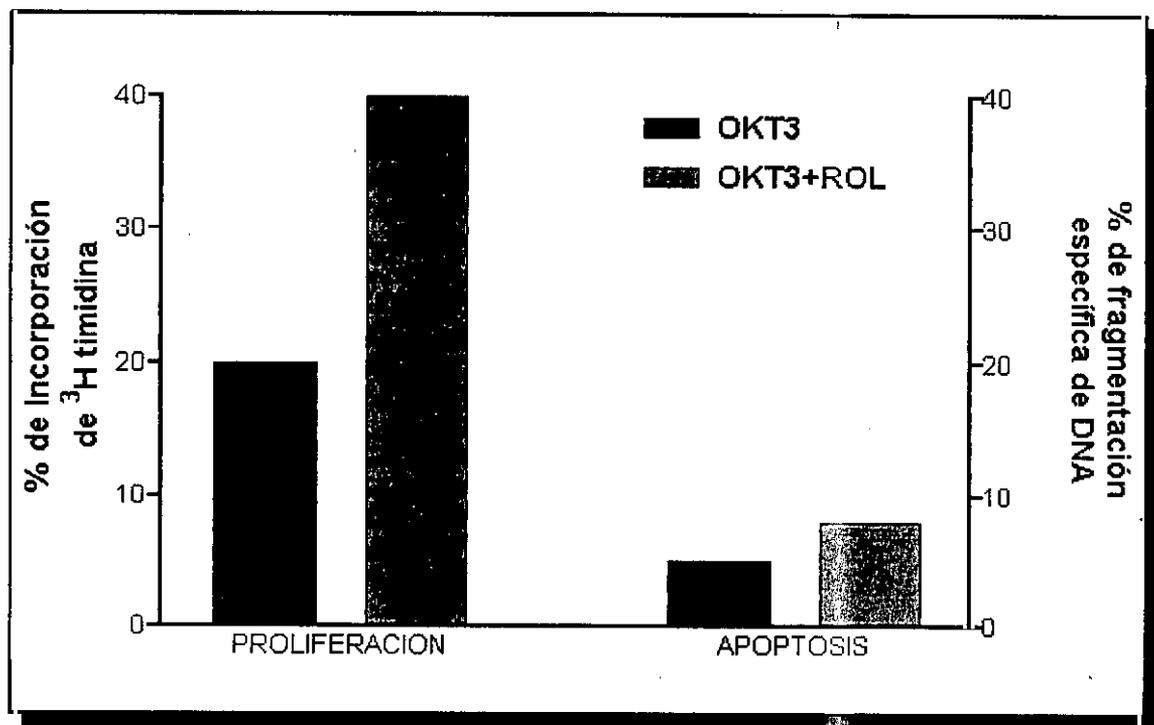


Figura 20. Efecto del retinol en la inducción relativa de proliferación (columnas de la izquierda) y en la apoptosis (columnas de la derecha) en PBMC estimuladas con OKT3. La proliferación media relativa se calculó:

$$100 \times \frac{[\text{incorporación de timidina con OKT3 (cpm)} - \text{incorporación espontánea (cpm)}]}{[\text{máxima incorporación de timidina (cpm)} - \text{incorporación espontánea (cpm)}]}$$

en 32 donantes sanos. El porcentaje de apoptosis se calculó como se describe en mat. y met. en 5 donantes sanos.

Por lo tanto, el aumento de proliferación celular al añadir retinol a las PBMC estimuladas con OKT3 no es consecuencia de una disminución de la apoptosis sino de una verdadera proliferación celular, ya que no existen diferencias significativas en la apoptosis de células estimuladas con OKT3 en presencia y ausencia de retinol.

## **V.5.- EFECTO DEL RETINOL EN LA INDUCCION DE CITOCINAS**

Para conocer más en profundidad a través de qué mecanismos el retinol modula la mitogénesis a través de CD3, se realizaron una serie de experimentos para descubrir si el aumento de proliferación celular de las PBMC estimuladas con OKT3 en presencia de retinol está condicionado por el aumento o disminución de mediadores de la función inmune denominados interleucinas.

### **V.5.1.- EFECTO DEL RETINOL EN LA INDUCCION DE CITOCINAS A NIVEL DE PROTEINA.**

Sobre las PBMC de un panel de 10 individuos sanos no relacionados se induce la síntesis y secreción de interleucinas a través de la estimulación con OKT3 en presencia y ausencia de retinol (Materiales y métodos).

En los sobrenadantes celulares recogidos fueron cuantificadas una serie de citocinas que pertenecen a dos fenotipos: fenotipo Th1 (función inmune celular) y fenotipo Th2 (función inmune humoral).

Los resultados muestran un aumento no significativo de los niveles de IL-2 e IFN- $\gamma$  (fenotipo Th1), mientras que en el resto de citocinas cuantificadas (IL-4, IL-6, IL-10) no se han observado diferencias claras. (Figura 22).

### **V.5.2.- EFECTO DEL RETINOL EN LA INDUCCION DE CITOCINAS A NIVEL DE RNA MENSAJERO**

Para confirmar los resultados obtenidos en la secreción de interleucinas a nivel de proteína (IL-2 e IFN- $\gamma$ ), se procedió a la cuantificación de los mRNAs de IL-2 e IFN- $\gamma$  mediante el diseño de una PCR competitiva establecida entre el cDNA que se quiere cuantificar (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) y un fragmento de DNA homólogo (diferente para cada interleucina que se

quiere cuantificar) que sirve de competidor, y que al conocer su concentración nos da la concentración de los transcritos obtenidos (Materiales y métodos).

Realizando este ensayo se confirma que la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  es potenciada por la adición de retinol a las PBMC estimuladas con OKT3, obteniendo en el caso de la IL-2 un aumento de inducción de 20 veces en las células estimuladas con retinol respecto a las estimuladas solamente con OKT3 y de unas 50 veces en el caso de los niveles de RNA de IFN- $\gamma$  estimulados de igual forma con retinol respecto a los que solamente se estimularon con OKT3.

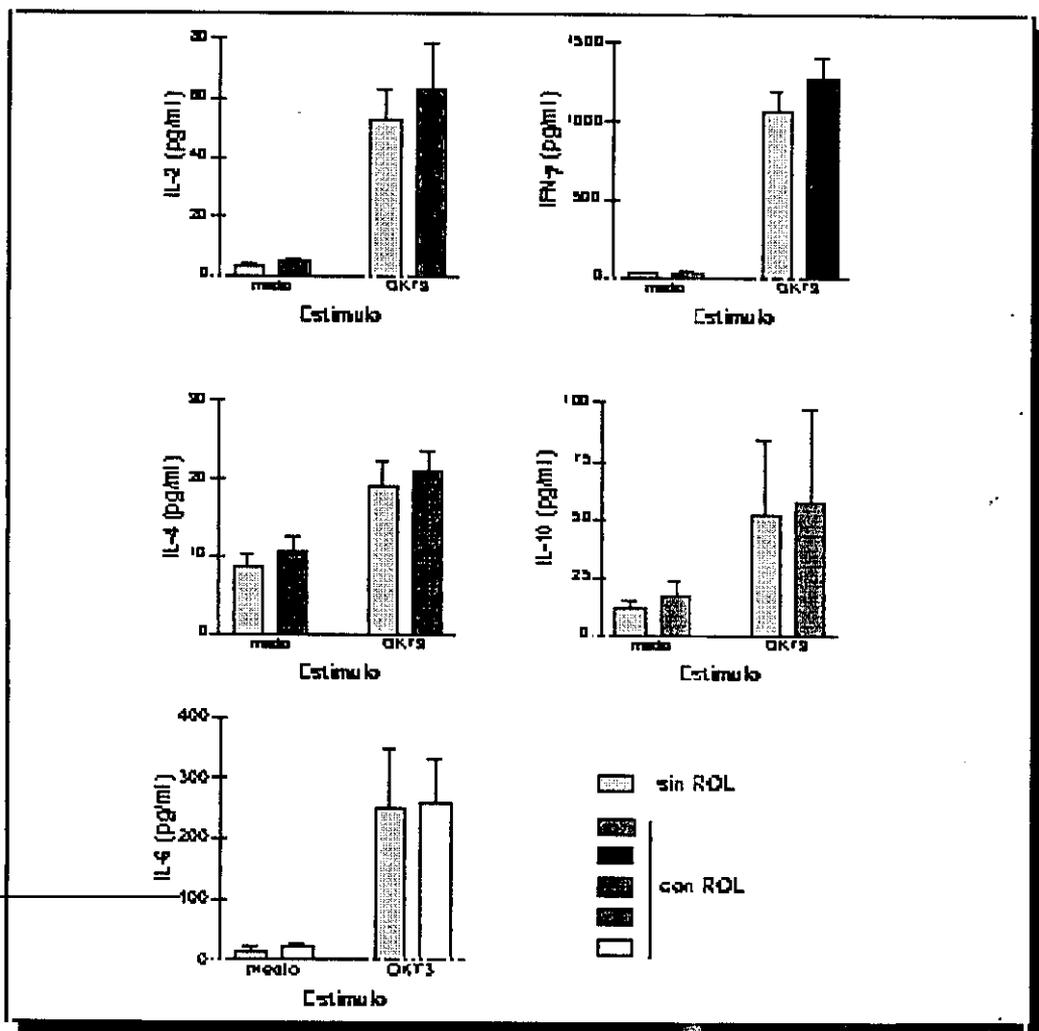


Figura 21. Efectos del retinol sobre la producción de citocinas en PBMC estimuladas (OKT3) y sin estimular (Medio). Las barras representan la desviación estandar de los duplicados de 10 donantes sanos.

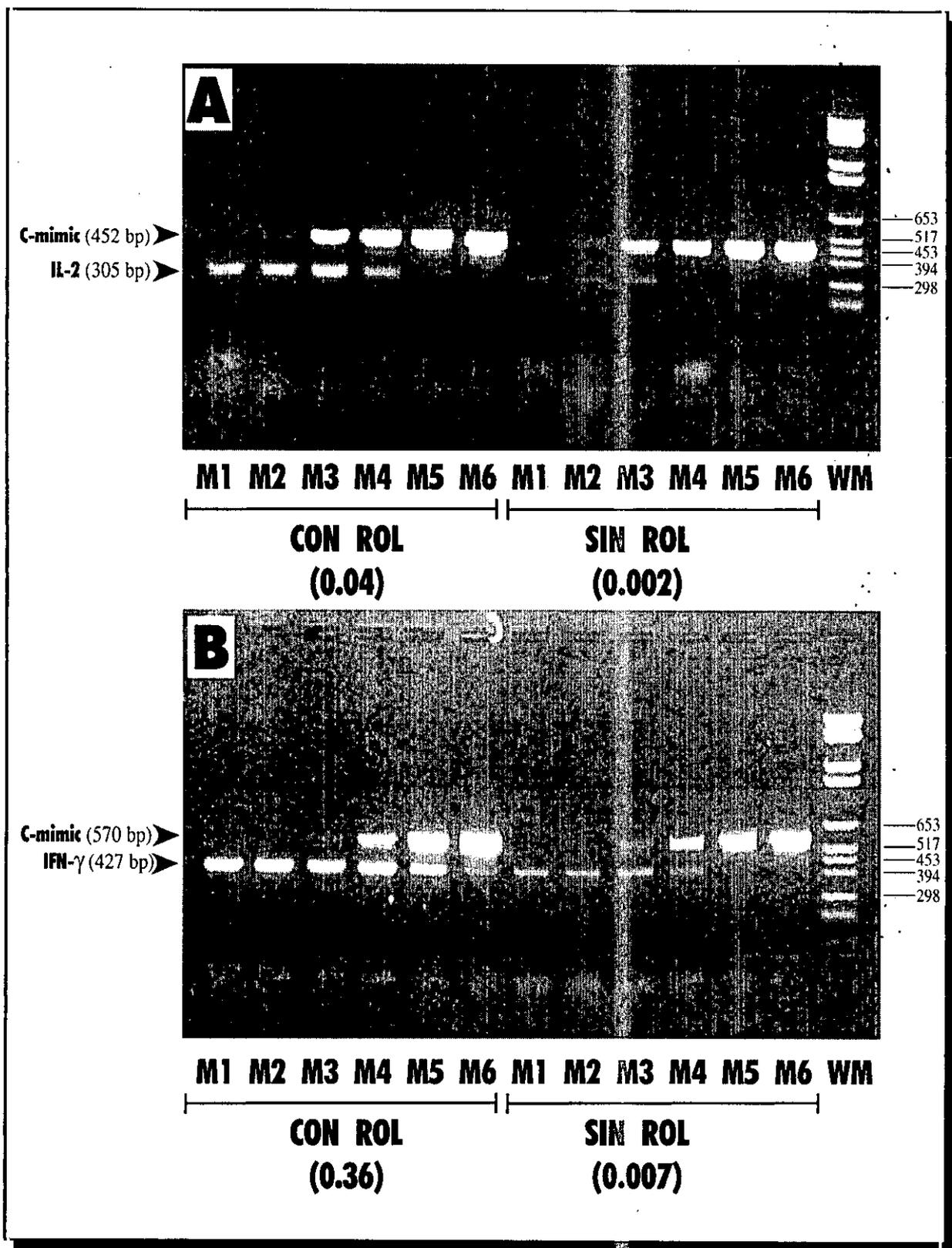


Figura 22. (A) Los niveles de transcripción de IL-2 en PBMC, cuantificados mediante un ensayo competitivo, se mejoraron 20 veces por la adición de retinol  $10^{-7}M$ . (B) Los niveles de transcripción se mejoraron 50 veces en las mismas condiciones de cultivo. Concentraciones del DNA competitivo: M1,  $10^{-4}$  attomoles/ $\mu l$ ; M2,  $10^{-3}$  attomoles/ $\mu l$ ; M3,  $10^{-2}$  attomoles/ $\mu l$ ; M4,  $10^{-1}$  attomoles/ $\mu l$ ; M5, 1 attomoles/ $\mu l$ ; M6, 10 attomoles/ $\mu l$ . El n° entre paréntesis representa la concentración en attomoles/ $\mu l$ .

## V.6.- EFECTO DEL RETINOL EN LA INDUCION DE MARCADORES DE ACTIVACION DE LAS CELULAS T.

El estudio de una serie de marcadores de superficie de la célula T, es otra forma de intentar descubrir el mecanismo por el cual los retinoides producen sus efecto. Para ello una vez recogidos los sobrenadantes para la cuantificación de interleucinas las células sobrantes se utilizaron para el análisis de la expresión de marcadores de activación-adhesión característicos de células T: CD18, CD2, CD45RO, CD25.

La figura 23 muestra los resultados expresados tanto en forma de porcentaje de células positivas (%), como de densidad media de moléculas por célula (M).

Las PBMC de un panel de 10 individuos adultos sanos no relacionados fueron estimuladas con OKT3 en presencia y ausencia de retinol  $10^{-7}$  M. En la secuencia del promotor de CD18 (cadena  $\beta$  de LFA-1) se conoce la presencia de RAREs (Agura, 1992), con lo que en principio puede ser una molécula inducible por retinol.

La adición de retinol a las PBMC estimuladas con OKT3 mostró un aumento tanto del porcentaje como de la media de expresión del CD18. En todos los casos el CD18 obtenido, mostraba una pérdida de la población "dull" tras la estimulación con OKT3 que se hace gradualmente mayor tras la estimulación con OKT3+ROL.

En el caso de la expresión de CD2 ningún efecto aditivo del retinol pudo ser demostrado tras la estimulación de las PBMC con OKT3.

