



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**BIOENSAYOS *IN VITRO* PARA EL
ESTUDIO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA
AGONISTA**

***IN VITRO* BIOASSAYS FOR THE STUDY
OF AGONIST BIOLOGICAL ACTIVITY**

Autor: Victoria Alonso Pascual

Tutores: Jose Ignacio Rodríguez Barbosa y M^a Luisa del
Río González

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Julio, 2023

ÍNDICE:

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Comunicación celular, actividad agonista y antagonista	1
1.2.	Presentación antigénica y expansión clonal	3
1.3.	Aplicaciones terapéuticas	6
2.	HIPÓTESIS DE TRABAJO	7
3.	OBJETIVOS	8
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1.	Definición cuestión de investigación	8
4.2.	Búsqueda de información en la literatura científica	9
5.	RESULTADOS	10
5.1.	Diseño de células T de triple parámetro y células estimuladoras de células T... ..	10
5.2.	Moléculas de co-señalización con aplicación clínica	10
5.2.1.	La proteína de membrana co-inhibidora <i>PD-1</i> (Programmed Cell Death Protein 1)	10
5.2.2.	La proteína co-inhibidora <i>CTLA-4</i> (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)	13
5.2.3.	La proteína de membrana <i>LAG-3</i> (Lymphocyte-activation gene 3).....	15
5.3.	Moléculas de co-señalización en desarrollo preclínico.....	17
5.3.1.	La proteína <i>TIGIT</i> (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains)..	17
5.3.2.	La proteína de membrana <i>BTLA</i> (B and T lymphocyte attenuator)	19
5.3.3.	La proteína de membrana <i>TIM-3</i> (T-cell immunoglobulin and mucin domain 3)	22
5.3.4.	La proteína de membrana <i>2B4</i>	26
6.	CONCLUSIONES	28
7.	REFERENCIAS.....	28

RESUMEN

La respuesta inmunitaria es la principal defensa que tiene el organismo para hacer frente a las amenazas constantes de los microorganismos patógenos. Para ello, el sistema inmunitario cuenta con las células T efectoras como herramienta esencial y una comunicación celular compleja. En la activación de estas células hay 4 señales involucradas (señal 0: TLR agonista, señal de peligro; señal 1: TCR reconoce péptidos extraños en el contexto del MHC; señal 2: coinhibición o co-estimulación; señal 3: proliferación), pero no es un sistema perfecto ya que puede sufrir alteraciones. La modificación de la respuesta inmunitaria puede conducir a la inmunosupresión, como en el caso del cáncer, o a la hiperactivación, como en las alergias, enfermedades autoinmunes y trasplantes. Por ello, la activación de las células T se ha convertido en el centro de estudio estos últimos años, con el objetivo de desarrollar terapias frente a estas enfermedades. Concretamente, los grupos de investigación se han centrado en la modificación intencionada de la señal 2 para manipular la activación de las células T. Se trata de un conjunto de señales activadoras e inhibitoras que regulan en última instancia la diferenciación de las células T hacia células T efectoras. En el presente trabajo, se ha llevado a cabo una recopilación bibliográfica de las líneas de investigación más recientes sobre vías de co-señalización que sirven como diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Actualmente, se comercializan anticuerpos monoclonales que interfieren en la co-señalización de PD-1/PD-L1, CTLA-4/CD80/CD86 y LAG-3/MHCII, regulando así la diferenciación de las células T. Asimismo, existen otras vías de co-señalización en estudio como BTLA/HVEM/CD160/LIGHT, TIGIT/CD155/CD226, TIM-3/Gal-9/HMGB1 o 2B4/CD48/CD229 para mejorar las inmunoterapias actuales.

PALABRAS CLAVE

Anticuerpos monoclonales, células T, co-señalización, CTLA-4, LAG-3 y PD-1

ABSTRACT

The immune response is the body's main defence against constant threats from pathogenic microorganisms. For this purpose, the immune system relies on effector T cells as an essential tool and complex cellular network. T cell activation requires of four signals (signal 0; TLR agonist, danger signal; signal 1: TCR recognises foreign peptides in the context of MHC, T cell activation; signal 2: coinhibition or co-stimulation; signal 3: proliferation), but it is not a perfect system as it can suffer alterations. The modification of the immune response can lead to immunosuppression as in cancer patients, or overactivation as in the case of autoimmunity, transplants and allergic diseases. For this reason, T-cell activation has become the focus of study in recent years, with the aim of developing therapies for these diseases. Specifically, research groups have focused on the intentional modification of signal 2 to manipulate the course of T cell activation. This is a set of activating and inhibitory signals that ultimately regulate T cell differentiation towards effector T cells. In the present work, a bibliographic compilation of the most recent lines of research on co-signalling pathways that serve as therapeutic targets for the treatment of inflammatory diseases has been reviewed. Currently, monoclonal antibodies are commercially available that interfere with PD-1/PD-L1, CTLA-4/CD80/CD86 and LAG-3/MHCII co-signalling, with the aim of regulating the course of T cell differentiation. An in-heading number of novel pathways are under intense scrutiny such as BTLA/HVEM/CD160/LIGHT, TIGIT/CD155/CD226, TIM-3/Gal-9/HMGB1 or 2B4/CD48/CD229 to improve the current immunotherapies.

KEY WORDS

Co-signaling, CTLA-4, LAG-3, monoclonal antibodies, PD-1 and T cells

ABREVIATURAS:

aa: aminoácidos	ITSM: motivo de cambio basado en tirosina de inmunorreceptor
ADC: mAb conjugado con fármaco o toxina	ITT: cola de tirosina de inmunoglobulina
AP-1: proteína activadora 1	LAG-3: gen-3 de activación de linfocitos
Bat3: transcrito 3 asociado a HLA-B	Lck: proteína tirosina quinasa específica de linfocitos
BTLA: atenuador de linfocitos B y T	LSECTin: lectina de células sinusoidales hepáticas
CEACAM-1: antígeno carcinoembrionario-1	mAb: anticuerpos monoclonales
CFP: proteína fluorescente cian	MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno
CTLA-4: antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos	MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
DAMP: patrón molecular asociadas al daño	NFAT: Factor nuclear de células T activadas
DC: células dendríticas	NF-kB: factor nuclear kappa B
EAT2: transcrito 2 activado por sarcoma de Ewing	NK: células asesinas naturales
FDA: Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos	PAMP: patrones moleculares asociadas a patógenos
FGL-1: proteína similar al fibrinógeno 1	PD-1: molécula de muerte celular programada 1
Gal-3: galectina-3	PD-L: PD ligando
Gal-9: galectina-9	SAP: proteína asociada a SLAM
GFP: proteína fluorescente verde	SHP: proteína tirosina fosfatasa
Grb-2: proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento	SLAM: moléculas de activación linfocítica de señalización
HMGB1: proteína B1 del grupo de alta movilidad	SNP: polimorfismos de un solo nucleótido
HVEM: mediador de entrada del virus del herpes	TCR: receptor de células T
IDO: enzima indolamina 2.3-dioxigenasa	TCS: células estimuladoras de células T
IFN: interferón	TIGIT: inmunoglobulina de células T y el dominio ITIM
IgE: inmunoglobulina E	TIM-3: proteína 3 de inmunoglobulina con dominio mucina de las células T
IgV: dominio inmunoglobulina variable	TNF: factor de necrosis tumoral
IL: interleucina	TPR: células T de triple parámetro
IL-R2: receptor de IL-2	Treg: células T reguladoras
ITAM: motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor	
ITIM: motivo inhibidor basado en tirosina del inmunorreceptor	

1. INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo de este Trabajo de Fin de Grado se realizará una retrospectiva bibliográfica sobre la importancia de los bioensayos *in vitro* en el estudio de la actividad funcional de medicamentos biológicos y su monitorización durante el proceso productivo en la industria biotecnológica.

1.1. Comunicación celular, actividad agonista y antagonista

La correcta disposición de la actividad de las células es imprescindible para la coordinación en el funcionamiento adecuado de un organismo. Para ello, las células poseen entramados complejos de moléculas que les permiten organizar la información extracelular de su entorno o de células adyacentes, así como generar ellas mismas señales hacia su entorno. A partir de la información que las células reciben, desencadenan vías de señalización y respuestas fisiológicas que alteran la actividad celular y la interpretación de esa información permite una perfecta adaptación a su entorno (Fernández Valerón *et al.*, 2004).

Dentro del complejo celular para la comunicación celular, los principales componentes son las moléculas señalizadoras que actúan como ligando de receptores co-estimuladoras o co-inhibidores. Generalmente, estas moléculas tienen que ser sintetizadas y secretadas por las células, o presentarse en sus membranas, y ser capaces de dirigirse hasta las células receptoras conocidas como “células diana” para ejercer su función. Asimismo, pueden ser sintetizados de tal manera que se presenten anclados a la membrana celular pero en un momento determinado sean liberados para ejercer su función. Este es el caso de los receptores “decoy” o receptores señuelo, que son presentados en la membrana celular pero son liberados para unirse al receptor por el que muestran especificidad, evitando así que se unan otros ligandos (Fernández Valerón *et al.*, 2004).

Una vez se ponen en contacto con las células diana e interactúan con sus receptores específicos, ejercen su función en la célula. Por último, la señal debe desaparecer, separándose el ligando del receptor (Fernández Valerón *et al.*, 2004).

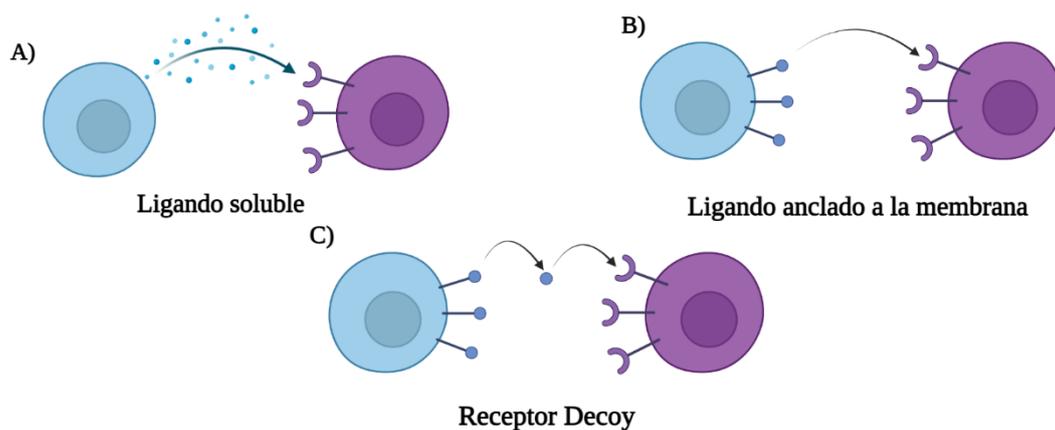


Figura 1. Esquema de la interacción entre el ligando y el receptor de una célula diana.

- A) Interacción entre un ligando soluble producido por una célula y su receptor específico en la célula diana.
- B) Interacción entre un ligando unido a la membrana de una célula y su receptor específico en la célula diana.
- C) Interacción entre un receptor Decoy y su receptor específico en la célula diana.

Figura de elaboración propia. BioRender software.

Centrándonos en la acción del ligando, podemos diferenciar dos tipos de actividades: agonista o antagonista. En el caso de los ligandos **agonistas**, son moléculas que presentan afinidad ante un receptor determinado y capacidad para activar al receptor al que se unen. Sin embargo, los ligandos **antagonistas** también muestran afinidad por el receptor pero, a diferencia de los agonistas, no tienen la capacidad de activar el receptor e inducir la vía de señalización celular asociada a este (Berg y Clarke, 2018).

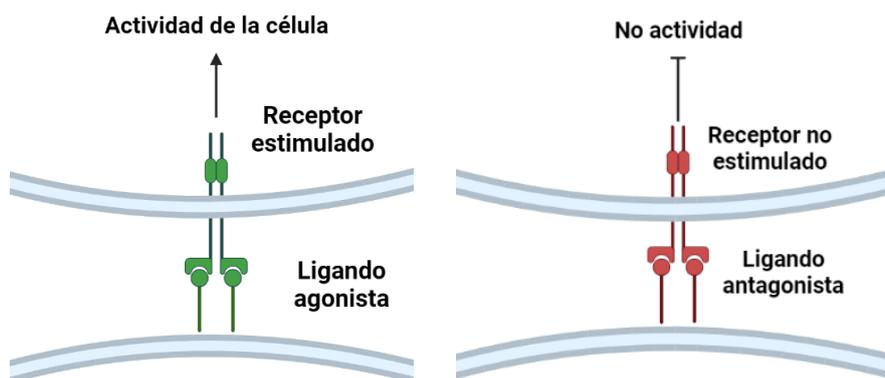


Figura 2. Mecanismo de acción de los ligandos agonistas y antagonistas. En el caso de ligando agonista, el receptor se activa y se transduce la señal. En caso de ligando antagonista, se inhibe la activación del receptor y no se transduce la señal. Figura de elaboración propia. BioRender software.

Asimismo, la eficacia intrínseca, es decir, la afinidad del ligando con actividad agonista varía en función de su estructura, pudiendo distinguir agonistas totales o agonistas parciales. Se diferencian en la intensidad de su respuesta. Por un lado, los agonistas completos producen la máxima respuesta que es capaz de generar el sistema, mientras que los agonistas parciales generan una respuesta menor (Berg y Clarke, 2018).

Una de las moléculas que actúan como ligando en la respuesta inmunitaria del organismo son los anticuerpos. Como se ha mencionado anteriormente, los ligandos pueden tener una afinidad

u otra dependiendo de varios factores como puede ser su estructura. A priori, se piensa que los anticuerpos que tengan una mayor afinidad desencadenarán una mayor respuesta en la célula, ya que se unirán más fuertemente a los receptores. Sin embargo, investigaciones recientes muestran que los anticuerpos que tienen una afinidad intermedia desencadenan mayores respuestas que los anticuerpos que muestran una alta afinidad. Esto se debe a que los anticuerpos con afinidad intermedia mimetizan mejor las interacciones fisiológicas de la unión receptor-ligando que los anticuerpos con alta afinidad (Wülfing y Dovedi, 2023).

Los anticuerpos tienen dos regiones de unión al receptor de la célula diana. En el caso de los anticuerpos con alta afinidad, por su alta capacidad de unión al receptor, se unen mediante una sola región de unión, agrupando un menor número de receptores y desencadenan una señal menor. Sin embargo, los anticuerpos que muestran una afinidad intermedia, ambas regiones de unión son capaces de unirse a dos receptores al mismo tiempo, agrupando así a varios receptores y pudiendo desencadenar una mayor señal celular (Wülfing y Dovedi, 2023).

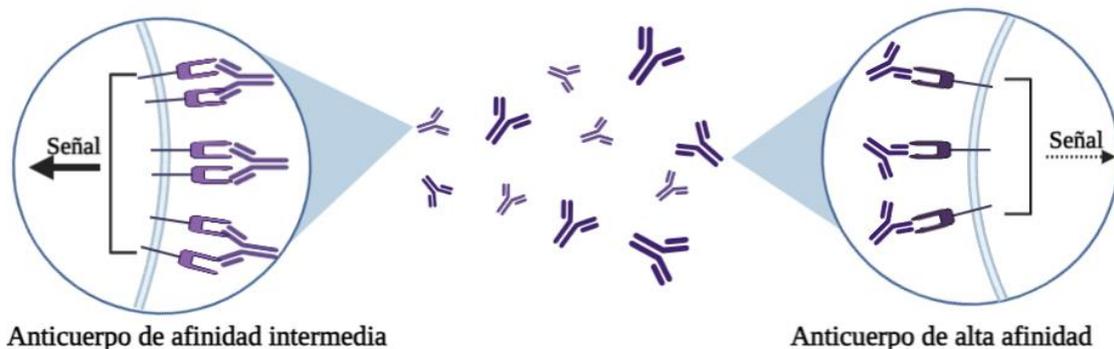


Figura 3. Unión de anticuerpos de alta e intermedia afinidad a sus respectivos receptores en una célula. Los anticuerpos que presentan afinidad intermedia interaccionan con un mayor número de receptores celulares y desencadenan una mayor señal en comparación con los anticuerpos con alta afinidad. Figura de elaboración propia. BioRender software.

1.2. Presentación antigénica y expansión clonal

Durante el desarrollo de la respuesta inmunitaria del organismo ante la aparición de un peligro que altera la homeostasis del cuerpo, uno de los pasos claves es la activación de las células T. Dentro de este proceso, se diferencian 4 señales que constituyen distintas etapas del desarrollo de la respuesta inmunitaria mediada por células T antígeno específicas.

En primer lugar, la señal 0 hace referencia a la alerta de peligro que avisa al sistema inmunitario de que algo está alterando la homeostasis del organismo. En esta señal se encuentran implicadas las moléculas de patrones moleculares asociadas a patógenos (PAMP) y las moléculas de patrón molecular asociadas al daño (DAMP). Los PAMPs derivan de microorganismos y los DAMPs derivan de células que han sufrido algún tipo de daño y perpetúan la respuesta inmunitaria ante el peligro al que se esté enfrentando el organismo (infección patógena, daño tisular, trauma...). Ambos se unen a receptores específicos (receptores tipo NOD, receptores tipo Toll...) para

promover la autofagia, mecanismo de supervivencia celular desencadenado debido a un estrés celular o ambiental (Tang *et al.*, 2012).

El siguiente paso es la señal 1, en el que se produce el reconocimiento del antígeno por parte de las células T. Para ello, los antígenos deben ser presentados por una célula presentadora de antígenos, es decir, las células dendríticas (DC). Las células T no son capaces de reconocer los antígenos convencionales si no se presentan en la membrana de otra célula en el contexto del complejo de histocompatibilidad humano (MHC). Del mismo modo, el antígeno es procesado y presentado por las DC en el MHC, de tal manera que el receptor de las células T (TCR) lo reconozca y comience la señalización (Téllez Castillo *et al.*, 2017).

El TCR se compone de dos cadenas, TCR-alfa y TCR-beta, constituyendo el dímero capaz de reconocer los antígenos presentados por las DC. Sin embargo, el dominio citoplasmático del receptor no presenta regiones de fosforilación, por lo que no se encuentra directamente implicado en la señalización intracelular. Realmente, la señalización intracelular se realiza gracias a CD3, que se une a los dominios citoplasmáticos del TCR y transmite las señales tras la unión del péptido unido al MHC, siendo capaz CD3 de interactuar con los efectores citoplasmáticos. CD3 es un complejo multiprotéico que contiene colas citoplasmáticas mediante las que transmite la señal del TCR al interior de la célula. Estas colas citoplasmáticas se caracterizan por tener un patrón de tirosinas y leucinas formando una secuencia consenso conocida como motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM). Los residuos tirosina de la secuencia ITAM son fosforilados por quinasas, creando motivos de unión específica para enzimas encargadas de la transmisión y amplificación de la señal al interior celular (Téllez Castillo *et al.*, 2017).

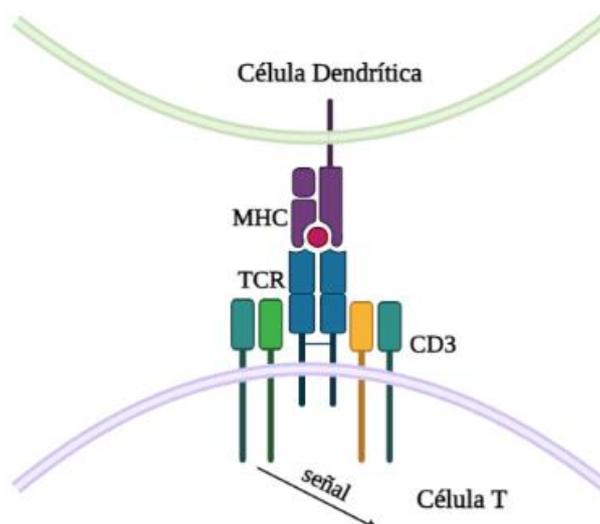


Figura 4. Señal 1 producida durante la activación de las células T por parte de las DC. En esta señalización se encuentran involucrados el MHC por parte de la DC y el TCR y CD3 de la célula T. Con ayuda de las subunidades γ , δ , ϵ y ζ del CD3 se transduce una señal que inicia la activación de la célula T. Figura de elaboración propia. BioRender software.

Aun así, la señal 1 que se genera gracias al complejo TCR-CD3 es insuficiente para promover la completa activación de la célula T. Por ello, se necesita la señal 2, en la que intervienen correceptores que proporcionen señales y, sumadas a la señal del TCR-CD3, se garantice una señal más fuerte capaz de activar plenamente la célula T (Cavanagh y Gwyer Findlay, 2021). El primer co-señalizador que se activa es CD28. Se trata de una glucoproteína transmembrana localizada en la superficie de la célula T con capacidad de unirse al grupo de receptores conocidos como B7 (CD80/86) presentes en la superficie de la DC. Esta señal secundaria se relaciona con la proliferación de la célula T, expresión de citoquinas y procesos de supervivencia de la célula. Asimismo, se ha demostrado que, sin esta segunda señal de co-estimulación, las células T no son capaces de producir interleucina 2 (IL-2) y se induce un estado de anergia, es decir, un estado de incapacidad funcional (Téllez Castillo *et al.*, 2017). Además de esta co-señalización, existen otras interacciones entre DC y células T que regulan la activación. Es el caso de CD40 y su ligando CD40L. Tras la activación, las células T expresan CD40L que al interactuar con CD40, presente en la superficie de las DC, inducen su maduración. Esta unión activa a las DC haciendo más eficiente su función para promover la diferenciación de las célula T naïve a células T efectoras (CD4⁺ Th y CD8⁺ CTLs) (Abbas *et al.*, 2015).