Por el contrario, tanto la proporción como la densidad media de moléculas por célula de CD45 RO (un marcador de células T de activación/memoria) aumenta en las PBMC estimuladas con OKT3 tras la co-estimulación con retinol, y este aumento es coincidente con la pérdida del pico "dull" (de baja densidad) del CD18 según se coestimula con OKT3 y con OKT3 +ROL.

Por último, el retinol aumenta la expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-2 (CD25) sobre PBMC estimuladas con OKT3, estos resultados son similares a los publicados para

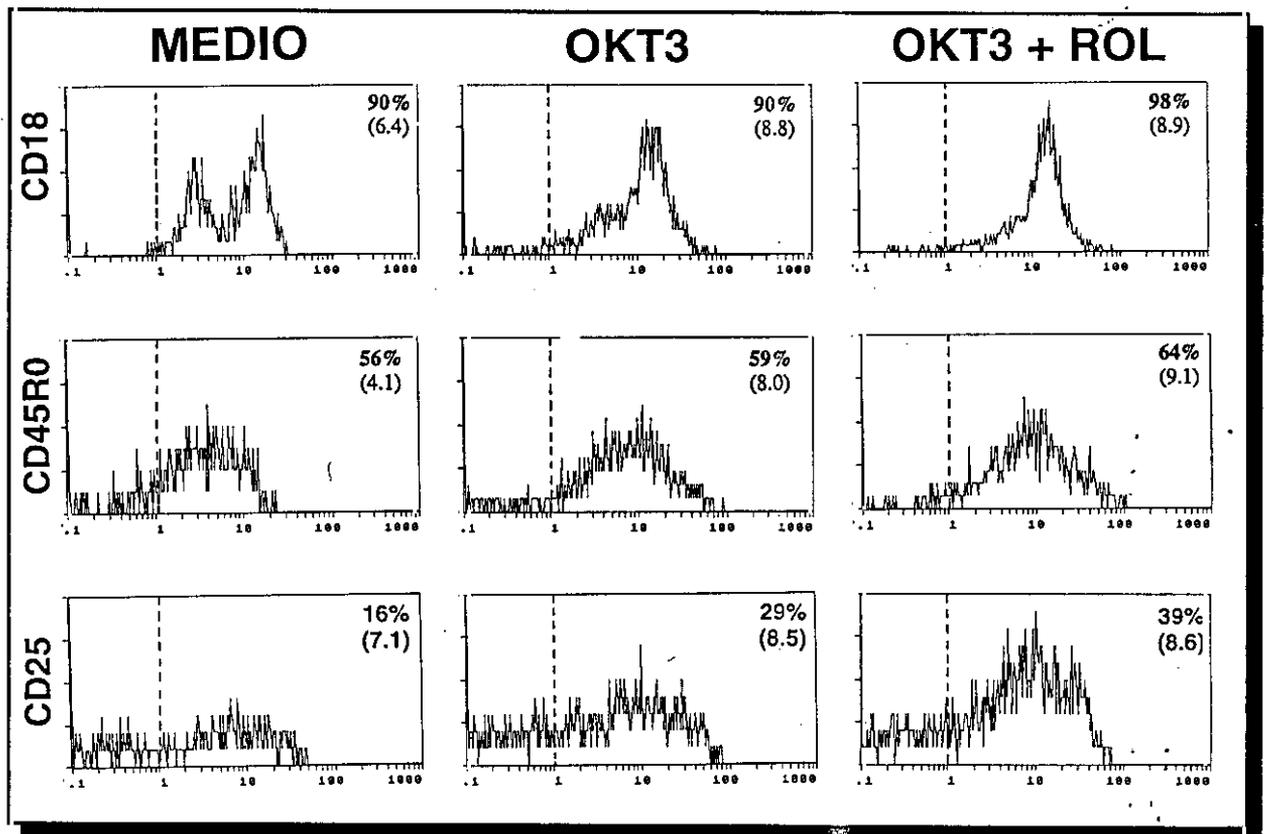


Figura 23. Análisis por citometría de flujo de marcadores de superficie de PBMC después de 3 días de cultivo mantenidas en diferentes condiciones: mantenidas en medio libre de suero (medio), estimuladas con OKT3 (OKT3) o con OKT3 y retinol  $10^{-7}$  M (OKT3+ROL). Los marcajes representados se han gateado sobre células  $CD3^+$ , mostrándose el porcentaje positivo y entre paréntesis la densidad media de expresión.

timocitos humanos donde el ácido retinoico media la inducción tanto de  $IL-2R\alpha$  y  $IL-2R\beta$  (Sidell, 1988; Sidell, 1993).

## V.7.- ESTADO INMUNOLOGICO DE LOS PACIENTES ANALIZADOS.

Para este estudio contamos con una serie de pacientes que se han diagnosticado de una inmunodeficiencia primaria o secundaria.

La inmunodeficiencia primaria es la alteración que afecta a algún compartimento que pertenece al sistema inmunológico, mientras que la inmunodeficiencia secundaria afecta a algún compartimento ajeno al sistema inmunológico pero que secundariamente es influenciado.

El estudio inmunológico realizado a los pacientes ha consistido:

- 1.- Análisis de las principales subpoblaciones linfocitarias
- 2.- Estudio de activación celular linfocítica
- 3.- Estudio de inmunidad humoral

### 1.- Análisis de subpoblaciones linfocitarias

Respecto a las subpoblaciones linfocitarias se evaluaron los marcadores principales (CD) de linfocitos T, B y NK (Tabla 16):

#### 1.1.- Linfocitos T

Hay una acusada disminución del porcentaje de células CD3 tanto en WAS como en CD3 $\gamma^-$ ; en WAS es acosta fundamentalmente de la disminución del porcentaje de células CD8 y en CD3 $\gamma^-$  es debido a la disregulación del número de células CD4 (afectando gravemente también a las subpoblaciones CD4RA y CD4RO) y CD8, como se manifiesta en el elevado cociente CD4/CD8.

En dos enfermos de Papillon-Lefèvre (SPL-1 y SPL-3) se encuentra disminuida la subpoblación CD4 $^+$ CD45RO $^+$ , que es característico de este tipo de patología. Y en AN encontramos una disminución de células vírgenes (CD4 $^+$ CD45RA $^+$ ) y un cociente CD4/CD8 disminuido, que también es un hecho común a este tipo de malnutrición.

#### 1.2.- Linfocitos B

Lo más importante es la ligera disminución del porcentaje de linfocitos B (CD19) en los

Tabla 16. porcentaje de las principales subpoblaciones linfocitarias en las inmunodeficiencias analizadas.

CD/Paciente	ICV-1	ICV-2	ICV-3	WAS	CD3 $\gamma$	SPL-1	SPL-2	SPL-3	AN	RANGO
<i>Linfocitos T</i>										
CD2	78	84	84	65	65	76	77	82	80	60-90%
CD3	73	77	80	49	59	69	68	68	75	68-80%
CD4	39	49	46	35	54	41	47	46	42	35-48%
CD4RA	30	39	35	24	2	27	28	35	15	18-37%
CD4RO	9	10	9	10	52	12	18	8	25	5-17%
CD8	26	25	34	14	6	26	19	20	30	20-27%
CD4/CD8	1,5	2	1,4	2,5	9	1,6	2,5	2,3	1,4	1,5-3,0
<i>Linfocitos B</i>										
HLA-DR	8	9	8	15	24	10	17	15	14	8-19%
CD19	7	9	9	10	18	13	18	13	10	10-17%
<i>Linfocitos NK</i>										
CD57	6	2	3	19	5	5	3	6	5	1 - 5%
CD16	15	8	4	27	8	9	6	9	8	2 - 8%

tres pacientes con inmunodeficiencia común variable (ICV).

### **1.3.- Linfocitos NK**

El número de linfocitos NK permanece normal excepto en dos pacientes (ICV-1 y WAS) donde están claramente elevados.

### **2.- Estudio de activación celular linfocítica**

Se observa como los pacientes diagnosticados de inmunodeficiencias más graves (ICV, WAS, CD3 $\gamma$ <sup>-</sup>) presentan graves defectos de proliferación celular frente a los mitógenos y antígenos testados, afectando prácticamente a todas las vías de activación de la célula T. Por el contrario, en el resto de los pacientes analizados las alteraciones en la activación linfocítica son mucho más leves (Tabla 17).

### **3.- Estudio de inmunidad humoral**

Al igual que en el caso anterior aquellos pacientes con inmunodeficiencias más graves (ICV, WAS y CD3 $\gamma$ <sup>-</sup>) son los que sufren mayores alteraciones en la inmunidad humoral, presentando alteraciones muy importantes en la síntesis de inmunoglobulinas. El resto de pacientes tienen alguna alteración no significativa (Tabla 18).

**Tabla 17: Respuesta proliferativa en las inmunodeficiencias analizadas (c.p.m.x10<sup>-3</sup>).**

Estímulo	ICV-1	ICV-2	ICV-3	WAS	CD3 $\gamma$	SPL-1	SPL-2	SPL-3	AN	RANGO
Control	0,5	0,7	0,4	0,3	0,6	0,7	0,9	0,7	0,7	<2,2
EA	5,0	22,1	5,9	8,5	73,5	15,7	202,6	37,7	40,2	>9,0
EC1	1,2	4,1	1,3	1,9	86,7	18,4	1,8	-	24,5	>6,0
CD3	0,9	2,3	1,8	2,7	29,6	43,3	15,5	19,2	38,1	>12,0
CD3+IL-2	20,7	20,6	3,1	33,1	46,2	29,8	56,8	30,9	49,2	>20,0
CD3+PMA	16,5	16,2	10,9	15,3	1,4	73,2	157,5	50,0	49,1	>30,0
CD3+CD28	12,4	2,1	2,4	2,5	37,1	35,0	62,6	23,7	70,7	>20,0
CD28+PMA	27,3	37,9	15,5	6,5	2,5	88,7	172,8	54,8	41,2	>25,0
CD26+PMA	12,1	36,5	10,4	33,9	1,5	72,2	128,1	-	31,4	>35,0
CD69+PMA	24,4	17,0	17,6	9,1	1,5	36,4	101,3	-	41,1	>15,0
PHA	29,9	8,7	8,2	60,3	7,6	154,3	24,6	6,6	43,9	>25,0
ConA	112,5	67,9	109,3	3,9	28,7	211,6	280,3	-	136,2	>25,0
PWM	11,4	15,4	5,7	4,7	18,5	8,6	21,6	15,5	14,9	>8,0

**Tabla 18. Inmunidad humoral en los inmunodeficientes analizados.**

	ICV-1	ICV-2	ICV-3	WAS	CD3 $\gamma$	SPL-1	SPL-2	SPL-3	AN	RANGO
<b>IgG</b>	477	632	472	156	587	1190	1100	825	620	650-1.400
<b>IgA</b>	<7	8	<7	45	171	274	103	348	205	65-350
<b>IgM</b>	10	22	14	19	57	124	193	111	111	55-200
<b>C3</b>	117	93	170	79	98	75	-	123	91	80-170
<b>C4</b>	27	17	47	<10	18	37	-	24	16	15-40
<b>CH100</b>	512	<112	-	555	-	-	-	-	497	300-770

Los resultados de las Inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) y del complemento (C3 y C4) se expresan en mg/dL, mientras que las unidades de CH100 en unidades de CH100/dL.

### V.8.- EFECTO DEL RETINOL SOBRE LA ACTIVACION CELULAR LINFOCITICA EN LOS INMUNODEFICIENTES.

El efecto del retinol se ha evaluado "in vitro" sobre la proliferación de PBMCs de 9 niños que padecen algún tipo de inmunodeficiencia bien caracterizada, se han utilizado exactamente las mismas condiciones de cultivo que para poner a punto el sistema de retinol (concentración de retinol  $10^{-7}$ M, adición 48 horas tras el inicio del cultivo en 3 dosis una cada 12 horas).

A la vista de los resultados se puede concluir que el retinol no tiene ningún efecto adicional en la proliferación inducida por OKT3 en los pacientes en los que existe un defecto en la vía de activación a través de CD3 (3 ICV, WAS, y  $CD3\gamma^-$ ) debido a su mecanismo de actuación a través de esta vía; por el contrario, en el resto de pacientes diagnosticados de inmunodeficiencias (3 SPL y AN) el retinol si tuvo un efecto adicional importante en el aumento de proliferación de las PBMC estimuladas con OKT3. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 19.

**Tabla 19. Efecto del retinol en la proliferación de PBMCs de pacientes diagnosticados de diferentes inmunodeficiencias (c.p.m. x  $10^{-3}$ ).**

Paciente	OKT3	OKT3+ROL
ICV-1	0,9	0,8
ICV-2	2,4	2,5
ICV-3	0,4	0,5
WAS	1,2	1,6
$CD3\gamma^-$	29,6	28,5
SPL-1	43,3	87,5
SPL-2	15,5	32,3
SPL-3	19,2	52,3
AN	38,1	91,1
Controles sanos	38,4±26,0	61,1±39,0

### V.9.- EFECTO DEL RETINOL EN LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LAS LINEAS T-HVS.

El efecto co-estimulador del retinol obtenido en PBMCs estimuladas con OKT3 se ha intentado confirmar sobre otro modelo celular, para ello los linfocitos T se infectaron con el herpes virus saimiri (HVS) obteniendo líneas celulares T que permanecen en continuo crecimiento en un medio dependiente de IL-2.

Para ello y como en el caso de las PBMC, se cuantificó la respuesta proliferativa de estas líneas T-HVS cuando se estimularon con anti-CD3 (pegado a placa) en presencia y ausencia de retinol. Fue necesario la utilización de un anticuerpo monoclonal anti-CD3 pegado a placa (IOT3b) ya que en esta línea celular carecemos de células presentadoras, por lo que el proceso de presentación debe ser mimetizado mediante la unión a placa del anticuerpo monoclonal.

Para cuantificar la proliferación celular se testaron 3 concentraciones diferentes de IOT3b pegado (100 ng, 50 ng y 25 ng por pocillo), se comprobó que la dosis que mayor proliferación producía era 100 ng empleandola sólo como en presencia de retinol (Tabla 20).

El efecto proliferativo del retinol sobre las líneas celulares T-HVS se produce añadiendo el retinol desde el comienzo del cultivo en 2 dosis independientes cada 12 horas.

**Tabla 20. Proliferación celular de las líneas T-HVS a distintas concentraciones de IOT3b (c.p.m. x 10<sup>-3</sup>).**

Línea [IOT3b]	HVS-1		HVS-2		HVS-3		HVS-4		HVS-5	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
100 ng	21,4	64,4	11,8	82,9	14,5	43,7	29,9	90,7	8,3	28,1
50 ng	20,8	53,1	7,8	24,7	6,2	22,6	24,6	38,7	4,8	11,9
25 ng	19,0	47,6	6,9	12,9	3,6	20,6	35,9	28,2	5,8	7,8

- representa la no adición de retinol y + la coestimulación empleando retinol 10<sup>-7</sup> M

En la figura 24 se representa la estimulación de las células T-HVS con 100 ng de IOT3b por pocillo en presencia y ausencia de retinol observando claramente el efecto coestimulador del retinol en las líneas T-HVS respecto a los linfocitos T-HVS sin coestimar.