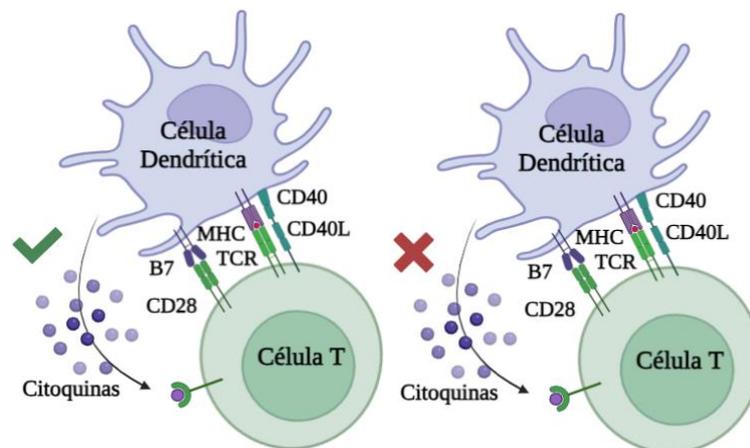


Figura 5. Presentación antigénica y co-señalización principal entre la célula DC y la célula T. En la imagen aparecen las tres señales principales: MHC/TCR, coestimulación (CD28/B7 y CD40/CD40L) y citoquinas. Figura de elaboración propia. BioRender software.

Por último, existen numerosas co-señalizaciones adicionales implicadas en la regulación de la comunicación de las DCs y células T. La modulación de esta comunicación intercelular mediante anticuerpos que interfieren en la interacción ligando/receptor (antagonistas) o realizan la función del ligando natural (agonistas) está en el foco actual de atención en la inmunoterapia de las enfermedades inflamatorias.

Este conjunto de interacciones y señalizaciones entre las células T y DC se producen en zonas especializadas del sistema linfático, en nódulos linfáticos, tejido linfático de la mucosa, bazo, etc. Del mismo modo, una vez que interactúan la célula T y la DC y se produce la activación de las células T, estas sufren una serie de cambios y respuestas biológicas que da lugar a la expansión clonal. Se denomina expansión clonal al fenómeno de proliferación masiva de clones de células T que presentan la misma especificidad de antígeno que la célula T que interactuó con la DC. Esto constituye la señal 3 (Abbas *et al.*, 2015).

Las células T al reconocer el antígeno, comienzan a producir de manera autocrina IL-2, asegurando que solo las células T antígeno específicas proliferen. Los receptores funcionales de IL-2 se expresan transitoriamente en la superficie de las células T naïve. El receptor de IL-2 (IL-R2) se compone de 3 regiones, alfa, beta y gamma. De forma basal, se expresan las subunidades beta y gamma, mientras que la región alfa aparece tras la activación y la co-estimulación. En ese momento, se conforma el IL-R2 de alta afinidad, capaz de unirse a la IL-2 e inducir la proliferación masiva de las células T. La IL-2 estimula la continuidad del ciclo celular mediante la síntesis de ciclinas y la eliminación de inhibidores del ciclo celular, además de inducir la producción de Bcl-2, proteína de acción anti-apoptótica (Abbas *et al.*, 2015).

1.3. Aplicaciones terapéuticas

Hoy en día, existen fármacos basados en anticuerpos monoclonales (mAb) como herramienta en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Es el caso del Omalizumab, mAb derivado de DNA recombinante cuyo mecanismo de acción es unirse selectivamente a la inmunoglobulina E humana (IgE), principal inmunoglobulina involucrada en el desarrollo de alergias. De esta forma, previene la unión de la IgE a su receptor de alta afinidad. Este fármaco se utiliza como tratamiento de la urticaria crónica espontánea, como control del asma alérgico grave o en el tratamiento de la dermatitis atópica (Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría, 2020).

Por otro lado, los mAbs también se han estudiado en diversos ensayos para comprobar su efecto en el desarrollo de inmunoterapias contra el cáncer. La principal idea era dirigirlos contra los antígenos de superficie que muestran las células tumorales para combatirlos. Sin embargo, los tratamientos en los que únicamente se han administrado mAbs han manifestado una menor letalidad contra dichas células en comparación con la quimioterapia. Es por eso que, la siguiente propuesta fue elaborar un mAb conjugado con un fármaco o toxina (ADC) (Fu *et al.*, 2022).

Este conjugado actúa uniéndose a los antígenos presentes en la superficie de las células cancerígenas, gracias a la especificidad del mAb, y es capaz de liberar las moléculas con capacidad citotóxica cerca de su objetivo, las células cancerígenas. Debido a la especificidad

del mAb se reducen los efectos secundarios vinculados a la utilización de las moléculas citotóxicas para eliminar las células cancerígenas. Una vez se une el mAb al antígeno de superficie, el ADC y el antígeno se internalizan por endocitosis mediada por caveolas, clatrina o mediante pinocitosis. Posteriormente, se trasladan al lisosoma y será allí donde se liberen las cargas citotóxicas y podrán ejercer su función (Fu et al., 2022).

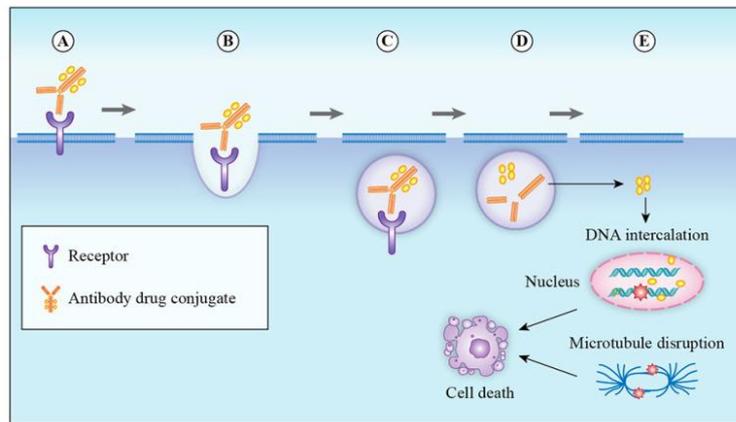


Figura 6. Proceso de internalización del ADC, que ejerce su función en el interior celular y acaba con la muerte de la célula (Hafeez *et al.*, 2020).

La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) ha aprobado alrededor de 30 mAbs para el tratamiento del cáncer, entre los que se encuentran Pembrolizumab, Trastuzumab y Brentuximab. Además, existen aproximadamente 80 ADC en ensayos clínicos activos, mayoritariamente en fase I y I/II que se centran en investigar la eficacia y seguridad de dichos fármacos en varios tumores sólidos (Dean et al., 2021; Hafeez et al., 2020).

Últimamente, las líneas de investigación se han centrado en el estudio y desarrollo de mAb que intercedan en vías de co-señalización pertenecientes a la señal 2 de activación de las células T. El fin último es tratar de regular las respuestas inmunitarias alteradas que ocurren en los casos anteriormente mencionados. Para ello, se han realizado gran variedad de bioensayos in vitro reproduciendo el conjunto de señales que inducen la activación de las células T y en el presente TFG se recopilan las principales vías de co-señalización más estudiadas con este fin.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

En algunas ocasiones, la respuesta del sistema inmunitario no se corresponde a lo que se cabría esperar. Ante un peligro, el organismo desencadena una serie de señales que alertan y activan el sistema inmunitario para que, con las herramientas que lo componen, generen una respuesta y neutralicen el peligro al que se enfrentaban. Sin embargo, existen una serie de enfermedades en las que el sistema inmunitario no actúa correctamente, este es el caso de las alergias, enfermedades autoinmunes, problemas derivados de trasplantes y cáncer. En estos casos la

respuesta inmunitaria no es suficiente o se desarrolla de forma exagerada, llegando a producir daños en el individuo.

En estas enfermedades es donde entran en juego los anticuerpos agonistas o antagonistas. En el caso de que la respuesta inmunitaria se vea suprimida, los anticuerpos agonistas tratarán de reactivarla para que ataquen al peligro al que se enfrenta el organismo. Por el contrario, en caso de que la enfermedad se genere por una respuesta exagerada del sistema inmunitario, los anticuerpos antagonistas reducirán la activación de la respuesta inmunitaria, mitigando la enfermedad.

3. OBJETIVOS

Por todo ello, el objetivo principal que se plantea en este trabajo de fin de grado es:

- Recopilación de conocimientos actuales sobre las vías de co-señalización involucradas en la regulación positiva o negativa de la activación y proliferación de las células T.

Además, existen una serie de objetivos secundarios que son:

- Conocimiento de moléculas con actividad agonista o antagonista involucradas en la co-señalización de las células T.
- Aplicabilidad de los nuevos conocimientos a diversos tratamientos en clínica

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Definición de la cuestión de investigación

Para situar el trabajo, se deberá realizar una disposición sobre los componentes que constituyen los bioensayos que estudian las vías de co-señalización.

En primer lugar, se utilizan células CHO que expresan anti-CD3 humana y un ligando co-señalizador (a estudiar). De esta forma, se consiguen células pseudo-DC capaces de estimular a las células T para que elaboren una respuesta. Las células CHO son células derivadas del tejido ovárico de *Cricétulus griseus*, conocido como hámster chino, utilizadas en el campo de la biotecnología para multitud de estudios biomédicos, cultivos celulares y producción de proteínas recombinantes de uso terapéutico (NCBI, 2020; Reinhart *et al.*, 2015).

Su amplia utilización se debe a que, al tratarse de células pertenecientes a una especie muy distante filogenéticamente, el riesgo de transmisión de agentes patógenos que puedan llegar a afectar a las células humanas es ínfima. Además, muestran unas buenas características fisiológicas, como la capacidad para expresar proteínas complejas, secretar proteínas al exterior celular y la modificación postraducciona apropiada. Incluso muestran facilidad de mantenimiento, capacidad de adaptación y facilidad de sincronizar, convirtiendo a la línea celular CHO en un modelo excelente para el estudio de la biomedicina básica, la producción de

proteínas recombinantes y el desarrollo de tratamientos clínicos (Jayapal *et al.*, 2007; Reinhart *et al.*, 2015).

Por otro lado, se utiliza la línea celular Jurkat, cuyas células presentan el TCR y el co-señalizador CD3. Se trata de una línea celular inmortalizada de células T derivada de células de leucemia linfoblástica aguda humana aisladas por primera vez de la sangre periférica de un niño de 14 años establecida a finales de los años 70. Estas células conservan las características propias de las células T de sangre periférica, crecen en suspensión, presentan un estado celular relativamente estable y con una tasa de crecimiento rápida, facilitando la obtención de una cantidad de células considerable para el desarrollo de diversos estudios, sobre todo en el campo de la inmunología (Chen y Nong, 2018).

De este modo, se pueden estudiar posibles modificaciones que alteren la activación de las células T, y en última instancia, la respuesta inmunitaria.

Búsqueda de información en la literatura científica

En la recopilación bibliográfica para la elaboración del TFG se han utilizado distintos repositorios de literatura científica de acorde al tema tratado.

En una búsqueda superficial sobre el tema, se han utilizado el motor de búsqueda Google Académico (<https://scholar.google.es/schhp?hl=es>) y el repositorio de libre acceso de literatura biomédica y ciencias de la vida desarrollado por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de los Estados Unidos, PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>). Se utilizaron términos de búsqueda como “vías de co-señalización” o “activación de células T” (al utilizar la base de datos PubMed, dichos términos eran introducidos en inglés).

Una vez realizada la búsqueda superficial, se utilizaron los recopilatorios de artículos científicos Web of Science (<https://www.recursoscientificos.fecyt.es/>) y ScienceDirect de Elsevier (<https://www.sciencedirect.com/>) para la recopilación de artículos más específicos sobre las vías de co-señalización en la activación de células T y factores de transcripción implicados en el proceso de proliferación y diferenciación (en ambos recopilatorios de artículos científicos las búsquedas se realizaron en inglés).

Además, para las figuras de elaboración propia se ha utilizado la plataforma de dibujo online BioRender (<https://biorender.com/>) como herramienta en el desarrollo de imágenes profesionales del ámbito científico.

Por último, para la recopilación de bibliografía y la elaboración de las citas y referencias que aparecen a lo largo del trabajo se ha utilizado la herramienta bibliográfica Mendeley Desktop, citando las referencias bibliográficas en el estilo Harvard_ULe.

5. RESULTADOS

Diseño de células T de triple parámetro y células estimuladoras de células T

Generalmente, en los bioensayos que estudian las moléculas de co-estimulación son necesarias dos tipos celulares: células de triple parámetro (TPR) y células estimuladoras de células T (TCS) (Jutz *et al.*, 2016).

En primer lugar, las células TPR son células Jurkat que han sido transducidas con tres plásmidos distintos con las siguientes construcciones: NF- κ B-CFP, NFAT-eGFP y AP-1-mCherry. Cada construcción consta de un factor de transcripción y una molécula *reporter*. Los factores de transcripción utilizados son: el factor nuclear kappa B (NF- κ B), el factor nuclear de células T activadas (NFAT) y la proteína activadora 1 (AP-1). Por otro lado, las moléculas *reporter* son: la proteína fluorescente cian (CFP), la proteína fluorescente verde (GFP) y mCherry. De esta forma, si la co-estimulación estudiada tiene algún efecto en la célula T, se inducirá la expresión de los factores de transcripción citados anteriormente y se obtendrá una fluorescencia que se registrará. Sin embargo, si no se produce la co-estimulación entre las moléculas estudiadas, no se expresarán los factores de transcripción y no habrá fluorescencia (Jutz *et al.*, 2016).

Por otro lado, las células TCS se generan transfectando células CHO con una construcción que contiene las cadenas ligeras y pesadas del mAb anti-CD3 (OKT3). Este mAb es capaz de modular la respuesta antigénica del complejo TCR-CD3 de las células T. De esta forma, conseguimos células pseudo-DC capaces de estimular la activación de células T. Además, se debe expresar la molécula co-señalizadora que se pretenda estudiar (Serpieri *et al.*, 2010).

Moléculas de co-señalización con aplicación clínica

La proteína de membrana co-inhibidora PD-1 (Programmed Cell Death Protein 1)

La molécula de muerte celular programada 1 (PD-1), también conocida como CD279, es una proteína transmembrana de tipo I perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). Inicialmente, se determinó que lo expresaban las células apoptóticas. Sin embargo, después se describió como un punto de control inmunitario en la respuesta de las células T y B. Se trata de un marcador de células T efectoras, debido a que se expresa tras la activación de las células T. Asimismo, es un inhibidor de la respuesta inmunitaria, tanto innata como adaptativa, al presentar un patrón de expresión en diversas células inmunitarias como las células B, macrófagos, monocitos y células T efectoras. Está implicado en disminuir las respuestas inmunitarias dañinas y mantener la tolerancia inmunitaria (Ai *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2020).

La expresión de PD-1 está mediada por varios factores de transcripción en las células T activadas tras el reconocimiento del antígeno por el TCR. Estos factores incluyen T-bet, la

proteína de maduración inducida por linfocitos B 1, el factor nuclear citoplasmático de células T activadas y la proteína de caja de cabeza de horquilla O1, entre otros. En el caso de que el antígeno activador se elimine, la expresión de PD-1 disminuye, pero si se mantiene constante, como es el caso de las infecciones crónicas y cánceres, PD-1 se expresa en altos niveles de forma sostenida (Ai *et al.*, 2020).

Contiene un dominio extracelular similar a los dominios inmunoglobulina variable (IgV), que sirve de unión a ligando, un dominio transmembrana, que sirve como anclaje a la membrana celular, y un dominio intracelular de señalización. Este dominio intracelular contiene a su vez una cola citoplasmática con un motivo inhibidor de tirosinas de inmunorreceptor (ITIM) y un motivo de cambio basado en tirosina de inmunorreceptor (ITSM) (Ai *et al.*, 2020).

PD-1 tienen un modo de acción inhibitorio indirecto. Durante el proceso de activación de las células T, PD-1 interacciona con el ligando de PD-1 (PD-L1/2) y cambia su conformación, trasladándose a microclusters de TCR y acumulándose en el cluster de activación supramolecular central de señalización. En ese momento, la cola citoplasmática es fosforilada por las quinasas de la familia SRC, sirviendo de sitios de acoplamiento de tirosina-proteína fosfatasas 1 y 2 (SHP-1/2). Aunque ambas fosfatasas se unen a los sitios fosforilados, se ha demostrado que solo SHP-2 es el que realmente interacciona con la cola citoplasmática de PD-1. Esta interacción atenúa la fosforilación de ZAP70 mediada por la proteína tirosina quinasa específica de linfocitos (Lck), afectando a las vías de señalización de PI3K–AKT, quinasa regulada por señales extracelulares ERK, RAS y fosfolipasa C γ . Asimismo, puede inhibir las funciones de las células T con el aumento de la expresión de factores de transcripción como el factor transcripcional de cremallera de leucinas básico similar a ATF, regulando negativamente la expresión de genes efectores (Ai *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020).

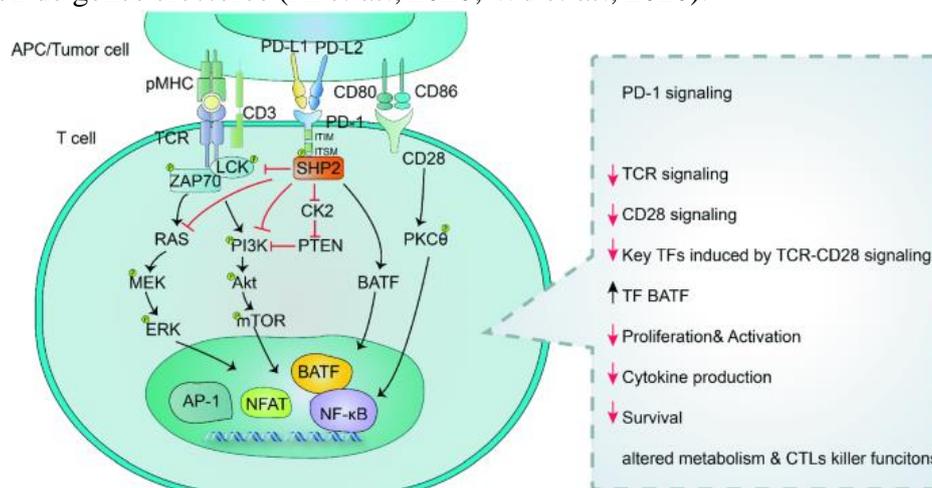


Figura 7. Modelo de señalización de PD-1. Cuando interacciona con PD-L1 o PD-L2. Se inhibe una cascada de señalización en la que se encuentran involucradas moléculas como PI3K o RAS y la vía de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) (Ai *et al.*, 2020).

Finalmente, la interacción de PD-1 con sus ligandos implica una reducción funcional en la proliferación, activación, supervivencia y producción de citoquinas de las células T, entre otros (Ai *et al.*, 2020).

El contexto en el que más se ha estudiado la interacción de PD-1 y PD-L1 ha sido en los tejidos tumorales. En el momento en que las células del sistema inmunitario son alertadas de la presencia de células cancerígenas, se activan y tratan de eliminarlas. Sin embargo, las células del tumor detectan que quieren ser eliminadas y desarrollan mecanismos de evasión para su propia supervivencia. De esta forma, las células T CD8⁺ secretan interferón gamma (IFN-γ), el cual se une a unos receptores específicos expresados en la membrana de las células tumorales y se induce la expresión de PD-L1. Las células T CD8⁺ expresan en su superficie PD-1, por lo que interacciona con PD-L1 expresado en las células tumorales y se inhibe la función efectora de las células T CD8⁺. De esta forma, las células tumorales evaden la respuesta inmunitaria y mejora su tumorigénesis y capacidad invasiva (Han *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020).

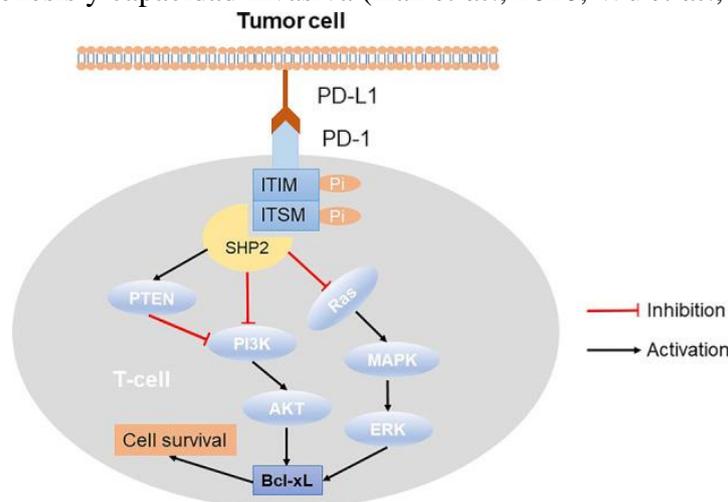


Figura 8. Modelo de señalización entre una célula tumoral y una célula T. Al interaccionar PD-1 y PD-L1, se induce una cascada de señalización que acaba inhibiendo las funciones efectoras de la célula T y facilitando la supervivencia de la célula tumoral (Wu *et al.*, 2020).

Por tanto, el bloqueo de la interacción de PD-1 y PD-L1 es una clara diana inmunoterapéutica para desarrollar tratamientos contra el cáncer. Al bloquear dicha interacción, se puede eliminar las condiciones inmunosupresoras, reestableciendo la capacidad de las células inmunitarias para eliminar las células tumorales. En 2014, la FDA aprobó el primer fármaco basado en mAb, denominado Nivolumab. Este es capaz de unirse a PD-1 bloqueando su interacción con PD-L1. En los últimos años, se han ido aprobando más fármacos basado en mAb para el bloqueo de PD-1/PD-L1: Atezolizumab, Durvalumab y Avelumab. Todos ellos han sido aprobados para una variedad de tumores malignos, como melanoma, cáncer de vejiga, carcinoma de células de Merkel de la piel y cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico (Wu *et al.*, 2020).