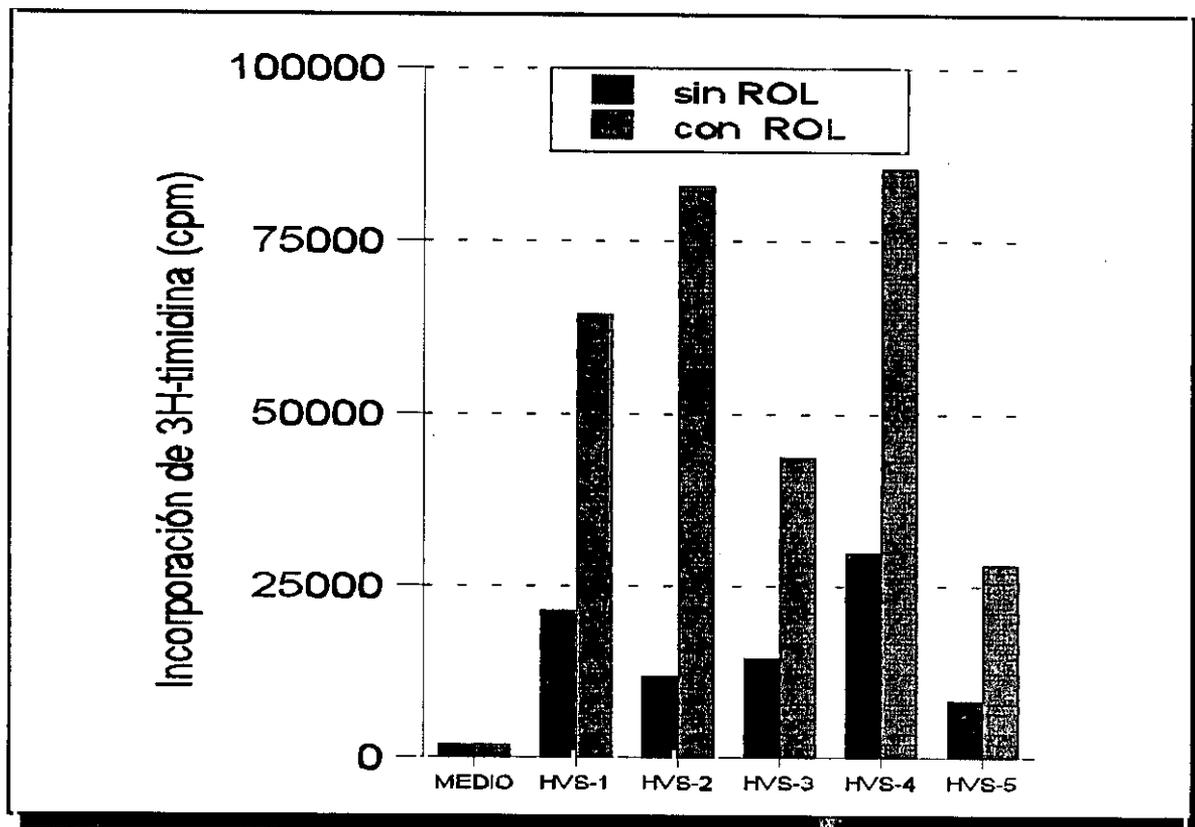


Figura 24. Respuesta proliferativa de 5 líneas control de linfocitos T-HVS estimulados con 100 ng de IOT3b en presencia y ausencia de retinol (c.p.m.).

### V.10.- SÍNTESIS DE RNAs ESPECÍFICOS DE RECEPTORES NUCLEARES DE RETINOIDES EN LAS LINEAS T-HVS.

Una vez comprobado que el modelo celular T-HVS era válido y cumplía los requerimientos necesarios, se empleó para estimar la síntesis de RNAs específicos de receptores nucleares de retinoides.

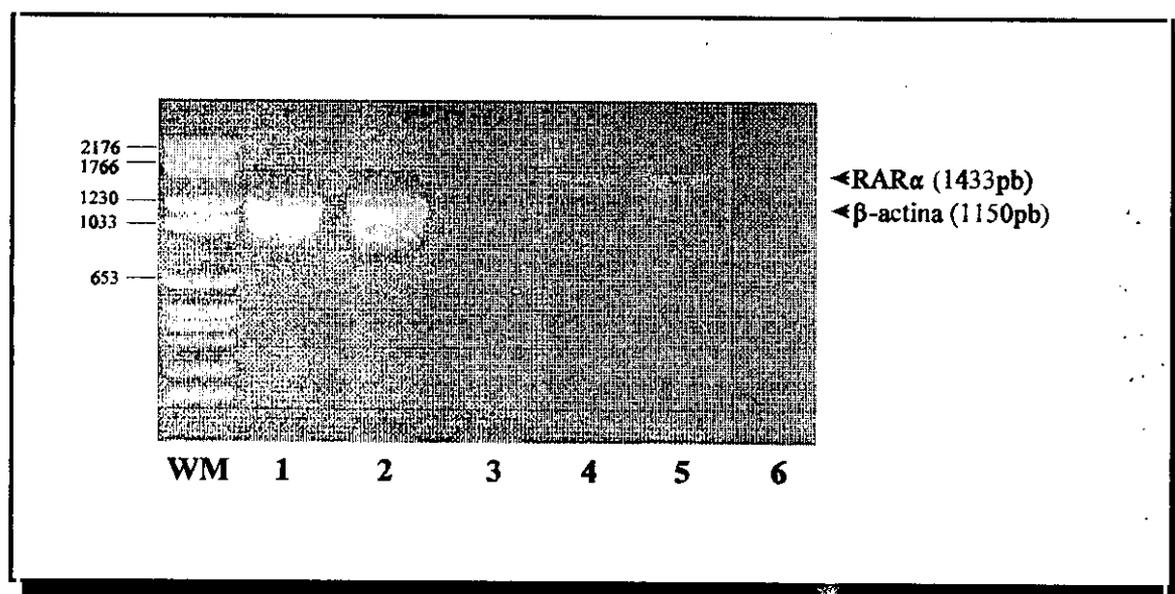


Figura 25. Amplificación por PCR de transcritos de RAR $\alpha$  en líneas T-HVS en ausencia (4) y en presencia (5) de retinol  $10^{-7}$  M, respecto a un gen no inducible por retinol como es la  $\beta$ -actina. Las calles 3 y 6 representan los controles negativos de amplificación. WM: marcador de peso molecular.

Se quería comprobar sobre esta línea celular si la coestimulación con retinol induce la síntesis de mensajeros para los receptores nucleares de retinoides; en este caso no fue necesario la estimulación con anti-CD3 al tratarse estas líneas celulares de cultivos que están continuamente activados debido a su crecimiento en un medio con IL-2. Para disminuir esta activación celular son mantenidas en reposo en un medio sin IL-2 durante una semana, de esta forma se imita el efecto del anticuerpo anti-CD3.

Como se presenta en la figura 25, se ha conseguido la inducción del mensajero del receptor nuclear RAR $\gamma$ , con lo cual el retinol puede tener capacidad de estimular la síntesis de mensajeros específicos para su propio mecanismo de acción. En el resto de receptores nucleares

probados no se observó ningún efecto por lo que se cree que debe de existir algún mecanismo de control negativo que regule este proceso para que no se produzca un continuo disparo de la transcripción de los genes regulados a través de este mecanismo como es el caso de la transrepresión producida a nivel de la piel (Fisher, 1996).

## ***VI.- DISCUSIÓN***

En el presente trabajo, se ha estudiado el efecto del retinol en la vía de activación CD3 en PBMC y en líneas T-infectadas con el herpes virus saimiri de un panel de individuos sanos y de pacientes diagnosticados de diversas inmunodeficiencias.

Recientemente en numerosas publicaciones se ha evaluado el efecto del retinol sobre una gran variedad de células inmunocompetentes incluyendo: timocitos (Garbe, 1992; Iwata, 1992), linfocitos T de ratón (Cantorna, 1994; Friedman, 1993; Racke, 1995), fibroblastos de pulmón humanos (Zitnik, 1994), timocitos humanos (Sidell, 1993) e hibridomas de células T (Iwata, 1992).

Aunque la acción de los retinoides sobre PBMC humanas ya se ha estudiado previamente, no se obtuvieron resultados suficientemente concluyentes (Abb, 1980; Sidell, 1981). En este trabajo se ha tratado de confirmar la colaboración del retinol en la vía de activación CD3 de los linfocitos T a través de la potenciación de la síntesis de IL-2 e IFN- $\gamma$  así como el aumento de expresión celular de diferentes marcadores de superficie implicados en la activación y adhesión de las células T.

#### **VI.1.- EL RETINOL ES UN CO-ESTIMULO IMPORTANTE EN LOS LINFOCITOS T ACTIVADOS ESPECIFICAMENTE VIA CD3.**

El papel coestimulador de los retinoides en la vía de activación CD3 de las PBMC se ha demostrado utilizando tanto retinol como ácido retinoico mostrándose el primero más eficaz, a pesar de que es el ácido retinoico o alguno de sus isómeros conocidos (ácido 9-cis retinoico y ácido 13-cis retinoico) el mediador último del efecto de los retinoides. La mejor funcionalidad del tratamiento con retinol también se ha demostrado en otros sistemas experimentales, como es a nivel de keratinocitos, donde el retinol muestra una mejor capacidad de ser transportado a la región subcelular correspondiente (epidermis inferior) (Chen, 1995).

Datos contradictorios a nuestro estudio se han publicados respecto a la elección del retinoide para la estimulación celular: el ácido retinoico no tuvo ningún efecto sobre timocitos de ratón (Garbe, 1992), pero sin embargo fue el retinoide utilizado para inducir el receptor de la IL-2 (la cadena  $\alpha$ ) sobre timoblastos humanos (Sidell, 1993). Además, ni el retinol ni el ácido retinoico han inducido ningún tipo de proliferación por si mismo en nuestras condiciones experimentales lo cual no concuerda con los resultados obtenidos en timocitos de ratón.

Los resultados obtenidos por otros grupos son ciertamente contradictorios entre sí y a su vez con los nuestros. Creemos, que no son comparables, por que el efecto de los retinoides (dada su altísima especificidad de acción) va a depender de: la especie animal utilizada, la línea celular o tejidos usados, el grado de diferenciación celular y la estrategia técnica utilizada (tipo de retinoide, dosis utilizada, tiempo de adición, medio de cultivo, tiempo de acción del retinoide...).

El medio de crecimiento utilizado también se ha mostrado fundamental en la activación de la célula T, en la mayoría de los casos se emplea un medio de crecimiento suplementado con FCS, ya que éste contiene toda una serie de factores de crecimiento y hormonas, necesarias para el crecimiento celular. Los componentes séricos esenciales incluyen a la albúmina que es importante en la estabilización y transporte de ácidos grasos y otros lípidos, la transferrina para la regulación del metabolismo del hierro e insulina para el control del metabolismo de carbohidratos. También el retinol se ha descrito como un factor importante del crecimiento de células B, aunque en este sentido los datos son contradictorios con otras publicaciones (Blomhoff, 1992; Buck, 1990).

A mediados de los años 50 se demostró que bajo ciertas circunstancias los medio sintéticos podían reemplazar a los medios suplementados con suero. Los medios de crecimiento libres de suero representan una herramienta importante que permiten el cultivo de células bajo unas condiciones definidas por una formulación concreta.

Estos medios están compuestos por toda una serie de nutrientes capaces de llevar a cabo la proliferación celular sin suplementación sérica. La formulación de estos medios de crecimiento contiene proteínas naturales y proteínas recombinantes purificadas, factores de crecimiento y extractos de órganos y tejidos.

El uso, en nuestro modelo experimental, de un medio de crecimiento adecuado (libre de suero y libre de cualquier forma de retinoide), un tiempo específico de adición de retinol al sistema y la evaluación de 32 individuos sanos así como 9 pacientes diagnosticados de diversas inmunodeficiencias, nos ha permitido establecer datos más concluyentes acerca del mecanismo de acción de los retinoides.

En nuestro caso, el uso de un medio de crecimiento libre de suero no impide la respuesta proliferativa vía CD3, aunque si es importante destacar que esta respuesta es menor en el medio AIM-V que en el medio suplementado con FCS (Tabla X). Esto podría ser explicado por la ausencia en nuestro medio de cultivo de algún componente importante en la activación de la célula T como podría ser el retinol o bien otros factores de crecimiento.

Se sabe que el retinol es utilizado por los linfocitos como precursor para uno o más derivados de retinoides intracelulares, que mediarían el efecto del retinol posiblemente a nivel de la transducción de señal. El análogo que tiene más importancia es el ácido retinoico, esta molécula derivada del retinol atraviesa el núcleo de las células blanco y se une a receptores específicos de ácido retinoico provocando un incremento de la transcripción de determinados genes inducibles por ácido retinoico debido a la presencia de RAREs en su promotor (figura del metabolismo).

La concentración óptima de retinol (y ácido retinoico) para la co-estimulación de PBMC se ha estimado experimentalmente en  $10^{-7}$  M, lo cual está en concordancia con los datos publicados previamente (Garbe, 1992).

En las condiciones experimentales ensayadas el uso del retinol junto con la estimulación

con anticuerpos anti-CD3 indujo una inhibición en la proliferación celular comparada con la obtenida con el anticuerpo sólo. Esta respuesta inhibitoria puede ser explicada por una acumulación tóxica de retinoides en el medio de cultivo debido a su no consumición por parte de CRBP o RAR. Por ello, se ha observado la necesidad de una estimulación previa del complejo TCR/CD3 antes de la adición del retinol para la funcionalidad del sistema, con lo que la adición del retinol se retrasó 48 horas tras la activación de CD3.

Se sabe que los diferentes mitógenos inducen en las células T vías de activación bioquímicamente diferentes (Regueiro, 1994), por una regulación positiva o negativa de segundos mensajeros. Por lo que se piensa, que la preactivación con anti-CD3 podría inducir la síntesis de receptores nucleares específicos de retinoides (RAR, RXR) que el ácido retinoico utilizaría para activar un gran número de genes por la unión a RAREs específicos en su región del promotor. Los resultados obtenidos en las líneas T-HVS también podrían explicar incluso que el retinol tuviera la capacidad de en pocas horas inducir la transcripción de los propios receptores específicos (RAR) para el ácido retinoico necesarios para su mecanismo de actuación.

La ausencia de un efecto significativo del retinol sobre PBMC preestimuladas con otras combinaciones mitogénicas aparte de CD3, se ha confirmado no sólo en las condiciones experimentales descritas sino también empleando concentraciones subóptimas de los diferentes estímulos. La especificidad del efecto sinérgico del retinol se ha testado con un panel de anticuerpos anti-CD3, mostrando en todos los casos, excepto para Leu-4, un efecto proliferativo aditivo del retinol. La coestimulación inducida por retinol se obtuvo para el resto de anticuerpos anti-CD3 a la concentración indicada a pesar del epítipo distinto reconocido.

A su vez, los resultados obtenidos en las PBMC se han confirmado utilizando otro modelo experimental como son las líneas T-HVS, donde el retinol también ha mostrado la capacidad de potenciar la vía CD3.

El retinol ha mostrado un sinérgismo significativo sobre la estimulación de PBMC

previamente activadas con anti-CD3 de entre una gran variedad de mitógenos y combinaciones mitogénicas ensayadas, siendo el máximo efecto conseguido cuando las células fueron preincubadas con anti-CD3 y menor efecto utilizando la combinación CD3+CD28. Por el contrario, se ha encontrado una inhibición significativa en células preactivadas con Concanavalina A.

Por otro lado, los ensayos de fragmentación de DNA realizados en PBMC han revelado que en nuestras condiciones experimentales el retinol mejora la proliferación celular en vez de inhibir la apoptosis inducida via CD3 (Bissonnette, 1995; Iwata, 1992; Yang, 1993) lo cual está relacionado con la inhibición de la expresión del mRNA de Fas Ligando sobre células T de ratón, células leucémicas e hibridomas tras la estimulación con retinoides (Yang, 1995a).