La proteína co-inhibidora CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)

El antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) es una proteína involucrada en la regulación de la respuesta inmunitaria. Se describió por primera vez como una señal inhibitoria en la co-señalización de las células T. Además, muestra una gran similitud estructural con CD28, pero tiene efectos opuestos, compitiendo por su unión a B7. Mientras que CD28 contribuye en la fase de co-estimulación, CTLA-4 inhibe la co-estimulación. Asimismo, se ha demostrado que la unión de CTLA-4 a los receptores B7 es mucho más afín en comparación a CD28. De esta forma, se mantiene un balance entre la activación y la regulación negativa de las células T. En condiciones normales, CTLA-4 se encuentra confinado en vesículas citoplasmáticas y su expresión en la superficie está regulada por clatrina. La expresión de CTLA-4 es gradual a medida que avanza el proceso de expansión clonal y diferenciación a células T efectoras. CTLA-4 expresado en las células T reguladoras (Treg) y células T efectoras secuestra B7.1/B7.2 de la DC y así regula la co-estimulación. De esta forma se regula su unión al grupo de receptores B7 (CD80/86) evitando la temprana finalización de la respuesta inmunitaria (Cavanagh y Gwyer Findlay, 2021; Hosseini *et al.*, 2020; Téllez Castillo *et al.*, 2017).

El gen que codifica para CTLA-4 se encuentra en el cromosoma 2q33, compuesto por cuatro exones. El exón 1 corresponde al péptido líder, el exón 2 codifica el dominio extracelular, el exón 3 el dominio transmembrana y el exón 4 el dominio intracelular. Sin embargo, esta proteína se puede expresar de diferentes formas (Hosseini *et al.*, 2020).

En primer lugar, puede expresarse completa con las 4 regiones (péptido líder, dominio extracelular, dominio transmembrana y dominio intracelular), pudiéndose anclar a la membrana de las células que lo expresan. Se induce su expresión tras la señal 1 (TCR activación) y señal 2 (co-estimulación) (Hosseini *et al.*, 2020).

También puede expresarse de forma soluble en ausencia del exón 3 de dominio transmembrana. Su expresión es predominante en las células T en reposo y en las células Treg. Se ha demostrado que sus polimorfismos se vinculan con el desarrollo de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico o la diabetes tipo 1 (Hosseini *et al.*, 2020).

Incluso pueden expresarse solo los exones 1 y 4, sin dominio transmembrana, ni región extracelular. Al igual que en el caso anterior, la expresión truncada de CTLA-4, conduce a su acumulación y al desarrollo de enfermedades autoinmunes (Hosseini *et al.*, 2020).

Por último, la proteína CTLA-4 puede expresarse sin el exón 2, siendo independiente de la unión de ligando al no expresar el dominio de unión. Esta forma de expresión de CTLA-4 se ha correlacionado con una menor susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo 1 (Hosseini *et al.*, 2020).

La región extracelular contiene un dominio IgV de unión a ligando. Asimismo, el dominio transmembrana sirve para el anclaje de la proteína a la superficie de la célula. Por último, el dominio intracelular consta de una cola citoplasmática que media las vías de señalización inhibitoria. Esta cola citoplasmática consta de 36 aminoácidos (aa) con cuatro motivos de unión: lisina, tirosina 201, prolina y tirosina 218. Los motivos de tirosina son fosforilados por tirosina quinasas de la familia SRC, como la tirosina-proteína quinasa Lyn, la tirosina-proteína quinasa Fyn (FYN) y LcK, lo que recluta SHP-2. Cuando se recluta, se regula negativamente la activación de ZAP70 y la vía de señalización mediada por RAS. En último lugar, se inhibe la actividad de AP-1 y NFAT, afectando en menor medida la actividad de NF- κ B. Además, se ha determinado que NFAT está implicado en la inducción de la expresión de CTLA-4 (Hosseini *et al.*, 2020; Kim y Choi, 2022).

Su mecanismo de acción consiste en inhibir la co-estimulación, afectando a la expresión de la subunidad alfa de IL-R2. Sin la subunidad alfa, IL-R2 no presenta alta afinidad, por lo que no se une eficientemente IL-2 y disminuye la señal de proliferación celular (Hosseini *et al.*, 2020).

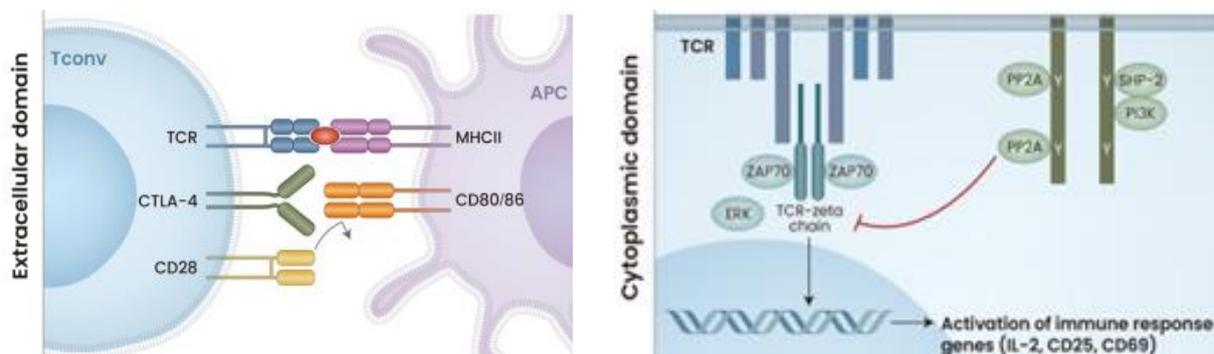


Figura 9. Modelo de interacción y señalización de CTLA-4/B7. La unión de CTLA-4 a B7 induce la inhibición de la activación de los genes relacionados con la respuesta inmunitaria (Kim y Choi, 2022).

Otro punto de vista a tener en cuenta es la expresión constitutiva de CTLA-4 en las células Treg. La interacción de CTLA-4 con B7 induce la transendocitosis de dichos ligandos al interior de la DC, ya que la competencia de CTLA-4 por B7 no es suficiente para interrumpir la co-estimulación por parte de CD28. De esta forma, las células Treg contribuyen a la modulación de la activación de las células T efectoras. Asimismo, se ha demostrado que las células Treg, con esta interacción, mejoran la expresión de la enzima indolamina 2.3-dioxigenasa (IDO) en las células DC. IDO está implicada en la degradación del triptófano, aminoácido esencial necesario para la progresión del ciclo celular, en compuestos tóxicos para la célula (3-hidroxiquinurenina y ácido quinolínico). En última instancia, la acción de IDO acaba con la muerte celular de las DC, inhibiendo la activación de las células T (Kim y Choi, 2022; Ovcinnikovs *et al.*, 2019; Salminen, 2022; Van Coillie *et al.*, 2020).

Finalmente, CTLA-4 tiene la capacidad de inhibir la co-señalización en las células T, regulando su activación y protegiendo al organismo del desarrollo de enfermedades autoinmunes (Hosseini *et al.*, 2020).

Debido a la importante implicación de esta vía de co-señalización en la activación de las células T, se han desarrollado varios fármacos basados en mAb que interfieren con esta vía. Uno de los utilizados en clínica es Ipilimumab, generalmente administrado en pacientes que padecen carcinoma avanzado de células renales, carcinoma hepatocelular o melanomas. Otro fármaco anti-CTLA-4 aprobado recientemente por la FDA es Imjudo (tremelimumab), mAb anti-CTLA-4 que se administra junto con Imfinzi (durvalumab), mAb anti-PD-L1, como tratamiento para pacientes adultos con carcinoma hepatocelular (AstraZeneca, 2022; Saad and Kasi, 2023).

La proteína de membrana LAG-3 (Lymphocyte-activation gene 3)

El gen-3 de activación de linfocitos (LAG-3) es una proteína transmembrana de tipo 1 con 525 residuos aminoacídicos que presenta gran homología con CD4 y se encuentra en células T, células B, células asesinas naturales (NK) activadas y en células DC plasmocitoides (Chocarro *et al.*, 2021; De Sousa *et al.*, 2018).

La secuencia que codifica para la proteína LAG-3 se encuentra adyacente a la secuencia correspondiente al correceptor CD4. Ambos tienen una organización de intrones/exones similares. Esto sugiere que ambas secuencias se generaron por duplicación de genes a partir de un ancestro común (Chocarro *et al.*, 2021).

El gen que codifica para LAG-3 está compuesto por 8 exones:

Tabla 1. Conjunto de exones que pertenecen a la secuencia del gen LAG-3 con la región a la que corresponden y cuantos aminoácidos codifican (Chocarro *et al.*, 2021).

Región extracelular						Región transmembrana	Región citoplasmática
Péptido líder	Región extracelular						
Exón 1	Exón 2	Exón 3	Exón 4	Exón 5	Exón 6	Exón 7	Exón 8
19 aa	9 aa y 41 aa	101 aa	90 aa	92 aa	81 aa	44 aa	21 aa

Al tratarse de una proteína transmembrana se puede diferenciar tres partes. En primer lugar, la región extracelular, que es de gran tamaño en comparación con otras moléculas co-inhibidoras (PD-1, CTLA-4...) y comparte gran homología con CD4. Consta de cuatro dominios Ig y su característica principal es que se une a moléculas MHCII, incluso con mayor afinidad que CD4, en vez de a ligandos co-inhibidores convencionales. Esto indica que la inhibición mediada por LAG-3 se dirige directamente a la señal de activación mediada por la presentación del antígeno y no a las señales co-estimuladoras. Además de la molécula MHCII, también se une a otros ligandos como la galectina-3 (Gal-3), una lectina de unión a galactosa que modula la activación

de las células T, inhibiendo la capacidad citotóxica de las células T CD8⁺. También se ha descrito otro ligando de unión a LAG-3, la lectina de células sinusoidales hepáticas (LSECtin). Por último, la proteína similar al fibrinógeno 1 (FGL-1) se identificó en los últimos años como nuevo ligando de unión a LAG-3, relacionándose con un mecanismo de evasión a la respuesta inmunitaria tumoral (Chocarro *et al.*, 2021; De Sousa *et al.*, 2018).

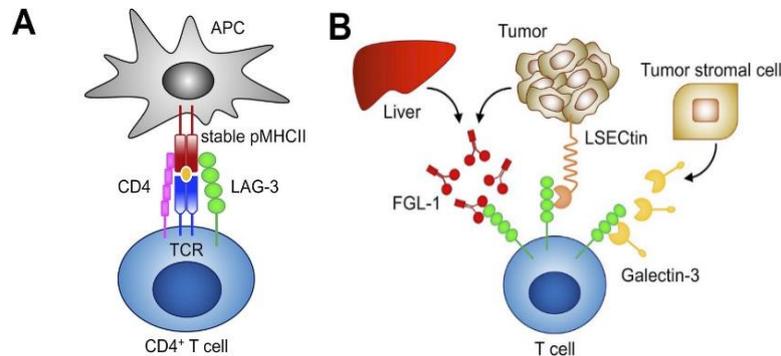


Figura 10. Ligandos a los que se une la proteína LAG-3.

A) MHCII se une específicamente a LAG-3, compitiendo con CD4 por su unión e inhibiendo la activación de las células T CD4⁺.

B) Otros ligandos de LAG-3 como FGL-1, Gal-3 o LSECtin (Maruhashi *et al.*, 2020).

Seguidamente, se encuentra la región transmembrana, cuya función es anclar la proteína a la membrana celular (De Sousa *et al.*, 2018).

Por último, la región citoplasmática presenta una cola aminoacídica de 54 residuos que no muestra ningún motivo clásico relacionado con las vías inductoras de señalización. No obstante, en la secuencia se encuentran diferentes motivos no canónicos como el motivo de serina potencialmente fosforilable (S454), el motivo KIEELE y motivos de dipéptido de ácido glutámico y prolina, motivo EP (De Sousa *et al.*, 2018).

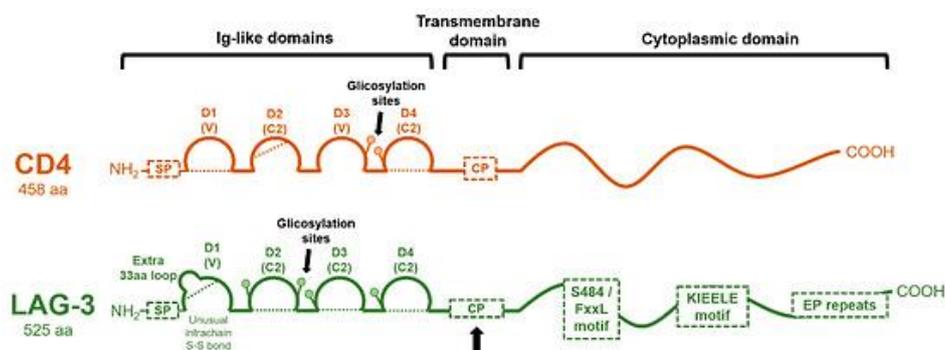


Figura 11. Representación de las regiones extracelular, transmembrana y citoplasmática de las proteínas LAG-3 en comparación con CD4. Las líneas de puntos corresponden a puentes de disulfuro. SP: péptido señal; CP: péptido conector (Chocarro *et al.*, 2021).

El motivo de serina potencialmente fosforilable se ha encontrado dentro del motivo FxxL, pero solo se ha relacionado con la producción de IL-2. El motivo KIEELE corresponde a una secuencia corta altamente conservada que no se encuentra en otras proteínas. Su contribución a la función de LAG-3 sigue siendo motivo de estudio, pero su eliminación se ha relacionado con

una pérdida de función total de la proteína, lo que destaca su importancia. Por último, el motivo EP se encuentra en algunas proteínas de diversas especies, lo que puede indicar una función biológica común. A este motivo se une la proteína asociada a LAG-3 (LAP), clave para la inhibición de la vía de activación mediada por TCR-CD3. Esto permite localizar LAG-3 con CD3, CD4 y CD8 en la misma balsa lipídica. Además, se relaciona con la prevención de que LAG-3 actúe como correceptor estimulador como CD4 (Chocarro *et al.*, 2021).

Al tratarse de motivos no convencionales, se cree que los mecanismos de inhibición mediados por LAG-3 no se comparten con otros puntos de control inmunitarios (De Sousa *et al.*, 2018). Por todo ello, se ha determinado que LAG-3 funciona como un regulador negativo de la proliferación, activación y función efectora de las células T CD4⁺ y CD8⁺. Por tanto, se puede deducir que LAG-3 interviene en la inhibición de algún punto en común entre la activación de CD4 y CD8. Asimismo, se ha relacionado LAG-3 con distintas enfermedades. En el caso del cáncer, la expresión de LAG-3 en células T es un marcador de progresión agresiva en distintos tumores humanos como melanoma, linfoma de Hodgkin, cáncer gástrico... En la enfermedad de Parkinson, enfermedad cardíaca coronaria e hipercolesterolemia su expresión se relaciona con un mayor riesgo de padecer la enfermedad. También se ha descrito que la expresión de LAG-3 podría prevenir eficazmente algunos trastornos autoinmunes, como en el caso de la diabetes mellitus. En último lugar, cuando se dan estimulaciones continuas de antígenos como en el cáncer o infecciones virales crónicas, su expresión continua se relaciona con el estado de agotamiento de las células T CD4⁺ y CD8⁺ (Chocarro *et al.*, 2021).

Tras los amplios estudios sobre la implicación de LAG-3 en diversas enfermedades, finalmente la FDA aprobó el pasado año 2022 la terapia combinada de Relatlimab (mAb anti-LAG-3) y Nivolumab, (mAb anti-PD-1) en el tratamiento de melanoma metastásico en pacientes adultos (Paik, 2022).

Moléculas de co-señalización en desarrollo preclínico

La proteína *TIGIT* (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains)

La inmunoglobulina de células T y el dominio ITIM (*TIGIT*) es un receptor inhibitorio perteneciente a una familia de proteínas similares a PVR. Se trata de una proteína transmembrana de tipo 1 que se expresa en diferentes células inmunitarias (Harjunpää y Guillerey, 2020; Yue *et al.*, 2022).

Esta proteína transmembrana está compuesta por tres dominios. En primer lugar, un dominio extracelular que contiene un dominio IgV con homología de secuencia con otros miembros de la familia PVR como CD226, CD113, CD155 y CD112, entre otros. Después, un dominio

transmembrana que ancla la proteína a la membrana celular. Por último, un dominio intracelular que cuenta con una cola citoplasmática corta con un motivo ITIM y un motivo similar a la cola de tirosina de inmunoglobulina (ITT) (Harjunpää y Guillerey, 2020; Yue *et al.*, 2022).

Esta proteína es expresada en la superficie de las células NK, células T CD4⁺, T CD8⁺ y Treg, siendo su máxima expresión en el estado activado de dichas células, en comparación con las células inactivas (Yue *et al.*, 2022).

Se han identificado tres ligandos que se unen a la parte extracelular, CD112, CD113 y CD155. Los tres ligandos pertenecen a una familia de moléculas de nectina y NECL. Esta familia de moléculas media la polarización celular, la adhesión celular y la organización de los tejidos. En cambio, TIGIT se une con mayor afinidad a CD155 en comparación con CD112 y CD113. CD155 se expresa tanto en células DC, células B, células T y macrófagos como en tejido no hematopoyético (sistema nervioso, intestino...). En el caso de CD113, su expresión es exclusiva de tejido no hematopoyético, como la placenta, riñones, hígado o pulmones. Por último, CD112 se expresa en tejido hematopoyético y no hematopoyético, como los pulmones, páncreas o médula ósea. Un punto a destacar es que la producción de citoquinas como IFN- γ o la expresión de oncogenes regulan al alza tanto CD155 como CD112 en una gran variedad de neoplasias malignas humanas (Yue *et al.*, 2022).

Se han planteado diversos modelos de acción para la inhibición mediada por TIGIT en las células NK y células T. En primer lugar, TIGIT puede actuar de manera intrínseca al interferir en la co-estimulación de CD226 o con señales directas de inhibición a la célula. Por una parte, dada la alta afinidad de TIGIT por CD155 se ha planteado que supera a la interacción de TIGIT-CD226. Esto se planteó al estudiar la eliminación de TIGIT en las células T CD4⁺, que dio como resultado un aumento en la producción de IFN- γ , lo cual podía superarse al bloquear CD226. Asimismo, diversos estudios han determinado que, al emplear mAb anti-TIGIT agonistas, se ha inhibido la proliferación de células T. Por otra parte, puede transmitir señales inhibitorias directamente a través de su cola citoplasmática. Se ha demostrado que para ello, el motivo ITIM es imprescindible. Sin embargo, el motivo ITT también es importante para la señalización, destacando dos vías de señalización diferentes involucradas en la producción de IFN- γ y la citotoxicidad. Cuando se une el ligando a TIGIT, se fosforila el motivo similar a ITT, se une a la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (Grb-2) y se recluta la inositol fosfatasa-1 (SHIP-1), lo que inhibe PI3K y la activación de la cascada de señalización MAPK. Finalmente, se inhibe la capacidad de eliminación de las células NK. La segunda vía comienza con la asociación del adaptador beta-arrestina 2 con TIGIT fosforilado, reclutándose

SHIP-1 al motivo similar a ITT y alterando la autoubiquitinación del factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TNF), eliminando el NF- κ B inhibiendo la producción de IFN- γ (Yue *et al.*, 2022).

Del mismo modo, puede actuar de manera extrínseca al interactuar con CD155. Esta interacción se ha relacionado con la regulación en la producción de citoquinas de las células DC. Aumenta la secreción de IL-10 mientras que disminuye la secreción de IL-12. Esto sugiere que la interacción TIGIT-CD155 promueve las células DC tolerogénicas, regulando a la baja las respuestas de las células T (Yue *et al.*, 2022).

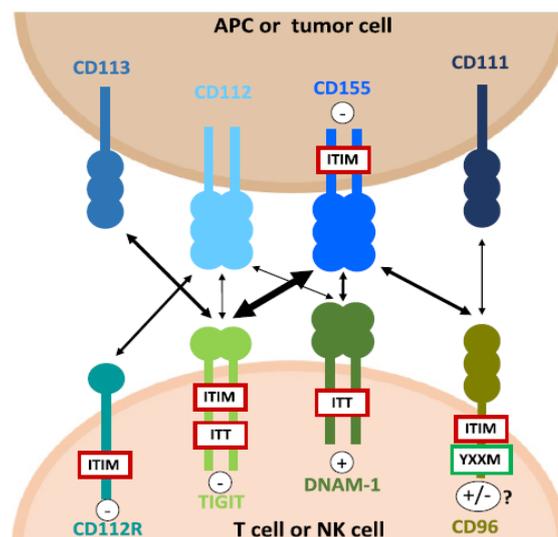


Figura 12. Modelo de interacción de TIGIT con sus ligandos. Las flechas indican las posibles interacciones de TIGIT con sus ligandos y sus mecanismos de acción (Harjunpää y Guillerey, 2020).

Sin embargo, todavía no está claro si todos los mecanismos tienen lugar en las células que expresen TIGIT o son exclusivas de cada tipo celular (Yue *et al.*, 2022).