Fisiológicamente, la estimulación a través del TCR debe ser acompañada por una segunda señal, para evitar que la célula entre en anergia o apoptosis, en condiciones fisiológicas esta segunda señal es producida por la pareja B7/CD28. Mediante nuestro trabajo, se podría decir que el retinol tendría el efecto fisiológico de segunda señal en la activación de la célula T, aumentando la capacidad proliferativa vía CD3 mediante el incremento de la producción de IL-2 tanto a nivel de proteína como a nivel de la estabilidad de la vida media de los mensajeros producidos, así como de influir en la síntesis del receptor de la IL-2 aumentando el efecto proliferativo a través de la unión de la IL-2 con el receptor de alta afinidad (IL-2R $\alpha\beta\gamma$ ).

## **VI.2.- INDUCCION DE CITOCINAS Y MARCADORES DE ACTIVACION CELULAR**

El efecto de los retinoides en la inducción de citocinas específicas ha sido ampliamente investigada (Cantorna, 1994; Carman, 1991; Racke, 1995; Saxon, 1993; Villa, 1993; Zitnik, 1994) en diferentes modelos celulares con resultados contradictorios.

La mejora de la proliferación T vía CD3 inducida por el retinol puede ser explicada por una regulación positiva de la producción de IL-2 y/o IFN- $\gamma$ . En nuestro sistema experimental

se cuantificaron una serie de citocinas en PBMC activadas con OKT3 en presencia y ausencia y retinol, mostrándose un incremento no significativo en la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$ . También se ha comprobado en nuestro sistema celular un aumento en la producción de mensajeros de IL-2 e IFN- $\gamma$ , debido a la coestimulación con retinol que puede afectar tanto a la vida media como a la estabilidad de los mensajeros producidos. No estando estos resultados de acuerdo con los obtenidos en ratones deficientes en vitamina A, donde la producción de IL-2 (Cantorna, 1994) e IFN- $\gamma$  (Carman, 1991) se inhibe por el ácido retinoico.

Estos resultados contradictorios también sugieren que la acción del retinol es un complejo mecanismo de combinaciones de diferentes factores, entre los que se incluye la línea celular empleada y el tipo de retinoide. En nuestro sistema experimental, el retinol no afectó la producción de IL-4, IL-6 e IL-10; resultados similares se obtuvieron para la producción de IL-6 en fibroblastos de pulmón humanos (Zitnik, 1994), por el contrario el ácido retinoico parece inhibir la inducción de IL-2 e IFN- $\gamma$  y potenciar la inducción de IL-4 sobre linfocitos murinos (Racke, 1995).

Las moléculas de adhesión desempeñan un papel muy importante en la respuesta inmunológica, son las encargadas en las células polimorfonucleares de su unión a endotelio, la migración al tejido infectado y la unión al patógeno infectante.

En el caso de la expresión de una serie de moléculas importantes en el proceso de adhesión como son LFA-1 (Agura, 1992), ICAM-1 (Cilenti, 1995) y CD45 (Schiavone, 1995) el retinol se ha mostrado regulador del aumento de su producción en membrana.

La presencia constitutiva de LFA-1 en membrana no supone que sea activa, sino que es necesaria la estimulación de dicha molécula para su funcionalidad (Dustin, 1989), lo cual se ha comprobado tras la estimulación de PBMC con OKT3 donde la densidad molecular de CD18 aumenta más en las células estimuladas con OKT3 que en las células sin estimular y más aún al añadir retinol donde la gráfica se desplaza hacia alta densidad molecular (Figura X).

Otra molécula muy importante tanto a nivel de la activación de la célula T como de adhesión es CD45. Esta molécula se expresa en la superficie de todos los leucocitos (Saito, 1991), mostrando distintas capacidades de procesamiento alternativo en los exones que codifican para el dominio extracelular, formándose como consecuencia distintas moléculas que caracterizan distintas subpoblaciones de linfocitos (Smith, 1986). La isoforma CD45RO se expresa tanto en células activadas como en células de memoria.

CD45 juega un papel fundamental en la activación del linfocito T, interacciona con p56 lck y con p59 fyn, y concretamente desfosforila p56 lck que está asociada tanto a CD4 como CD8 induciendo su activación (Amrein, 1988). Entre las funciones de CD45 también destaca su participación en los procesos de adhesión celular donde se interrelaciona activamente con LFA-1 (Spertini, 1994). CD45 al igual que CD18 se ha mostrado también inducible al estimular con OKT3 y más aún al añadir retinol (Figura X).

El reconocimiento de un antígeno por parte de la célula T, dispara una serie de procesos que inicialmente provoca el aumento de afinidad de la célula T por la célula presentadora de antígenos como consecuencia de la activación de una serie de moléculas como son LFA-1, CD45, ICAM-1 y que finalmente concluye con la activación de la célula T.

Existen 2 vías principales de adhesión celular que implican tanto a LFA-1 y a CD2. La vía LFA-1 es mínima en células en reposo siendo rápidamente incrementada por la activación vía CD3 (Moingeon, 1991), mientras que la vía de adhesión CD2 es óptima en células en reposo no produciéndose cambios significativos tras la estimulación vía CD3 (Moingeon, 1989). El mecanismo de actuación de ambas vías puede darnos datos importantes de la forma de actuación del retinol en este sistema.

El retinol sinergiza con la primera vía de adhesión celular (vía LFA-1) aumentando la proliferación vía CD3, favoreciendo la expresión de CD18 y mejorando la expresión de ICAM-1 (molécula retinoico inducible). Sin embargo, el retinol parece alejarse de la segunda vía,

disminuye la proliferación vía CD2, y no se ha demostrado un aumento de expresión ni de densidad de la molécula de superficie CD2. Por lo que incluso se podría cuestionar el sinergismo en la vía de activación CD2 y CD3, pudiendo comprobar tanto con los datos de proliferación (CD3 y CD2) como de la inducción de expresión de los marcadores de superficie (CD18 y CD2) que el retinol influye de forma distinta en la señales reguladas por ambas vías (Altin, 1994).

En nuestro modelo experimental hemos simulado "in vitro" un proceso de presentación antigénica activando las PBMC con anticuerpos monoclonales anti-CD3 (vía CD3) y co-estimulando con retinol lo que supone:

- la estimulación con anticuerpos anti-CD3 equivale a la activación fisiológica por el antígeno presentado por el MHC, que ocurre de forma clonal.

- la co-estimulación con retinol supone la mejora de este proceso de presentación debido al aumento de expresión de marcadores de superficie de las células T (CD18, CD45RO, CD25) implicados en la adhesión celular y en la activación linfocítica. Por lo que el reforzamiento de la vía CD3 con la coestimulación con retinol puede llegar a ser importante terapéuticamente para una respuesta inmune óptima frente a una serie de patógenos que disparen la respuesta inmune celular.

### **VI.3.- TRATAMIENTO IN VITRO CON RETINOIDES EN DETERMINADAS INMUNODEFICIENCIAS.**

La confirmación que el retinol participa en el refuerzo de la vía CD3 se ha demostrado en las PBMC de pacientes diagnosticados de diferentes inmunodeficiencias. Los resultados muestran claramente que el retinol no colabora en el aumento de proliferación celular vía CD3 en aquellos pacientes que tienen afectada esta vía de activación, mientras que aquellos que no muestran alteraciones graves en esta vía el retinol si se mostró eficaz en su reforzamiento.

Por lo que en determinadas patologías (no asociadas intrínsecamente a defecto CD3) se

podría recomendar su utilización como terapia anti-infectiva.

Básicamente la co-estimulación con retinol supone la mejora del proceso de presentación debido: A) al aumento de expresión de marcadores de superficie de las células T (CD18, CD45RO, CD25) implicados en la adhesión celular y en la activación linfocítica. B) inducción de una serie de citocinas muy importantes en la regulación de la respuesta inmune. C) aumento en la capacidad proliferativa de la célula T, específicamente vía CD3.

## ***VII.- CONCLUSIONES***

1.- *Se ha puesto a punto un sistema "in vitro" para el estudio de la acción de los retinoides en linfocitos periféricos humanos.*

2.- *Se ha observado que el retinol (y en menor medida el ácido retinoico) es un importante cofactor en la estimulación de linfocitos T previamente activados vía CD3. Este efecto podría estar mediado por la inducción de receptores nucleares de ácido retinoico específicos (RAR $\gamma$ ) como se ha observado en líneas T humanas immortalizadas por el herpes virus saimiri.*

3.- *Se ha demostrado que el retinol induce una auténtica proliferación en células previamente activadas vía CD3 y no inhibe la posible apoptosis mediada por esta vía.*

4.- *El aumento de proliferación inducido por retinol, sobre células activadas vía CD3 está mediado por al menos dos mecanismos: la inducción de la expresión en superficie de moléculas de activación/adhesión (CD18, CD45RO, CD25) y el aumento en la síntesis de interleucinas tipo Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ).*

5.- *El retinol pierde sus efectos potenciadores en la activación de linfocitos T en pacientes con inmunodeficiencias primarias que tienen defectos estructurales o funcionales de la vía CD3. En cambio, sigue sinergizando con los monoclonales anti-CD3 en aquellas inmunodeficiencias (primarias o secundarias) que no tienen alterada esta vía de activación. Por tanto, podría emplearse en la terapéutica de éstas últimas, como un inmunopotenciador.*

## ***VIII.- BIBLIOGRAFIA***

## A

Abb J and Deinhardt F. Effects of retinoic acid on the human lymphocyte response to mitogens. *Exp. Cell. Biol.*, 1980; **48**: 169-172.

Abb J, Abb H and Deinhardt F. Retinoic acid suppression of human leucocyte interferon production. *Immunopharmacol.*, 1982; **4**: 303.

Agura ED, Howard M and Collins SJ. Identification and sequence analysis of the promoter for the leukocyte integrin  $\beta$ -subunit (CD18): a retinoic acid-inducible gene. *Blood* 1992; **79**: 602-609.

Ahmed F, Jones DB and Jackson AA. Effect of vitamin A deficiency on the immune response to epizootic diarrhoea of infant mice (EDIM) rotavirus infection in mice. *Br. J. Nutr.*, 1991; **65**: 475-485.

Alcover A, Weiss MJ, Daley JF and Reinherz EL. The T11 glycoprotein is functionally linked to a calcium channel in precursor and mature T-lineage cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986; **83**: 2614-2618.

Alcover A, Alberini C, Acuto O, Clayton LK, Transy C, Spagnoli G, Moingeon P, López P and Reinherz EL. Interdependence of CD3-Ti and CD2 activation pathways in human T lymphocyte. *EMBO J.*, 1988; **7**: 1973-1977.

Alexander DR and Cantrell DA. Kinases and phosphatases in T-cell activation. *Immunol Today* 1989; **10**: 200-205.

Altin JG, Pagler EB and Parish CR. Evidence for cell surface association of CD2 and LFA-1 (CD11a/CD18) on T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 1994; **24**: 450-457.

Allegretto EA, Mc Clurg MR, Lazarchik SB, Clemm DL, Kerner SA, Elgort MG, Boehm MF, White SK, Pike JW and Heyman RA. Transactivation properties of retinoic acid and retinoid X receptors in mammalian cells and

yeast. Correlation with hormone binding and effects of metabolism. *J. Biol. Chem.*, 1993; **268**: 26625-26633.

Allison J. CD28-B7 interactions in T-cell activation. *Curr. Opin. Immunol.*, 1994; **6**: 414-419.

Allison J and Krummel M. The Ying and Yang of T cell costimulation. *Science* 1995; **270**: 932-933.

Amrein KE and Sefton BM. Mutation of a site of tyrosine phosphorylation in the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase, p56<sup>lck</sup>, reveals its oncogenic potential in fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; **85**: 4247-4251.

Andersson RA, Bird AG, Britton S and Palacios R. Humoral and cellular immunity in humans studied at the cell level from birth to two years of age. *Immunol. Rev.*, 1981; **57**: 5-38.

Arpaia E, Shahar M, Dadi H, Cohen A, and Roifman CM. Defective T cell receptor signaling and CD8<sup>+</sup> thymic selection in humans lacking Zap-70 kinase. *Cell* 1994; **76**: 947-958.

Ashwell JD and Klausner RD. Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, 1990; **8**: 139-167.

## B

Bagnasco M, Nunes J, López M, Cerdan CH, Pierrès A, Mawas C and Olive D. T cell activation via the CD2 molecule is associated with protein kinase C translocation from the cytosol to the plasma membrane. *J. Immunol.*, 1989; **19**: 823-827.

Ballow M, Wang W and Xiang S. Modulation of B-cell immunoglobulin synthesis by retinoic acid. *Clin. Immunol. Immunopath.*, 1996; **80**: S73-S80.

Baroja ML, Ceuppens JL, Van Damme

- J and Billian A. Cooperation between an anti-T cell (anti-CD28) monoclonal antibody and monocyte-produced IL-6 in the induction of T cell responsiveness to IL-2. *J. Immunol.*, 1988; **141**: 1502-1507.
- Baroja ML, Lorre K, Van Vaeck F and Ceuppens JL. The anti-T cell monoclonal antibody 9.3 (anti-CD28) provides a helper signal and bypasses the need for accessory cells in T cell activation with immobilized anti-CD3 and mitogens. *Cell Immunol.*, 1989; **120**: 205-217.
- Bauer A, Mc Conkey DJ, Howard FD, Clayton LK, Novick D, Koyasu S and Reinherz EL. Differential signal transduction via the T-cell receptor CD3 $\zeta\zeta$ , CD3 $\zeta\eta$  and CD3 $\eta\eta$  isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; **88**: 3842-3846.
- Båvick CO, Ericksson U, Allen RA and Peterson PA. Identification and partial characterization of a retinal pigment epithelial membrane receptor for plasma retinol-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 1991; **266**: 14978-14985.
- Benbrook D, Lernhardt E and Pfahl M. A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1988; **333**: 669-672.
- Bergman R and Friedman-Biernebaum R. Papillon-Lefèvre syndrome: a study of the long term clinical course of recurrent pyogenic infections and the effects of etretinate treatment. *Br. J. Dermatol.*, 1988; **119**: 731-736.
- Berridge MJ and Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989; **341**: 197-205.
- Bierer BE, Peterson A, Gorga JC, Herrmann SH and Burakoff SJ. Synergistic T cell activation via the physiological ligands for CD2 and the T cell receptor. *J. Exp. Med.*, 1988; **168**: 1145-1156.
- Bierer BE, Bogart RE and Burakoff SJ. Partial deletions of the cytoplasmic domain of CD2 result in a partial defect in signal transduction. *J. Immunol.*, 1990; **144**: 785-789.
- Bierer BE and Hahn WC. T cell adhesion, avidity regulation and signaling: a molecular analysis of CD2. *Semin. Immunol.*, 1993; **5**: 249-261.
- Bissonnette RP, Mc Gahan A, Mahboubi A and Green DR. Functional Myc-Max heterodimer is required for activation-induced apoptosis in T cell hybridomas. *J. Exp. Med.*, 1995; **180**: 2413-2418.
- Blaner WS. Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocrin. Rev.*, 1989; **10**: 308-316.
- Bloem MW, Wedel M and Egger RJ. Mild vitamin A deficiency and risk of respiratory tract diseases and diarrhea in preschool and school children in northeastern Thailand. *Am. J. Epidemiol.*, 1990; **131**: 332-339.
- Blomhoff R, Holte K, Naess L and Berg T. Newly administered [3H] retinol is transferred from hepatocytes to stellate cells in liver for storage. *Exp. Cell. Res.*, 1984; **150**: 186-193.
- Blomhoff R, Eskild W, Kindberg GM, Prydz K and Berg T. Intracellular transport of endocytosed chylomicron [3H] retinyl ester in rat liver parenchymal cells. Evidence for translocation of a [3H] retinoid from endosomes to endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 1985; **260**: 13566-13570.
- Blomhoff R, Green MH, Berg T and Norum KR. Transport and storage of vitamin A. *Science* 1990; **250**: 399-404.
- Blomhoff R, Green MH, Berg T and Norum KR. Vitamin A metabolism: New perspectives on absorption, transport and storage. *Physiol. Rev.*, 1991; **71**: 952-990.
- Blomhoff HK, Smeland EB, Erikstein B, Rasmussen AM, Skrede B, Skjonsberg C and Blomhoff R. Vitamin A is a key regulator for cell growth, cytokine production and differentiation in normal B cells. *J. Biol. Chem.*, 1992; **267**: 23988-23992.
- Boerman MHEM and Napoli JL. Cholate-independent retinyl ester hydrolysis. *J.*

*Biol. Chem.*, 1991; **266**: 22273-22278.

Bollag W and Holdener EE. Retinoids in cancer prevention and therapy. *Ann. Oncol.*, 1992; **3**: 513-526.

Boncinelli E, Simeone A, Acampora D and Mavilio F. HOX gene activation by retinoic acid. *Trends Genet.*, 1991; **10**: 329-334.

Borroni G, Pagani T, Carcaterra A. Immunological alterations in a case of Papillon-Lefèvre syndrome with recurrent cutaneous infections. *Dermatologica* 1985; **170**: 27-30.

Bowman TA, Goonewardene IM, Pasatiempo AC and Taylor CE. Vitamin A deficiency decreases natural killer cell activity and interferon production in rats. *J. Nutr.* 1990; **120**: 1264-1273.

Boylan L and Stein ZA. The epidemiology of HIV infection in children and their mothers-vertical transmission. *Epidemiol. Rev.*, 1991; **13**: 143-147.

Boyle JO. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res.*, 1993; **53**: 4477-4480.

Buck JL, Dannecker L, Viswanathan K, Cohen SL, Chait BT and Hämmerling U. Retinol is essential for growth of activated human B cells. *J. Exp. Med.*, 1990; **171**: 1613-1624.

Buck J, Myc A, Garbe A and Cathomas G. Differences in the action and metabolism between retinol and retinoic acid in B lymphocytes. *J. Cell. Biol.*, 1991; **115**: 851-859.

## C

Callender T. PRAD-1 (CCND1)/Cyclin oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer* 1994; **74**: 152-158.

Cantorna M, Nashold FE and Hayes CE. In vitamin A deficiency multiple mechanisms establish a regulatory T helper cell imbalance with excess Th1 and insufficient Th2 function.

*J. Immunol.*, 1994; **152**: 1515-1522.

Cantorna M, Nashold FE and Hayes CE. Vitamin A deficiency results in a priming environment conducive for Th1 cell development. *Eur. J. Immunol.*, 1995; **25**: 1673-1679.

Cantrell D. G proteins in lymphocyte signalling. *Curr. Opin. Immunol.*, 1994; **6**: 380-384.

Care A, Testa U, Bassani A, Tritarelli E, Montesoro E, Samoggia P, Cianetti L and Peschle C. Coordinate expression and proliferative role of Hox B genes in activated adult T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.*, 1994; **14**: 4872-4877.

Carman J and Hayes C. Abnormal regulation of IFN- $\gamma$  secretion in vitamin A deficiency. *J. Immunol.*, 1991; **147**: 1247-1252.

Carmo AM, Mason DW and Beyers AD. Physical association of the cytoplasmic domain of CD2 with the tyrosine kinases p56<sup>lck</sup> and p59<sup>lyn</sup>. *Eur. J. Immunol.*, 1993; **23**: 2186-2201.

Carter L and Dutton R. Type 1 and Type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.*, 1996; **8**: 336-342.

Carrera AC, Rincón M, Sánchez-Madrid F, López-Botet M and De Landázuri MO. Triggering of comitogenic signals in T cell proliferation by anti-LFA-1 (CD18, CD11a), LFA-3 and CD7 monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 1988; **141**: 1919-1924.

Chan AC, Irving BA, Fraser JD and Weiss A. The  $\zeta$  chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with Zap-70, a 70-Kd Mr tyrosine phosphoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; **88**: 9166-9170.

Chan AC, Iwashina M, Turck CW and Weiss A. Zap-70: a 70 kd protein tyrosine kinase that associates with the TCR  $\zeta$  chain. *Cell* 1992; **71**: 649-662.

Chan AC, Kadlcek TA, Elder ME,

Filipovich AH, Kuo WL, Iwashima M, Parslow TG and Weiss A. Zap-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* 1994; **264**: 1599-1601.

Chan A and Shaw A. Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Curr. Opin. Immunol.*, 1996; **8**: 394-401.

Chatila TA and Geha RS. Phosphorylation of T cell membrane proteins by activators of protein kinase C. *J. Immunol.*, 1988; **140**: 4308-4314.

Chatila TA, Silverman L, Miller R and Geha RS. Mechanism of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J. Immunol* 1989; **143**: 1283-1289.

Chen S, Ostrowski J, Whiting G, Roalsvig T, Hammer L, Currier S, Honeyman J, Kwasniewski B, Yu KL and Sterzycki R. Retinoic acid receptor gamma mediates topical retinoid efficacy and irritation in animal models. *J. Invest. Dermatol.*, 1995; **104**: 779-783.

Chilson OP and Kelly-Chilson AE. Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 1989; **19**: 389-396.

Cilenti L, Toniato E, Ruggiero P, Fusco C, Farina AR, Tiberio A, Hayday AC, Gulino A, Frati L and Martinotti S. Transcriptional modulation of the human intercellular adhesion molecule gene 1 (ICAM-1) by retinoic acid in melanoma cells. *Exp. Cell. Res.*, 1995; **218**: 263-270.

Cippitelli M, Ye J, Viggiano V, Sica A, Ghosh P, Gulino A, Santoni A and Young HA. Retinoic acid-induced transcriptional modulation of the human interferon- $\gamma$  promoter. *J. Biol. Chem.*, 1996; **271**: 26783-26793.

Clarke CL, Graham J, Roman SD and Sutherland RL. Direct transcriptional regulation of the progesterone receptor by retinoic acid diminishes progesterone responsiveness in the breast cancer cell line T-47D. *J. Biol. Chem.*, 1991; **266**: 18969-18975.

Cohen M, Rubinstein A, Li JK and Nathanson G. Thymic hypoplasia associated with isotretinoin embryopathy. *Am. J. Dis. Child.*, 1987; **141**: 263-266.

Collins T, Kassner P, Bierer B and Burakoff J. Adhesion receptors in lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.*, 1994; **6**: 385-393.

Cooke MP, Abraham KM, Forbush KA and Perlmutter RH. Regulation of T cell receptor signaling by a src family protein-tyrosine kinase p59 fyn. *Cell* 1991; **65**: 281-291.

Crabtree GR. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 1989; **243**: 355-361.

## D

Dai WS, La Braico JM and Stern RS. Epidemiology of isotretinoin exposure during pregnancy. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1992; **26**: 599-606.

D'Ambrosia D, Cantrell DA, Frati L, Santoni A, Testi R. Involvement of p21ras in T cell CD69 expression. *Eur. J. Immunol.*, 1994; **24**: 616-620.

Damle NK, Linsley PS and Ledbetter JA. Direct helper T cell-induced B cell differentiation involves interaction between T cell antigen CD28 and B cell activation antigen B7. *Eur. J. Immunol.*, 1991; **21**: 1277-1282.

Dang NH, Hafler DA, Schlossman SF and Breitmeyer JB. Fc-R-mediated crosslinking of Tal (Cdw26) induces human T lymphocyte activation. *Cell Immunol.*, 1990; **125**: 42-57.

de Grazia U, Felli MP, Vacca A, Farina AR, Maroder M, Cappabianca L, Mecco D, Farina M, Screpanti I, Frati L and Gulino A. Positive and negative regulation of the composite octamer motif of the interleukin 2 enhancer by AP-1, OCT-2 and retinoic acid receptor. *J. Exp. Med.*, 1994; **180**: 1485-1497.

deGroot RP, Pals C and Kruijer.

Transcriptional control of c-jun by retinoic acid. *Nucleic Acids Res.*, 1991; **19**: 1585-1591.

DeLuca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis and neoplasia. *FASEB J.*, 1991; **5**: 2924-2933.

De Palo G, Veronesi U, Camerini T, Formelli F, Mascotti G, Boni C, Fosser V, Del Vecchio M, Campa T, Costa A and Marubini E. Can fenretinide protect women against ovarian cancer? *J Natl Cancer Inst.*, 1995; **87**: 146-147.

de Pee S and West CE. Dietary carotenoids and their role in combating vitamin A deficiency: a review of the literature. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1996; **50**: S38-S53.

Depper JM, Leonard WJ, Drogula C, Kronke M, Waldmann TA and Greene WC. Interleukin-2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985; **82**: 4230-4234.

de Thé H, Vivanco-Ruiz M, Tiollais P, Stunnenberg H and Dejean A. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor  $\beta$  gene. *Nature* 1990; **343**: 177-180.

Dianzani U, Shaw A, Al-Ramadi BK, Kubo RT and Janeway CH. Physical association of CD4 with the T cell receptor. *J. Immunol.*, 1992; **148**: 678-688.

Dillehay DL, Walia AS and Lamon EW. Effects of retinoids on macrophage function and IL-1 activity. *J. Leukocyte Biol.*, 1988; **44**: 353-360.

Doucr D and Koeffler HP. Retinoic acid enhances growth of human early erythroid progenitor cells in vitro. *J. Clin. Invest.*, 1982; **69**: 1039-1041.

Driban NE and Jung JR. Treatment of Papillon-Lefèvre syndrome with etretinate. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1988; **18**: 583-584.

Dupuy P, Bagot M, Heslan M and Dubertret L. Synthetic retinoids inhibit the antigen presenting properties of epidermal cells in vitro. *J. Invest. Dermatol.*, 1989; **93**: 455-459.

Durand B, Saunders M, Leroy P, Leid M and Chambon P. All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. *Cell* 1992; **71**: 73-85.

Dustin ML, Sanders ME, Shaw S and Springer TA. Purified lymphocyte function associated antigen 3 binds to CD2 and mediates T lymphocyte adhesion. *J. Exp. Med.*, 1987; **165**: 677-692.

Dustin ML, and Springer TA. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 1989; **341**: 619-624.

## E

Elder ME, Lin D, Clever J, Chan AC, Hope TJ, Weiss A and Parslow TG. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in Zap-70, a T cell tyrosine Kinase. *Science* 1994; **264**: 1596-1599.

Eppinger TM, Buck J and Hammersling U. Growth control or terminal differentiation: endogenous production and differential activities of vitamin A metabolites in HL-60 cells. *J. Exp. Med.*, 1993; **178**: 1995-2005.

Evans R. The steroid and thyroid hormone receptor family. *Science* 1988; **240**: 889-895.

## F

Fahlman C, Jacobsen SE, Smeland E, Lomo J, Naess CE, Funderud S and Blomhoff HK. All-trans and 9 cis retinoic acid inhibit growth of normal human and murine B cell precursors. *J. Immunol.*, 1995; **155**: 58-65.

Fanjul A, Dawson M, Hobbs P, Jong L, Cameron J, Harlev E, Graupner G, Xian-Ping L and Pfahl M. A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature* 1994; **372**: 107-111.

Felli MP, Vacca A, Meco D, Screpatini I, Farina AR, Maroder M, Martinottis R, Petrangeli E, Frati L and Gulino A. Retinoic acid-induced down-regulation of the interleukin-2 promoter via cis-regulatory sequences containing an octamer motif. *Mol. Cell. Biol.* 1991; **11**: 4771-4778.

Field JK. Elevated expression of the c-myc oncoprotein correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 1989; **4**: 1463-1468.

Fischer A. Severe combined immunodeficiencies. *Immunodef. Rev.*, 1992; **3**: 82-100.

Fisher GJ, Reddy AP, Datta SC, Kang S, Yi JY, Chambon P and Voorhees JJ. All-trans retinoic acid induces cellular retinol-binding protein in vivo. *J. Invest. Dermatol.*, 1995; **105**: 80-86.

Fisher GJ, Datta SC, Talwar HT, Wang ZQ, Varani J, Kang S and Voorhees JJ. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 1996a; **379**: 335-339.

Fisher GJ and Voorhees JJ. Molecular mechanism of retinoids actions in skin. *FASEB J.* 1996b; **10**: 1002-1013.

Forman BM, Umesono K, Chen J and Evans RM. Unique response pathway are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* 1995; **81**: 541-550.

Fraser JD, Newton ME and Weiss A. CD28 and T cell antigen receptor signal transduction coordinately regulate interleukin-2 gene expression in response to superantigen stimulation. *J. Exp. Med.*, 1992; **175**: 1131-1134.

Fraser JD, Strauss D and Weiss A. Signal transduction events leading to T cell lymphokine gene expression. *Immunol Today* 1993; **14**: 357-362.

Freedman AS, Freedman GJ, Rhyhart K and Nadler LM. Selective induction of B7/BB1

on interferon-gamma stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T-cell activation through the CD28 pathway. *Cell. Immunol.*, 1991; **137**: 429-437.

Friedman A and Sklan D. Impaired T lymphocyte immune response in vitamin A depleted rats and chicks. *Br. J. Nutr.*, 1989; **62**: 439-449.

Friedman A, Halevy O, Schift M, Arazi Y and Sklan D. Retinoic acid promotes proliferation and induces expression of retinoic acid receptor- $\alpha$  gene in murine T lymphocytes. *Cell Immunol.*, 1993; **152**: 240-248.

## G

Garbe A, Buck J and Hammerling U. Retinoids are important cofactors in T cell activation. *J. Exp. Med.*, 1992; **176**: 109-117.

Gardner P. Calcium and T lymphocyte activation. *Cell* 1989a; **59**: 15-20.

Gardner P, Alcover A, Kuno M, Moingeon P, Weyand CM, Goronzy J and Reinherz EL. Triggering of T-lymphocytes via either T3-Ti or T11 surface structures opens a voltage-insensitive plasma membrane calcium-permeable channel: requirement for interleukin-2 gene function. *J. Biol. Chem.*, 1989b; **264**: 1068-1076.

Garrity PA, Chen D, Rothenberg EV and Wold BJ. IL-2 transcription is regulated in vivo at the level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors. *Mol. Cell. Biol.*, 1994; **14**: 2159-2169.

Gelmetti C, Nazzaro V and Cerri C. Long-term preservation of permanent teeth in a patient of Papillon-Lefèvre syndrome treated with tretinate. *Pediatr. Dermatol.*, 1989; **6**: 222-225.

Geppert TD, Davis LS, Gur H, Wacholtz MC and Lipsky PE. Accessory cell signals involved in T-cell activation. *Immunol. Rev.*, 1990; **117**: 5-66.