La proteína de membrana BTLA (B and T lymphocyte attenuator)

El atenuador de linfocitos B y T (BTLA) es una proteína transmembrana de tipo 1 perteneciente a la superfamilia CD28 y comparte similitudes en cuanto a su estructura y función con PD-1 y CTLA-4. Esta glicoproteína co-señalizadora es expresada por una amplia variedad de células, desde el bazo, timo y ganglios linfáticos, hasta células inmunitarias como células B, células T CD4⁺, T CD8⁺, DC o monocitos (Ning *et al.*, 2021; Wojciechowicz *et al.*, 2022).

El gen que codifica para esta glicoproteína está localizado en el cromosoma 3, concretamente en la región q13.2 y se compone de 5 exones con un total de 870 pb. Está compuesta de 289 aa distribuidos en un péptido señal (30 aa), un dominio extracelular (127 aa), un dominio transmembrana para anclarse a la membrana celular (21 aa) y un dominio intracelular (111 aa) (Ning *et al.*, 2021; Wojciechowicz *et al.*, 2022).

El dominio extracelular contiene un dominio intermedio de inmunoglobulina, que permite la unión del mediador de entrada del virus del herpes (HVEM), única molécula identificada como ligando de BTLA. Este ligando pertenece a la superfamilia de receptores del TNF y puede unirse a BTLA tanto de forma *cis* como *trans*. En el caso de que la unión sea *cis* significa que ambas moléculas son expresadas en la misma célula. Sin embargo, si la interacción es *trans*, las moléculas se encuentran en membranas celulares distintas e interaccionan dos células diferentes (Ning *et al.*, 2021; Wojciechowicz *et al.*, 2022).

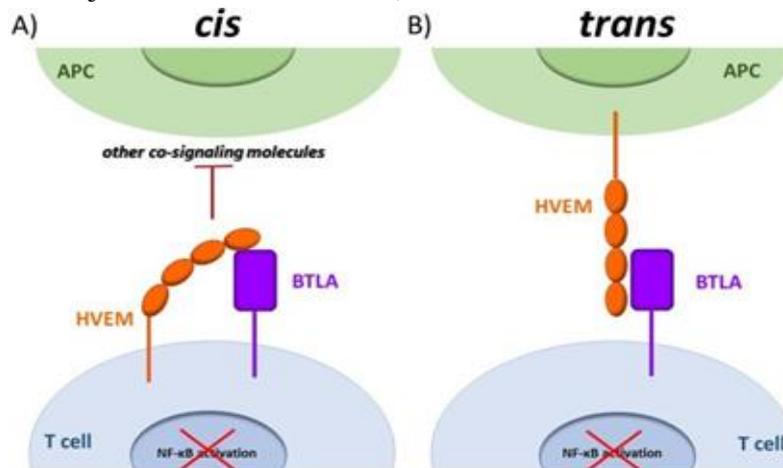


Figura 13. Interacción *cis* y *trans* de BTLA con su ligando HVEM. En el caso de las interacciones *cis*, no hay co-señalización hacia otras células, mientras que en la interacción *trans* si existe tal co-señalización (Wojciechowicz *et al.*, 2022).

En el dominio intracelular se encuentra una cola citoplasmática que presenta el motivo de asociación a Grb-2, el motivo ITSM y un motivo ITIM. Cuando se une HVEM, se fosforilan las tirosinas de ITIM y se reclutan SHP-1 y SHP-2. Recientemente, se ha demostrado que BTLA tiene preferencia sobre SHP-1 en el reclutamiento de fosfatasa. Del mismo modo, cuando Grb-2 interacciona con su motivo de unión se recluta la subunidad p85 de la proteína PI3K y ejerce su función. Estas vías de señalización conducen a una activación reducida de NFAT, NF-κB, y en mucha menor medida de AP-1. Se ha demostrado que mutaciones en las tirosinas de ITSM e ITIM suprimen la función inhibitoria de BTLA, lo que resalta su importante función en la señalización celular (Jutz *et al.*, 2017; Ning *et al.*, 2021).

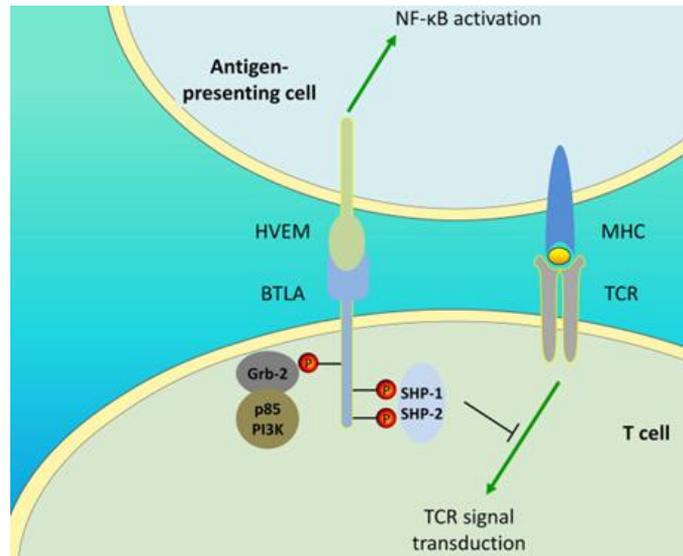


Figura 14. Modelo de señalización de la interacción BTLA/HVEM. La unión de ambas moléculas induce la fosforilación de la cola citoplasmática y el reclutamiento de Grb-2 o de fosfatasa (SHP1/2) (Ning *et al.*, 2021).

En las células T, su expresión depende del estadio de desarrollo en el que se encuentre la célula. Se expresa en células T naïve, y su expresión aumenta durante el proceso de activación de dichas células, pero disminuye una vez las células T se han convertido en células T efectoras. Además, la manera de interactuar con el ligando también cambia. En el momento en que se activan las células T, la interacción pasa de *cis* a *trans*, al internalizarse HVEM. Se ha demostrado que esta molécula no es esencial en el desarrollo de las células T, pero puede interferir negativamente en su activación y proliferación. En estudios posteriores en los que se evaluaron los efectos de mAb agonista de BTLA, determinaron que el mAb era capaz de inhibir la producción de ciertas citoquinas (IL-10 e IFN- γ) y la proliferación de las células T. Del mismo modo, cuando se estudiaron mAb antagonistas de BTLA, los resultados fueron una mayor activación y proliferación de las células. Por otro lado, en varios ensayos, las células T que no expresaban BTLA mostraban mayores niveles de proliferación y una hipersensibilidad en la activación mediada por TCR. Sin embargo, recientemente se ha desvinculado la ausencia de BTLA con una mayor proliferación. En ausencia de BTLA no es que aumente la proliferación, si no que disminuye su muerte. Por tanto, la expresión de BTLA en las células T regula tanto la producción de citoquinas como su activación y la cantidad de células activadas (Ning *et al.*, 2021).

Por último, su expresión en las DC aumenta con la maduración de las células. Sin embargo, al igual que en el caso anterior, la expresión de BTLA en las células DC no es esencial para su desarrollo, pero su interacción con HVEM puede inhibir su proliferación, lo que indica que BTLA sirve como control en la homeostasis de las células DC. Del mismo modo, varios ensayos han determinado que las células DC que expresan BTLA son capaces de regular el shock

endotóxico inducido por LPS, al inhibir la señalización mediada por TLR4, y la conversión de células Treg periféricas al regular al alza CD5 (Ning *et al.*, 2021).

En cuanto a su función biológica, BTLA está involucrada en varias enfermedades, entre otras, la sepsis, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes y tumores. En las enfermedades inflamatorias, la ausencia de BTLA mantiene una inflamación prolongada, aumentando la producción de IFN- γ y el reclutamiento de células inflamatorias. Del mismo modo, un grupo de investigadores ha determinado que la ausencia de células BTLA⁺ es crucial para la supervivencia por sepsis, reduciendo el número de neutrófilos, la secreción de IL-10 (citoquina proinflamatoria) y el reclutamiento de leucocitos. En el caso de las enfermedades autoinmunes, BTLA es fundamental para la protección contra dichas enfermedades, como se demostró en varios experimentos con ratones BTLA ^{-/-}, los cuales desarrollaban espontáneamente una enfermedad similar a la hepatitis autoinmune. También en la esclerosis múltiple, lupus y artritis reumatoide se encuentran niveles más bajos de expresión de BTLA. Por último, en el caso de los tumores, BTLA altera la respuesta inmunitaria antitumoral. Por ejemplo, en el cáncer de vesícula biliar, el aumento de la expresión de BTLA se ha correlacionado con un resultado desfavorable en los pacientes y generalmente se relaciona con estadios avanzados de la enfermedad (De Sousa *et al.*, 2018; Ning *et al.*, 2021).

Por todo esto, se ha determinado que BTLA tiene funciones duales según el contexto celular y la enfermedad que se manifieste. Sin embargo, son necesarios más estudios que determinen específicamente el papel de BTLA y su posible manipulación como diana en el desarrollo de inmunoterapias (Ning *et al.*, 2021).

La proteína de membrana TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain 3)

La proteína 3 de inmunoglobulina con dominio mucina de las células T (TIM-3) es una molécula presente en la superficie de las células del sistema inmunitario que, en un principio, se descubrió como marcador de la producción de IFN- γ . TIM-3 es uno de los representantes de la familia proteica TIM, la cual se ha relacionado con enfermedades autoinmunes y procesos alérgicos. Además, se ha determinado que está corregulado y coexpresado en células T CD4⁺ y CD8⁺, junto con otros receptores de puntos de control inmunitarios, como pueden ser PD-1, TIGIT y LAG-3 (Acharya *et al.*, 2020).

Esta proteína está codificada por el gen *HAVCR2* que se encuentra en el cromosoma 5q33.3 y presenta numerosos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Estas alteraciones genéticas se encuentran tanto en la región promotora como en la región codificante y se han relacionado con la predisposición a desarrollar algunos tipos concretos de cáncer. Por ejemplo, en la región promotora del gen se encuentran SNPs como -1516 G/T y -574 G/T relacionados con un mayor

riesgo de cáncer, -1516 G/T, -882 C/T y -574 G/T asociados con una mayor susceptibilidad al cáncer gástrico y -1516 G/T correlacionado con una mayor susceptibilidad al cáncer de mama y progresión de este. En los SNPs de la región codificante destaca +4259 T/G asociado a un mayor riesgo de cáncer (Acharya *et al.*, 2020).

Otra de las alteraciones genéticas de TIM-3 son las mutaciones relacionadas con la pérdida de función de *HAVCR2*. Estas mutaciones se localizan en el dominio extracelular de la proteína, influyendo en su plegamiento dando como resultado una proteína TIM-3 mal plegada. Al estar mal plegada, se agregan en el interior de la célula, por lo que no se expresan en la membrana celular y se pierde su función. Esta pérdida de función se traduce en un fenotipo autoinmune en el que destaca la excesiva producción de moléculas proinflamatorias como IL-18, CD25, CXCL10 entre otras (Acharya *et al.*, 2020).

TIM-3, al igual que el resto de proteínas de la familia TIM, es una proteína de transmembrana de tipo 1 que presenta tres regiones: dominio extracelular IgV, dominio transmembrana y dominio intracelular glicosilado de longitud variable (Acharya *et al.*, 2020).