- Giguere V, Lyn S, Yip P, Siu C and Amin S. Molecular cloning of a cDNA encoding a second cellular retinoic acid-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; **87**: 6233-6237.
- Gillis S. T-cell derived lymphokines. pg. 621-638 in "Fundamental Immunology" Second Edition. Paul WE. Ed. Raven Press Ltd. New York, EEUU.
- Glass C, Lipkin S, Devary O and Rosenfeld M. Positive and negative regulation of gene transcription by a retinoic acid-thyroid hormone receptor heterodimer. *Cell* 1989; **59**: 697-708.
- Glick AB, Flanders KC, Danielpour D, Yuspa SH and Sporn MB. Retinoic acid induces transforming growth factor- $\beta$ 2 in cultured keratinocytes and mouse epidermis. *Cell Regul.*, 1989; **1**: 87-97.
- Gold DP, Clevers H, Alarcón B, Dunlap S, Novotny J, Williams AF and Terhost C. Evolutionary relationship between the T3 chains of the T-cell receptor complex and immunoglobulin supergene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; **84**: 7649-7653.
- Góngora R, Corell A, Regueiro JR, Carasol M, Rodríguez-Gallego C, Paz-Artal E, Timón M, Allende LM and Arnaiz-Villena A. Peripheral blood reduction of memory (CD29<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, and "bright" CD2<sup>+</sup> and LFA-1<sup>+</sup>) T lymphocytes in Papillon-Lefèvre syndrome. *Hum Immunol.*, 1994; **41**: 185-192.
- Gorry P, Lufkin T, Dierich A, Rochette-Egly C, Décimo D, Dollé P, Mark M, Durand B and Chambon P. The cellular retinoic acid binding protein I is dispensable. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; **91**: 9032-9036.
- Grandis JR, Zeng Q and Tweardy DJ. Retinoic acid normalizes the increased gene transcription rate of TGF- $\alpha$  and EGFR in head and neck cancer cell lines. *Nature Medicine* 1996; **2**: 237-240.
- Green PHA and Glickman RM. Intestinal lipoprotein metabolism. *J. Lipid. Res.*, 1981; **22**: 1153-1173.
- Green MH, Green JB and Lewis KC. Variation in retinol utilization rate with Vitamin A status in the rat. *J. Nutr.*, 1987; **117**: 694-703.
- Green S and Chambon P. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.*, 1988; **4**: 309-314.
- Greenwald P, Kelloff G, Burch-Whitman C and Kramer BS. Chemoprevention. *CA Cancer J Clin.*, 1995; **45**: 31-49.
- Gullberg M and Smith KA. Regulation of T cell autocrine growth. T4<sup>+</sup> cells become refractory to interleukin 2. *J. Exp. Med.*, 1986; **163**: 270-284.
- Guo WX, Gill PS and Antakly T. Inhibition of AIDS-Kaposi's sarcoma cell proliferation following retinoic acid receptor activation. *Cancer Res.*, 1995; **55**: 823-829.

## H

Haas W, Pereira P and Tonegawa S. Gamma / delta cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 1993; **11**: 637-685.

Hahn WC, Burakoff SJ and Bierer BE. Signal transduction pathways involved in T cell receptor-induced regulation of CD2 avidity for CD58. *J. Immunol.*, 1993; **150**: 2607-2618.

Haneke E, Hornstein Op and Lex C. Increased susceptibility to infections in the Papillon-Lefèvre syndrome. *Dermatologica* 1975; **150**: 283-286.

Haneke E. The Papillon-Lefèvre syndrome. keratosis palmoplantaris with periodonpathy. *Hum Genetics* 1979; **51**: 1-35.

Hansen JA, Martin PJ and Nowinski RC. Monoclonal antibodies identifying a novel T cell antigen and Ia antigens of human T lymphocytes. *Immunogenetics* 1980; **10**: 247-260.

Hara T and Fu SM. Human T cell

activation. Monocyte-independent activation and proliferation induced by anti-T3 monoclonal antibodies in the presence of tumor promoter 12-o-tetradecanoyl phorbol-13 acetate. *J. Exp. Med.*, 1985a; **161**: 641-655.

Hara T, Fu SM and Hansen JA. Human T cell activation. II. A new activation pathway used by a major T cell population via a disulfide-bond dimer of a 44 polypeptide (9.3 antigen). *J. Exp. Med.*, 1985b; **161**: 1513-1524.

Harrison EH and Gad MZ. Hydrolysis of retinyl palmitate by enzymes of rat pancreas and liver. Differentiation of bile salt-dependent and bile salt-independent neutral retinyl ester hydrolases in rat liver. *J. Biol. Chem.*, 1989; **264**: 17142-17147.

Hatakeyama M, Kono T and Kobayashi T. Interaction of IL-2 receptor with src-family kinase p56<sup>lck</sup> identification of a novel intermolecular association. *Science* 1991; **252**: 1523-1528.

Hendriks HF. Retinoid (vitamin A) metabolism. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1996; **50**: S2-S6.

Hong WK. Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.*, 1990; **323**: 795-801.

Hong WK, Lippman SM, Hittelman WN and Lotan R. Retinoid chemoprevention of aerodigestive cancer: from basic research to the clinic. *Clin Cancer Res.*, 1995; **1**: 677-686.

Houle B, Rochette-Egly C and Bradley WEC. Tumor-suppressive effect of retinoic acid receptor  $\beta$  in human epidermoid lung cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; **90**: 985-989.

Howard FD, Moingeon P, Mocbiusu F, McConkey DJ, Yandava B, Gennert TE and Reinherz EL. The CD3 $\zeta$  cytoplasmic domain mediates CD2-induced T cell activation. *J. Exp. Med.*, 1992; **176**: 139-145.

Hubert P, Debre P, Boumsell L and Bismuth G. Tyrosine Phosphorylation and

association with phospholipase C $\gamma$ -1 of the GAP-associated 62 kD protein after CD2 stimulation of Jurkat T cell. *J. Exp. Med.*, 1993; **178**: 1587-1596.

Huet S, Groux H, Caillou B, Valentin H, Prieur AM and Bernard A. CD44 contributes to T cell activation. *J. Immunol.*, 1989; **143**: 798-801.

Hunter T and Karin M. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 1992; **70**: 375-387.

Hyatt GA, Schmitt EA, Marsh-Armstrong NR and Dowling JE. Retinoic acid-induced duplication of the zabrafish retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; **89**: 8293-8297.

## I

Imboden JB and Stobo JD. Transmembrane signaling by the T cell antigen receptor: perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *J. Exp. Med.*, 1985; **161**: 446-456.

Irving BA and Weiss A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor  $\zeta$  chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 1991; **64**: 891-901.

Isakov N, Mally MI, Scholz W and Altman A. T lymphocyte activation: the role of protein kinase C and the bifurcating inositol phospholipid signal transduction pathway. *Immunol. Rev.*, 1987; **95**: 89-111.

Ishikawa T, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Aburatani H, Stanger BZ, Shibasaki Y, Imawari M, Evans RM and Takaku F. A functional retinoic acid receptor encoded by the gene on the human chromosome 12. *Mol. Endocr.*, 1990; **4**: 837-844.

Iwashima M, Irving BA, van Oers NSC, Chan AC and Weiss A. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic

tyrosine kinases. *Science* 1994; **263**: 1136-1139.

Iwata M, Mukai M, Nakai Y and Iseki R. Retinoic acid inhibits activation-induced apoptosis in T cell hybridomas and thymocytes. *J. Immunol.*, 1992; **149**: 3302-3308.

## J

Jacobsen SEM, Fahlman C, Blomhoff HK, Okkenhaug C, Rusten LS and Smeland EB. All-trans and 9-cis retinoic acid: potent direct inhibitors of primitive murine hematopoietic progenitors in vitro. *J. Exp. Med.*, 1993; **179**: 1665-1672.

Jain J, Loh C and Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr. Opin. Immunol.*, 1995; **7**: 333-342.

Janeway CA. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.*, 1992; **10**: 645-674.

Jiang H and Kochhar DM. Induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoic acid in the limb bud. *Teratology* 1992; **46**: 333-340.

Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, El-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ and Marshak-Rothstein A. Fas (CD95) /FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995; **373**: 444-448.

June CH, Ledbetter JA, Linsley PS and Thompson CD. Role of CD28 receptor in T cell activation. *Immunol. Today* 1990; **11**: 211-216.

## K

Kanner SB, Damle NK, Blake J, Aruffo A and Ledbetter JA. CD2/LFA-3 ligation induces phospholipase C $\gamma$ 1 tyrosine phosphorylation and regulates CD3 signaling. *J. Immunol.*, 1992; **148**: 2023-2029.

Karnitz L and Abraham R. Cytokine receptor signaling mechanism. *Curr. Opin Immunol.*, 1995; **7**: 320-326.

Kawabe Y and Ochi A. Programmed cell death and extrathymic reduction of V $\beta$ 8+CD4+ T cells in mice tolerant to Staphylococcus aureus enterotoxin B. *Nature* 1991; **349**: 245-248.

Keddie F. Use of vitamin A in the treatment of several cutaneous diseases: relations to estrogen and vitamin B complex. *Archiv. of Dermatol. and Syphil.*, 1948; **58**: 64-73.

Kelly K and Siebenlist U. Immediate-early genes induced by antigen receptor stimulation. *Curr. Opin. Immunol.*, 1995; **7**: 327-332.

Kinoshita M, Pasatiempo AMG, Taylor CE and Ross AC. Immunological memory to tetanus toxoid is established and maintained in the vitamin A-depleted rat. *FASEB J.*, 1991; **5**: 2473-2481.

Kishimoto T. The biology of the IL-6. *Blood* 1989; **74**: 1-10.

Klausner RD and Samelson EL. T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell* 1991; **64**: 875-878.

Kligman LH and Kligman AM. The nature of photoaging: its prevention and repair. *Photodermatology* 1986; **3**: 215-227.

Konig R, Huang L-Y and Germain RN. MHC class II interactions with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* 1992; **356**: 796-798.

Koulova L, Clark EA, Shu G and Dupont B. The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.*, 1991; **173**: 759-762.

Krangel M. Endocytosis and recycling of the T3-Ti cell receptor complex. The role of T3 phosphorylation. *J. Exp. Med.*, 1987; **165**: 1141-1159.

Krust A, Kastner P, Petkovich M, Zelen

A and Chambon P. A third human retinoic acid receptor, hRAR- $\gamma$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; **85**: 329-333.

Kumagai N, Benedicy SH, Mills GB and Gelfaud EW. Requirements for the simultaneous presence of phorbol esters and calcium ionophores in the expression of human T lymphocytes proliferation-related genes. *J. Immunol.*, 1987; **139**: 1393-1399.

Kuno M and Gardner P. Ion channels activated by inositol 1, 4, 5-triphosphate in plasma membrane of human T lymphocytes. *Nature* 1987; **326**: 301-304.

Kurlandsky SB, Duell EA, Kang S, Voorhess JJ and Fisher GJ. Auto-regulation of retinoic acid biosynthesis through regulation of retinol esterification in human keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, 1996; **271**: 15346-15352.

## L

Laing TJ and Weiss A. Evidence for IL-2 independent proliferation in human T cells. *J. Immunol.*, 1988; **140**: 1056-1062.

Lanier LL, Yu G and Phillips JH. Co-association of CD3 $\zeta$  with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* 1989; **342**: 803-805.

Larsen FG, Nielsen-Kudsk F, Jakobsen P, Weismann K and Kragballe K. Pharmacokinetics and therapeutic efficacy of retinoids in skin diseases. *Clin. Pharmacoki.*, 1992; **23**: 42-61.

Ledbetter JA, Imboden JB, Schieren GL, Grosmaire LS, Rabinovitch PS, Lindstein T, Thompson CB and June CH. CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signals transduction pathways. *Blood* 1990; **75**: 1531-1539.

Ledbetter JA, Deans J, Aruffo A, Grosmaire L, Kanner S, Bolen S and Schieven G. CD4, CD8 and the role of CD45 in T cell activation. *Curr. Opin. Immunol.*, 1993; **5**: 334-

340.

Lee JC, Truneh A, Smith MF and Tsang KY. Induction of interleukin 2 receptor (TAC) by tumor necrosis factor in YT cells. *J. Immunol.*, 1987; **139**: 1935-1938.

Lee G, Namen AE, Gillis S, Ellinsworth LR and Kincade PW. Normal B cell precursors responsive to recombinant murine IL-7 and inhibition of IL-7 activity by transforming growth factor- $\beta$ . *J. Immunol.*, 1989; **142**: 3875-3883.

Leid M, Kastner P, Lyons R, Nakshatri H, Saunders M, Zacharewski T, Chen J-Y, Staub A, Garnier JM, Mader S and Chambon P. Purification, cloning and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 1992; **68**: 377-395.

Leroy P, Nakshatri H and Chambon P. Mouse retinoic acid receptor  $\alpha$ 2 isoform is transcribed from a promoter that contains a retinoic acid response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; **88**: 10138-10142.

Lesslauer W, Koning F, Ottenhoff T, Giphart M, Goulmy E and van Rood J. T90/44 (9.3 antigen). A cell surface molecule with a function in human T cell activation. *Eur. J. Immunol.*, 1986; **16**: 1289-1296.

Levin MS, Locke B, Yang N, Li E and Gordon JI. Comparison of the ligand binding properties of two homologous rat apocellular retinol-binding proteins expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1988; **263**: 17715-17723.

Linsley PS, Clark EA and Ledbetter JA. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells interacting with activation antigen B7/BB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; **87**: 5031-5035.

Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK and Ledbetter JA. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.*, 1991; **173**: 721-730.

Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C and Damle NK. Co-expression and functional cooperativity of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1992; 176: 1595-1604.

Linsley PS and Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol.*, 1993; 11: 191-212.

Lohnes D, Dierich A, Ghyselinck N, Kastner P, Lampron C, LeMeur M, Lufkin T, Mendelsohn C, Nakshatri H and Chambon P. Retinoid receptors and binding proteins. *J. Cell. Sci.*, 1992; 16: 69-76.

Lotan R. Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J.*, 1996; 10: 1031-1039.

Love JM and Gudas LJ. Vitamin A, differentiation and cancer. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1994; 6: 825-831.

Lubinski J, Fong TC, Babbitt JT, Ransone L, Yodoi J and Bloom ET. Increased binding of IL-2 and increased IL-2 receptor mRNA synthesis are expressed by a Nk-like cell line in response to IL-1. *J. Immunol.*, 1988; 140: 1903-1909.

Luisi B and Freedman L. Dimer, dimer binding tight. *Nature* 1995; 375: 359-360.

## M

Macchi S, Villa A, Giliani S, Sacco M, Frattini A, Porta F, Ugazio A, Johnston J, Candotti F, O'Shea J, Vezzi P and Notarangelo G. Mutations of Jak 3 gene in patients with autosomal severe combined immunodeficiency (SCID). *Nature* 1995; 377: 65-68.

MacDonald PN and Ong DE. Evidence for a lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *J. Biol. Chem.*, 1988; 263: 12478-12482.

Maden M and Tickle C. Retinoic acid and vertebrate development. *Semin. Dev. Biol.*, 1991; 2: 151-155.

Maden M. The retinoic acid supergun affair. *Curr. Biol.*, 1994; 4: 281-284.

Mader S, Leroy P, Chen J-Y and Chambon P. Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response element recognition by RARs and RXRs. *J. Biol. Chem.*, 1992; 268: 591-600.

Makni H, Malter JS, Reed JC, Nobuhiko S, Lang G, Kioussis D, Trinchieri G and Kamoun M. Reconstitution of an active surface CD2 by DNA transfer in CD2<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> Jurkat T cells facilitates CD3-T cell receptor mediated IL-2 production. *J. Immunol.*, 1991; 146: 2522-2529.

Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA and Evans RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 1990; 345: 224-229.

Manger BA, Weiss A, Weyand C, Goronzy J and Stobo JD. T-cell activation: differences in the signals required for IL-2 production by non activated and activated T cells. *J. Immunol.*, 1985; 135: 3669-3673.

Mariecardine A, Maridonneauparini J and Ferrer M. The lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56<sup>lck</sup> is endocytosed in Jurkat cells stimulated via CD2. *J. Immunol.*, 1992; 148: 3879-3884.

Martorell J, Vilella R, Borche L, Rojo I and Vives J. A second signal for T cell mitogenesis provided by monoclonal antibodies to CD45 (T200). *Eur. J. Immunol.*, 1987; 17: 1447-1451.

Matsuura T and Ross AC. Regulation of hepatic lecithin: retinol acyltransferase activity by retinoic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993; 301: 221-227.

Matthews D, Clark P, Herbert J, Morgan G, Armitage R, Kinnon C, Minty A, Grabstein K, Caput D, Ferrara P and Callard R. Function of the IL-2 receptor  $\gamma$ -chain in biologic responses of X-linked severe combined immunodeficient B

cells to IL-2, IL-4, IL-13, IL-15. *Blood* 1995; **85**: 38-42.

McConkey DJ, Orrenius S and Joudal M. Cellular signalling in programmed cell death (apoptosis). *Immunol. Today* 1990; **11**: 120-121.

Meco D, Scarpa S, Napolitano M, Maroder M, Bellavia D, De Maria R, Ragano-Caracciolo M, Frati L, Modesti A, Gulino A and Screpanti J. Modulation of fibronectin and thymic stromal cell-dependent thymocyte maturation by retinoic acid. *J. Immunol.*, 1994; **153**: 73-83.

Means AL and Gudas LJ. The roles of retinoids in vertebrate development. *Annu. Rev. Biochem.*, 1995; **64**: 201-233.

Meuer SC, Fitzgerald KA, Hussey RE, Hodgdon JC, Schlossman SF and Reinherz EL. Clonotypic structures involved in antigen specific human T cell function: relationship to the T3 molecular complex. *J. Exp. Med.*, 1983; **157**: 705-719.

Meuer SC, Hussey RE, Cantrell DA, Hodgdon JC, Schlossman SF, Smith KA and Reinherz EL. Triggering of the T3-Ti antigen-receptor complex results in clonal T-cell proliferation through an IL-2-dependent autocrine pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1984a; **81**: 1509-1513.

Meuer SC, Hussey RE, Fabbi M, Fox D, Acuto O, Fitzgerald K, Hodgdon JC, Protentis JP, Schlossman SF, and Reinherz EL. An alternative pathway of T cell activation: a functional role for the 50 Kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell* 1984b; **36**: 397-406.

Meyaard L, Otto SA, Jonker RA, Mijnster RP, Keet M and Miedema F. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science* 1992; **257**: 217-219.

Minami Y, Kono T, Miyazaki T and Taniguchi T. The IL-2 receptor complex: its structure, function and target genes. *Annu. Rev. Immunol.*, 1993; **11**: 245-268.

Mizel SB. Interleukin 1 and T cell

activation. *Immunol. Rev.*, 1982; **63**: 51-72.

Moingeon P, Alcover A, Clayton LK, Chang H, Transy C and Reinherz EL. Expression of a functional CD3-Ti antigen/MHC receptor in the absence of surface CD2. *J. Exp. Med.*, 1988; **12**: 2077-2090.

Moingeon P, Chang H, Sayri PH, Clayton LK, Alcover A, Gardner P and Reinherz EL. The structural biology of CD2. *Immunol. Rev.*, 1989a; **111**: 111-114.

Moingeon P, Chang H, Wallner BP, Stebbins C, Frey AZ and Reinherz EL. CD2-mediated adhesion facilitates T lymphocyte antigen recognition function. *Nature* 1989b; **339**: 312-314.

Moingeon P, Lucich JL, Stebbins C, Recny MA, Wallner BD, Koyasu S and Reinherz EL. Complementary roles for CD2 and LFA-1 adhesion pathways during T cell activation. *Eur. J. Immunol.*, 1991; **21**: 605-610.

Moretta A, Poggi A, Olive D, Bottino C, Fortis C, Pantaleo G and Moretta L. Selection and characterization of T cell variants lacking molecules involved in T cell activation (T3-T-cell receptor, T44 and T11): analysis of the functional relationship among different pathways of activation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1987; **84**: 1654-1658.

Mueller D and Jenkins M. Molecular mechanism underlying functional T cell unresponsiveness. *Curr. Opin. Immunol.*, 1995; **7**: 375-381.

Mustelin T, Pessa-Morikawa T, Autero M, Gassmann M, Anderson LC, Gahmberg CG and Burn P. Regulation of the p59 fyn protein tyrosine kinase by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. *Eur. J. Immunol.*, 1992; **22**: 1173-1178.

## N

Napoli JL. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism and signal

transduction. *Clin. Immunol. Immunopath.*, 1996; **80**: S52-S62.

Nawroz H. Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.*, 1994; **54**: 1152-1155.

Nazzaro V, Blanchet-Bardon C and Mimos C. Papillon-Lefèvre syndrome: ultrastructural study and successful treatment with acitretin. *Arch. Dermatol.*, 1988; **124**: 533-539.

Neiman PE, Thomas SA and Loring G. Induction of apoptosis during normal and neoplastic B cell development in the bursa of Fabricius. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1991; **88**: 5857-5861.

Nelson BH, Lord JD and Greenberg PD. Cytoplasmic domains of the IL-2 receptor  $\beta$  and  $\gamma$  chains mediate the signal for T cell proliferation. *Nature* 1994; **369**: 333-336.

Newcomer ME, Jones TA, Aqvist J, Sundelin J, Eriksson U, Rask L and Peterson PA. The three-dimensional structure of retinol-binding protein. *EMBO J.*, 1984; **3**: 1451-1454.

Ney UM, Ball IJ, Hill RP, Westmacott D and Bloxham DP. Anti-inflammatory effects of synthetic retinoids may be related to their immunomodulatory action. *Dermatologica* 1987; **175**: 93-99.

Nguyen TQ, Greer KE and Fisher GB. Papillon-Lefèvre syndrome: report of two patients treated successfully with isotretinoin. *J. Am. Dermatol.*, 1986; **15**: 46-49.

Noguchi M, Rosenblatt HM, Yi H, Filipovich AH, Adelstein S, Modi WS, McBride OW and Leonard WJ. IL-2 receptor gamma chain mutations results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 1993; **73**: 147-157.

Noy N and Blaner WS. Interactions of retinol with binding proteins: studies with rat cellular retinol-binding protein and with rat retinoic acid-binding proteins. *Biochemistry* 1991; **30**: 6380-6386.

Nunes JA, Collette Y, Trunch A, Olive D and Cantrell DA. The role of p21ras in CD28 signal transduction triggering of CD28 with antibodies, but not the ligand B7.1, activated p21ras. *J. Exp. Med.*, 1994; **180**: 1067-1070.

## O

Odum N, Martin PJ, Schieven GL, Hausen JA and Ledbetter JA. Signal transduction by HLA class II antigens expressed on activated T cells. *Eur. J. Immunol.*, 1991; **21**: 123-129.

Ohno H, Ushiyama C, Taniguchi M, Germain RN and Saito T. CD2 can mediate TCR/CD3-independent T cell activation. *J. Immunol.*, 1991; **146**: 3742-3746.

Okazawa H, Okamoto K, Ishino F, Ishino-Kaneko T, Takeda S, Toyoda Y, Muramatsu M and Hamada H. The oct3 gene for an embryonic transcription factor, is controlled by a retinoic acid repressible enhancer. *EMBO J.*, 1991; **10**: 2997-3005.

Olive D, Ragvanean M, Cerdan Ch, Dubrevil P, López M and Mawas C. Anti-CD2 (Sheep red blood cell receptor) monoclonal antibodies and T-cell activation. I. Pairs of anti-T11.1 and T11.2 (CD2 subgroups) are strongly mitogenic for T cells in presence of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Eur. J. Immunol.*, 1986; **16**: 1063-1068.

Ong DE. Cellular retinoid binding proteins. *Arch. Dermatol.*, 1987a; **123**: 1693-1695.

Ong DE, Kakkad B and MacDonald PN. Acetyl-CoA-independent esterification of retinol bound to a cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine. *J. Biol. Chem.*, 1987b; **262**: 2729-2736.

Ong DE. Retinoid metabolism during intestinal absorption. *J. Nutr.*, 1993; **123**: 351-355.

Orfanos CE and Bauer R. Evidence for

the anti-inflammatory activities of oral synthetic retinoids: experimental findings and clinical experience. *Br. J. Dermatol.*, 1983; **109**: 55-60.

Orloff DG, Ra CS, Frank SJ, Klausner RD and Kinet JP. Family of disulphide-linked dimers containing the  $\zeta$  and  $\eta$  chains of the T-cell receptor and the gamma chain of the Fc receptors. *Nature* 1990; **347**: 189-191.

## P

Papillon MM and Lefèvre P. Deux cas de keratodermie palmaire et plantaire simétrique familiale (maladie de maleda) chez el frère et la soeur: coexistence dans les deux cas d'alterations dentaires graves. *Bull. Soc. Dermatol. Syphilis.*, 1924; **31**: 82-87.

Pantaleo G, Olive D, Poggi A, Kozumbo WJ, Moretta L and Moretta A. Transmembrane signalling via the T11-dependent pathway of human T cell activation: evidence for the involvement of 1, 2 diacylglycerol and inositol phosphates. *Eur. J. Immunol.*, 1987; **17**: 55-60.

Pérez-Aciego P, Alarcón B, Arnaiz-Villena A, Terhorst C, Timón M and Regueiro JR. Expression and function of a variant T cell receptor complex lacking CD3 $\gamma$ . *J. Exp. Med.*, 1991; **174**: 319-326.

Perkins AC and Cory S. Conditional immortalization of mouse myelomonocytic megakaryocytic and mast cell progenitors by the Hox-2.4 homeobox gene. *EMBO J.*, 1993; **12**: 3835-3846.

Perlmann T and Vennstrom B. The sound of silence. *Nature* 1995; **377**: 387-388.

Peter ME, Hall C, Ruhlmann A, Sancho J and Terhorst C. The T cell receptor  $\zeta$  chain contains a GTP/GDP binding site. *EMBO J.*, 1992; **11**: 933-941.

Petkovich M, Brand NJ, Krust A and Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 1987; **330**: 444-450.

Pfahl M. Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr. Rev.*, 1993; **14**: 651-658.

Phillips JH, Hori T, Nagler A, Bhat N, Spits H and Lanier LL. Ontogeny of human natural killer cells: fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3 $\epsilon$  and  $\delta$  proteins. *J. Exp. Med.*, 1992; **175**: 1055-1066.

Pierrès A, Cerdan CH, López M, Mawas C and Olive D. CD3<sup>low</sup> human thymocyte populations can readily be triggered via the CD2 and /or CD28 activation pathways whereas the CD3 pathway remains non functional. *J. Immunol.*, 1990; **144**: 1202-1207.

Posch KC, Bocerman MHEM, Burns RD and Napoli JL. Holocellular retinol binding protein as a substrate for microsomal retinal synthesis. *Biochemistry* 1991; **30**: 6224-6230.

Preus Hand Gjeremo P. Clinical management of prepubertal periodontitis in two siblings with Papillon-Lefèvre syndrome. *J. Clin. Periodontol.*, 1987; **14**: 156-160.

Puengtomwatanakul S and Sirisinha S. Impaired biliary secretion of immunoglobulin A in vitamin A-deficient rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1986; **182**: 437-442.

## R

Racke MK, Burnett D, Pak SH, Albert PS, Cannella B, Raine CS, McFarlin DE and Scott DE. Retinoid treatment of experimental allergic encephalomyelitis, IL-4 production correlates with improved disease course. *J. Immunol.*, 1995; **154**: 450-458.

Ragsdale JR and Brockes JP. Retinoic acid receptors and vertebrate limb morphogenesis. In "Structure and function of hormone nuclear receptors" (ed M.G. Parker), pp. 269-295. London: Academic Press (1991).

Regueiro JR, Rodríguez-Gallego C and Arnaiz-Villena A. Human T lymphocyte activation deficiencies, p.22 CRC Press CA,

1994.

Robb RJ and Greene WC. Internalization of interleukin 2 is mediated by the beta chain of the high-affinity interleukin 2 receptor. *J. Exp. Med.*, 1987; **165**: 1201-1206.

Romeo C and Seed B. Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides. *Cell* 1991; **64**: 1037-1046.

Rosen FS. Primary immunodeficiency diseases. *Immunodef. Rev.*, 1992; **3**: 195-236.

Ross AC. Vitamin A status: relationship to immunity and the antibody response. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1992; **200**: 303-320.

Ross AC and Ternus ME. Vitamin A as a hormone: Recent advances in understanding the actions of retinol, retinoic acid and beta carotene. *J. Am. Diet. Assoc.*, 1993; **93**: 1285-1290.

Rowe A, Richman JM and Brickell PM. Retinoic acid treatment alters the distribution of retinoic acid receptor -beta transcripts in the embryonic chick face. *Development* 1991; **111**: 1007-1016.

Ruberte E, Dollé P, Chambon P and Morriss-Kay G. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: II. Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos. *Development* 1991; **111**: 45-60.

Russell S, Tayebi N, Nakajima H, Riedy M, Roberts J, Aman M, Migone T, Noguchi M, Markert M, Buckley R, O'Shea J and Leonard W. Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science* 1995; **270**: 797-800.

Rutledge JC, Shourbaji AG, Hughes LA, Polifka JE and Cruz YP. Limb and lower-body duplications induced by retinoic acid in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; **91**: 5436-5440.

## S

Saatcioglu F, Claret FX and Karin M. Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. *Semin. Cancer Biol.*, 1994; **5**: 347-359.

Saito H and Streuli M. Molecular characterization of protein tyrosine phosphatases. *Cell Growth Differ.*, 1991; **2**: 59-65.

Salter RD, Benjamin RJ and Wesley PK. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the  $\alpha 3$  domain of HLA-A2. *Nature* 1990; **345**: 41-46.

Samelson LE, Phillips AF, Luong ET and Klausner RD. Association of the fyn protein tyrosine kinase with the T cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; **87**: 4358-4362.

Saxon A, Keld B, Braun J, Dotson A and Sidell N. Long-term administration of 13-cis retinoic acid in common variable immunodeficiency: circulating interleukin-6 levels, B-cell surface molecule display, and in vitro and in vivo B-cell antibody production. *Immunology* 1993; **80**: 477-487.

Schiavone EM, Lo Pardo C, Di Noto R, Manzo C, Ferrara F, Vacca C and del Vecchio L. Expression of the leucocyte common antigen (LCA, CD45) isoforms RA and RO in acute haematological malignancies: possible relevance in the definition of new overlap points between normal and leukaemic haemopoiesis. *Br. J. Haematol.*, 1995; **91**: 899-906.

Schraven B, Schirren A, Kirchgessner H, Siebert B and Meuer SC. Four CD45/p56 lck-associated phospho-proteins (pp29-pp32) undergo alterations in human T cell activation. *Eur. J. Immunol.*, 1992; **22**: 1857-1863.

Schule R, Rangarajan P, Yang N, Kliwer S, Ransone LJ, Bolado J, Verma I and Evans RM. Retinoic acid is a negative regulator of AP-1 responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; **88**: 6092-6096.

- Schwartz RH. T lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.*, 1995; 3: 237-261.
- Seder RA and Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4<sup>+</sup> T cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 1994; 12: 635-673.
- Semba RD, Graham NMH and Caiaffa WT. Increased mortality associated with vitamin A deficiency during human immunodeficiency virus type 1 infection. *Arch. Intern. Med.*, 1993a; 153: 2149-2154.
- Semba RD, Muhilal, Ward BJ, Griffin DE, Scott AL, Natadisastra G, West KP and Sommer A. Abnormal T-cell subset proportions in vitamin A deficient children. *Lancet* 1993b; 341: 5-8.
- Semba RD. Vitamin A, immunity and infection. *Clin. Infec. Dis.*, 1994; 19: 489-499.
- Shenefelt RE. Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment. *Teratology* 1972; 72: 103-118.
- Sherr E, Adelman DC, Saxon A, Gilly M, Wall R and Sidell N. Retinoic acid induces the differentiation of B cell hybridomas from patients with common variable immunodeficiency. *J. Exp. Med.*, 1988; 168: 55-71.
- Shibuya H, Yoneyam M, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K and Taniguchi T. IL-2 and EGF receptors stimulate the hematopoietic cell cycle via different signaling pathways: demonstration of a novel role for c-myc. *Cell* 1992; 70: 57-67.
- Sidell N, Famatiga L and Golub SH. Augmentation of human thymocyte proliferative responses by retinoic acid. *Exp. Cell. Biol.*, 1981; 49: 239-245.
- Sidell N and Ramsdell F. Retinoic acid upregulates interleukin-2 receptors on activated human thymocytes. *Cell. Immunol.*, 1988; 115: 299-309.
- Sidell N, Chang B and Bhatti L. Upregulation by retinoic acid of interleukin-2 receptor mRNA in human T lymphocytes. *Cell. Immunol.*, 1993; 146: 28-37.
- Siegel JP, Sharon M, Smith PL and Leonard WJ. The IL-2 receptor beta chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK and proliferative activities. *Science* 1987; 238: 75-78.
- Siegenthaler G, Saurat JH and Poncet M. Retinol and retinal metabolism. *Biochem. J.*, 1990; 268: 371-378.
- Siliciano RF, Pratt JC, Schmidt RE, Ritz J and Reinherz EL. Activation of cytolytic T lymphocyte and natural killer cell function through the T11 sheep erythrocyte binding protein. *Nature* 1985; 317: 428-430.
- Smith SH, Brown MH, Rowe D, Callard RE and Beverly PCL. Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new monoclonal antibody, UCHL1. *Immunology* 1986; 58: 63-68.
- Smith CA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ and Owen JJT. Antibodies to CD3/T cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 1989; 337: 181-184.
- Smith SM and Eichele G. Temporal and regional difference in the expression pattern of distinct retinoic acid receptor- $\beta$  transcripts in the chick embryo. *Development* 1991a; 111: 245-252.
- Smith WC, Nakshatri H, Leroy P, Rees J and Chambon P. A retinoic acid response element is present in the mouse cellular retinol binding protein I (mCRBPI) promoter. *EMBO J.*, 1991b; 10: 2223-2230.
- Sommer A, Tarwotjo I, Hussaini G and Susanto D. Increased mortality in children with mild vitamin A deficiency. *Lancet* 1983; 2: 585-588.
- Spertini F, Wang AVT, Chatila T and Geha R. Engagement of the common leukocyte antigen CD45 induces homotypic adhesion of

activated human T cells. *J. Immunol.*, 1994; **153**: 1593-1602.

Sporn MB, Roberts AB and Goodman DS. eds. 1994. *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*. New York: Raven. 679 pp. 2nd ed.

Springer TA, Dustin ML, Kishimoto TK and Martin SD. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2 and LFA-3 molecules: cell adhesion, receptors of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, 1987; **5**: 223-252.

Stellmach U, Leask A and Fuchs E. Retinoid-mediated transcriptional regulation of keratin genes in human epidermal and squamous cell carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; **88**: 4582-4586.

Stephensen C, Alvares JO, Hardmeier R, Kobatsu J and Duke P. Vitamin A is excreted at high levels in the urine of ICV patients with pneumonia and sepsis. *FASEB J.*, 1993; **7**: A511-A516.

Strauss D and Weiss A. Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 1992; **70**: 585-593.

Suda T, Okada S, Suda J, Miura Y, Ito M, Sudo T, Hayashi SI, Nishikawa SI and Nakauchi H. A stimulatory effect of recombinant murine interleukin-7 on B-cell colony formation and inhibitory effect of IL-1 $\alpha$ . *Blood* 1989; **74**: 1936-1941.

## T

Takahashi N and Breitman TR. Retinoylation of proteins in leukemia, embrional carcinoma, and normal kidney cell lines: differences associated with differential responses to retinoic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991; **285**: 105-110.

Takase S, Ong DE and Chytil F. Transfer of RA from its complex with cellular retinoic acid binding protein to the nucleus.

*Arch. Biochem. Biophys.*, 1986; **247**: 328.

Takeshita T, Asao H, Ohtani K, Ishii N, Kumaki S, Tanaka N, Munakata H, Nakamura M and Sugamura K. Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor. *Science* 1992; **257**: 379-382.

Tang A, Graham NMH and Kirby J. Dietary micronutrient intake and risk of progression to AIDS in HIV-1 infected homosexual men. *Am. J. Epidemiol.*, 1993; **138**: 937-951.

Taniguchi T and Minami Y. The IL-2 /IL-2 Receptor system: a current overview. *Cell* 1993; **73**: 5-8.

Taniguchi T, Miyazaki T, Minami Y, Kawahara T, Fujii H, Nakagawa Y, Hatakeyama M and Liu Z. IL-2 signaling involves recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the IL-2 receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1995; **766**: 235-244.

Testi R, Phillips JH and Lanier LL. T cell activation via Leu-23 (CD69). *J. Immunol.*, 1989; **143**: 1123-1128.

Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA and Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995; **3**: 541-547.

Tosato G, Seamon KB and Goldman ND. Monocyte-derived human B-cell growth factor identified as interferon-beta 2 (BSF-2, IL-6). *Science* 1988a; **239**: 502-505.

Tosato G and Pike SE. Interferon-beta 2/interleukin 6 is a co-stimulant for human T lymphocyte. *J. Immunol.*, 1988b; **141**: 1556-1562.

Tsoukas CD, Landgraf B, Bentin J, Valentine M, Lotz M, Vaughan JH and Carson DA. Activation of resting T lymphocytes by anti-CD3 (T3) antibodies in the absence of monocytes. *J. Immunol.*, 1985; **135**: 1719-1723.

Tunnacliffe A, Buluwela L and Rabbitt

S. Physical linkage of three CD3 genes on human chromosome 11. *EMBO J.*, 1987; **6**: 2593-2597.

Turka LA, Ledbetter JA, Lee K, June CH and Thompson CB. CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3<sup>+</sup> mature thymocytes. *J. Immunol.*, 1990; **144**: 1646-1653.

## U

Umesono K, Giguere V, Glass CK, Rosenfeld MG and Evans RM. Retinoic acid thyroid hormone induce gene expression through a common response element. *Nature* 1988; **336**: 262-265.

## V

van den Berg H. Vitamin A intake and status. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1996; **50**: S7-S12.

Vandenbergh P and Ceuppens L. Immobilized anti-CD5 together with prolonged activation of protein kinase C induce interleukin-2 dependent T cell growth: evidence for signal transduction through CD5. *Eur. J. Immunol.*, 1991; **21**: 251-259.

Van de Velde H, von Hoegen I, Luo W, Parnes JR and Thielemans K. The B cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5. *Nature* 1991; **351**: 662-665.

Van Lier RA, Brouwer M and Aarden LA. Signals involved in T cell activation. T cell proliferation induced through the synergistic action of anti-CD28 and anti-CD2 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.*, 1988; **18**: 167-172.

Veillette A, Bookman MA, Horak EM and Bolen JB. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56 lck. *Cell* 1988; **55**: 301-308.

Villa ML, Ferrario E, Trabattoni D,

Formelli F, De Palo G, Magni A, Veronesi U and Clerici E. Retinoids, breast cancer and NK cells. *Br. J. Cancer* 1993; **68**: 845-850.

## W

Wake K. Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Int. Rev. Cytol.*, 1980; **66**: 303-353.

Wang W, Napoli JL and Ballow M. The effects of retinol on in vitro immunoglobulin synthesis by cord blood and adult peripheral blood mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 1993a; **92**: 164-168.

Wang W and Ballow M. The effects of retinoic acid on in vitro immunoglobulin synthesis by cord blood and adult peripheral blood mononuclear cells. *Cell Immunol.*, 1993b; **148**: 291-300.

Ward SG. CD28: a signaling perspective. *Biochem. J.*, 1996; **318**: 361-377.

Ward SG, Westwick J, Hall ND and Sansom DM. Ligation of D-3 phosphoinositides in T lymphocyte independently of T cell receptor/CD3 activation. *Eur. J. Immunol.*, 1993; **23**: 2572-2577.

Warrell RPJr, Frankel SR, Miller WHJr, Scheinberg DA, Itri LM, Hittelman WM, Vyas R, Andreeff M, Tafuri A, Jakubowski A, Gabrilore J, Gordon MS and Dmitrovski E. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid). *N. Engl. J. Med.*, 1991; **324**: 1385-1393.

Warrell RPJr, de Thé H, Wang Z-Y and Degos L. Acute promyelocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 1993; **329**: 177-189.

Waterhouse P, Penninger J, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H and Mak TW. Lymphoproliferative disorders with early

lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science* 1995; **270**: 985-988.

Wathne KO, Norum KR, Smeland E and Blomhoff R. Retinol bound to physiological carrier molecules regulates growth and differentiation of myeloid leukemic cells. *J. Biol. Chem.*, 1988; **263**: 8691-8695.

Webb DSA, Mostowski HS and Gerrard TL. Cytokine-induced enhancement of ICAM-1 expression results in increased vulnerability of tumor cells to monocyte-mediated lysis. *J. Immunol.*, 1991; **146**: 3682-3686.

Weber JR, Bell GM, Han MY, Pawson T and Imboden JB. Association of the tyrosine kinase lck with phospholipase C- $\gamma$ 1 after stimulation of the T cell antigen receptor. *J. Exp. Med.*, 1992; **176**: 373-379.

Wegener AK, Letourneur F, Hoehler A, Brocker T, Luton F and Malissen B. The T cell receptor /CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell* 1992; **68**: 83-95.

Weiss A and Imboden JB. Cell surface molecules and early events involved in human T lymphocyte activation. *Adv. Immunol.*, 1987; **41**: 1-38.

Weiss A. T lymphocyte activation 1989.pg. 359-384 in "Fundamental Immunology". Paul WE ed. Raven Press Ltd. Second Edition. New York. EEUU.

Weiss A and Littman DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 1994; **76**: 263-274.

Weiss A, Koretzky G, Schatzman RC and Kadlecsek T. Functional activation of the T cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C- $\gamma$ 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; **88**: 5484-5488.

Weis K, Rambaud S, Lavan C, Jansen J, Carvalho T, Carmo-Fonseca M, Lamond A and Dejean A. Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR $\alpha$  in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell* 1994; **76**: 345-356.

West KP, Howard GR and Sommer A. Vitamin A and infection: public health implications. *Annu. Rev. Nutr.*, 1989; **9**: 63-86.

West KP. Vitamin A deficiency: its epidemiology and relation to child morbidity. In vitamin A: in health and disease. R. Blomhoff, ed: Marcel Dekker. New York, p.585.

Whittington R and Faulds D. Interleukin-2. *Drugs* 1993; **46**: 446-514.

Wiedermann U, Hanson LA, Kahn H and Dahlgren UI. Aberrant T-cell function in vitro and impaired T-cell dependent antibody response in vivo in vitamin A-deficient rats. *Immunology* 1993; **80**: 581-586.

Wiedermann U, Hanson LA and Dahlgren UI. Vitamin A deficiency and the immune system. *The immunologist* 1996; **4/2**: 70-75.

Wiley MJ. The pathogenesis of retinoic acid-induced vertebral abnormalities in golden Syrian hamster fetuses. *Teratology* 1983; **28**: 341-353.

Wilson JG, Roth CB and Warkany J. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A at various times during gestation. *Am. J. Anat.*, 1953; **92**: 189-217.

Woronicz JD, Calnan B, Ngo V and Winoto A. Requirement for the orphan steroid receptor nur77 in apoptosis of T cell hybridomas. *Nature* 1994; **367**: 277-281.

## X

Xu X-C, Ro JY, Lee JS, Shin DM, Hong WK and Lotan R. Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal premalignant and malignant head and neck tissues. *Cancer Res.*, 1994; **54**: 3580-3587.

## Y

Yang YL, Vacchio MS and Ashwell J. 9-cis-retinoic acid inhibits activation-driven T-cell apoptosis: implications for retinoid X receptor involvement in thymocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 1993; **90**: 6170-6174.

Yang Y, Mercep M, Ware C, Ashwell J. Fas and activation-induced Fas ligand mediate apoptosis of T cell hybridomas: inhibition of Fas ligand expression by retinoic acid and glucocorticoids. *J. Exp. Med.*, 1995; **181**: 1673-1682.

## Z

Zhang JG, Mogan L and Spickett GP. The effects of vitamin A derivatives on in vitro antibody production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from normal blood donors and patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin. Exp. Immunol.*, 1997; **107**: 57-60.

Zitnik R, Kotloff RM, Latifpour J, Zheng T, Whiting M, Schwalb J and Elias J. Retinoic acid inhibition of IL-1- induced IL-6 production by human lung fibroblasts. *J. Immunol.*, 1994; **152**: 1419-1472.

***IX.- ANEXO***

**IX.1.- ABREVIATURAS**

**9-cis RA:** ácido 9 cis retinoico

**13-cis RA:** ácido 13 cis retinoico

**Ac:** anticuerpo

**Ag:** antígeno

**AN:** anorexia nerviosa

**AP-1:** proteína activadora 1

**AP-1RE:** elemento de respuesta a AP-1

**APC:** célula presentadora de antígeno

**APL:** leucemia promielocítica aguda

**AT-RA:** ácido retinoico todo trans

**B-ct:**  $\beta$ -caroteno

**CBMC:** células mononucleares de sangre de cordón

**CCECC:** carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello

**CD:** cluster (grupo) de diferenciación

**CD3 $\gamma$ :** déficit de CD3 $\gamma$

**ConA:** concanavalina A

**CRABP:** proteína intracelular que une ácido retinoico

**CRBP:** proteína intracelular que une retinol

**CTL:** linfocitos T citotóxicos

**CTLA-4:** antígeno de linfocitos T citotóxicos

**DAG:** diacilglicerol

**DR:** repeticiones directas

**EA:** enterotoxina A

**EBV:** virus de Epstein Barr

**EC1:** enterotoxina C1

**ER:** ésteres de retinol

**Fas:** CD95

**FasL:** ligando del Fas

**FCS:** suero de ternera fetal

**FT:** factores de transcripción

**HRE:** elemento de respuesta de hormonas específicas

**14-HRR:** 14-hidroxi-4, 14 retroretinol

**HVS:** herpes virus saimiri

**ICAM:** molécula de adhesión intracelular

**ICV:** inmunodeficiencia común variable

**IFN:** interferón

**Ig:** inmunoglobulina

**IL:** interleucina

**IL-2R:** receptor de la interleucina 2

**IP:** inositol fosfato

**LPS:** lipopolisacárido

**LRAT:** Lecitina retinol acil transferasa

**mAb:** anticuerpo monoclonal

**MHC:** complejo principal de histocompatibilidad

**NF-AT:** factor nuclear de células activadas

**NF-κB:** factor nuclear κB

**NK:** natural killer

- OKT3:** anticuerpo monoclonal anti-CD3
- PBMC:** células mononucleares de sangre periférica
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- PHA:** fitohemaglutinina
- PI:** yoduro de propidio
- PKC:** proteína cinasa C
- PLC:** fosfolipasa C
- PMA:** acetato de forbol mirístico
- PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas
- PWM:** pokeweed
- QM:** quilomicrones
- RAR:** receptor de ácido retinoico
- RARE:** elemento de respuesta a ácido retinoico
- RBP:** proteína que une retinol
- ROL:** retinol
- RXR:** receptor de otros tipo de retinoide
- RXRE:** elemento de respuesta de retinoides X
- SAC:** *Staphylococcus aureus* de la cepa Cowan I
- SCID:** inmunodeficiencia combinada severa
- SK:** sarcoma de kaposi
- SPL:** síndrome Papillon-Lefèvre
- STAT:** señales activadoras de transcripción
- TCR/CD3:** receptor de la célula T
- TGF:** factor de crecimiento tumoral

**TNF:** factor de necrosis tumoral

**TTR:** transtiretina

**UV:** radiación ultravioleta

**WAS:** síndrome de Wiskott-Aldrich