En primer lugar, se han identificado cuatro ligandos distintos que se unen a la región extracelular de TIM-3: galectina-9 (Gal-9), proteína B1 del grupo de alta movilidad (HMGB1), fosfatidilserina (PtdSer) y la molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario-1 (CEACAM-1) (Acharya *et al.*, 2020).

Gal-9 fue identificado como el primer ligando de TIM-3. Se trata de una lectina tipo C de mamífero de 36 kDa producida y secretada tanto por células inmunitarias (células T, mastocitos, macrófagos...) como por células no inmunitarias (fibroblastos, células del tracto gastrointestinal, células endoteliales...). Es capaz de unirse al dominio IgV de TIM-3 de ratón a través de una estructura de carbohidrato, consiguiendo la oligomerización de TIM-3 en la superficie de la célula y la inhibición de la célula T. Por otro lado, HMGB1 es una proteína nuclear no histona con múltiples funciones dependiendo de su localización subcelular. Varios estudios en modelos de cáncer murino determinaron que TIM-3 presente en la superficie de células DC es capaz de unirse a HMGB1 y evitar la activación de las células DC en el microambiente tumoral. Asimismo, PtdSer es un fosfolípido localizado en la membrana de las células apoptóticas que es capaz de unirse a cualquiera de los miembros de la familia TIM. Sin embargo, la unión de PtdSer y TIM-3 es cinco veces menor en comparación con el resto de las proteínas de la familia TIM. A pesar de no conocerse completamente las consecuencias de esta interacción, varios estudios indican que es importante en la eliminación de las células apoptóticas por parte de las células DC CD8⁺ TIM-3⁺ mediante fagocitosis. Por último, CEACAM1 es una proteína transmembrana de tipo I que se expresa en diversas células como

células T, macrófagos y células tumorales, entre otras. Es capaz de interactuar tanto intracelular como extracelularmente con TIM-3. En el caso de unirse intracelularmente, se promueve la maduración de TIM-3. En cambio, si se une extracelularmente puede desencadenar una cascada de señalizaciones que desemboque en la inhibición de la señalización mediada por TCR. Cabe destacar que la unión de uno de estos ligando a TIM-3 no es excluyente para que otros ligandos distintos se unan simultáneamente. Por ejemplo, la unión de PtdSer o CEACAM-1 a TIM-3 no interfiere con la unión de Gal-9 a TIM-3, ya que se une a regiones diferentes del dominio IgV. Es más, varios autores han planteado Gal-9 como molécula ayudante en la agregación de complejos TIM-3-PtdSer o TIM-3-CEACAM-1 (Acharya *et al.*, 2020; De Sousa *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019).

Por otra parte, TIM-3 presenta una cola citoplasmática compuesta por 71 aa en los que se encuentran diversos motivos de señalización no clásicos. El modelo actual que explica la señalización a través de TIM-3 indica que el transcrito 3 asociado a HLA-B (Bat3) se encuentra unido a la cola citoplasmática de TIM-3. Bat3 es capaz de reclutar la forma activa de Lck. Esta quinasa fosforila una subunidad de CD3 del complejo TCR, lo que conlleva el reclutamiento de ZAP70. Finalmente, a través de otras moléculas de la cascada de señalización se promueve la supervivencia y proliferación de las células T. Sin embargo, en el momento en que alguno de los ligandos de TIM-3 interactúan con la proteína, se induce la fosforilación de dos tirosinas (Y256 e Y263) por la tirosin-quinasa IL-2 inducible ITK, lo que desencadena la liberación de Bat3. En ese momento, TIM-3 ejerce su función inhibitoria, ya que no se activa Lck, ni el resto de la vía de señalización de supervivencia y proliferación de las células T. (Acharya *et al.*, 2020; De Sousa *et al.*, 2018).

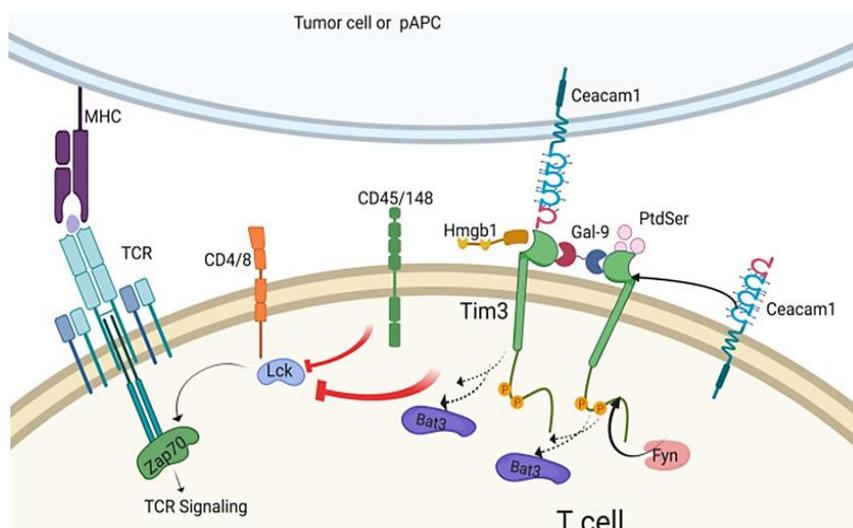


Figura 15. Modelo de señalización de TIM-3 en células T. La unión de los ligandos a TIM-3 libera Bat-3 de la cola citoplasmática, no se activa Lck y se regula negativamente el resto de la vía de señalización (Acharya *et al.*, 2020).

Además, en otros tipos celulares, la fosforilación de las tirosinas mencionadas anteriormente permite la interacción con moléculas que contienen dominios SH2, como la tirosina quinasa de Bruton y c-Src. Es el caso de las células DC, donde esta interacción induce la inactivación del potenciador de la cadena ligera kappa del NF-κB, impidiendo la activación de las células DC mediada por NF-κB (Acharya *et al.*, 2020).

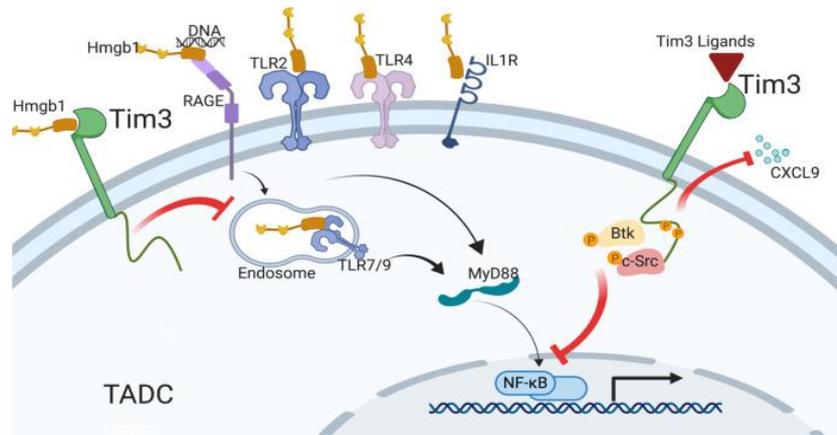


Figura 16. Modelo de señalización de TIM-3 en células DC. La interacción del ligando con TIM-3 conduce a una cascada de señalización que termina en la inhibición de la activación de las células DC. En concreto, cuando el ligando es HMGB1, se inhibe su unión a moléculas de DNA y la señalización de activación de las células DC por receptores como TLR4, IL-1R o TLR2 entre otros (Acharya *et al.*, 2020).

La expresión de TIM-3 en la superficie de las células T se relaciona con el estado de agotamiento debido a una activación crónica de las células T CD8⁺ en presencia de señales supresoras en el microambiente tumoral. Por tanto, TIM-3 es un biomarcador relacionado con un pronóstico negativo en la evolución de varios tipos de cáncer. Del mismo modo, la presencia de células Treg que expresan en la superficie celular TIM-3 se relaciona con un estadio tumoral avanzado y metástasis ganglionar en pacientes con carcinoma de pulmón que no es de células pequeñas (Acharya *et al.*, 2020).

Además, se expresa de forma constitutiva en las células DC, sobre todo en las células DC CD141⁺. Como se explicó anteriormente, su unión a ligando desencadena su capacidad inhibitoria al no activar las células DC por la liberación de Bat3.

En último lugar, TIM-3 también es expresado por las células NK de forma constitutiva. Su expresión en pacientes con adenocarcinoma de pulmón se relaciona con una menor supervivencia (Acharya *et al.*, 2020).

Debido a todo lo mencionado anteriormente, TIM-3 se ha convertido en un objetivo inmunoterapéutico en tratamientos antitumorales. Se ha demostrado que el bloqueo de TIM-3 con mAb anti-TIM-3 aumenta la producción de IFN-γ y la citotoxicidad de las células NK. Además, al bloquear TIM-3 junto con PD-1, la inmunidad antitumoral aumenta. Varios anticuerpos anti-TIM-3 se encuentran en ensayos clínicos de fase I/II en humanos como por

ejemplo TSR-022, MBG453 y LY3321367. Muchos de ellos se prueban conjuntamente a mAb anti-PD-1/L1, ya que se ha demostrado que los pacientes toleran bien su combinación, es segura y reduce la progresión tumoral en modelos preclínicos (Acharya *et al.*, 2020).

Debido a que TIM-3 es expresado en una gran variedad de células inmunitarias y puede ser activado por diversos ligandos, son necesarios más estudios para comprender mejor como TIM-3 puede ser utilizado en diversos tratamientos antitumorales, enfocados a enfermedades autoinmunes o alergias (Acharya *et al.*, 2020).

La proteína de membrana 2B4

2B4 (CD244 o SLAMF4) es una proteína transmembrana perteneciente a la familia de moléculas de activación linfocítica de señalización (SLAM), que forma parte de la superfamilia de las Ig. Esta proteína se expresa generalmente en células NK, pero también en subconjuntos de células T (T CD8⁺ y T $\gamma\delta$), monocitos, basófilos y otras células inmunitarias (Buller *et al.*, 2020; Jutz *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2021).

Se trata de una proteína de transmembrana de tipo 1 formada por un dominio IgV con dos dominios Ig constantes, una región transmembrana y una cola citoplasmática (Sun *et al.*, 2021). Esta proteína de transmembrana se une preferentemente a CD48, aunque también se puede unir a CD229. CD48 es una molécula perteneciente a la familia CD2 unida a glicofosfatidilinositol que se expresa en las células hematopoyéticas (Buller *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2021).

En la cola citoplasmática se encuentran cuatro motivos ITSM que siguen un patrón TIYxxV/I (T: treonina, I: isoleucina, Y: tirosina, x: cualquier aminoácido, V: valina). Estos motivos son necesarios para que se una el adaptador de proteína asociada a SLAM (SAP), responsable de la transmisión de señales activadoras e inhibitoras. Para la unión de SAP a la cola citoplasmática, es necesario que se fosforilen los residuos de tirosina de los ITSM. Además de SAP, también se unen varias fosfatasas (SHP1, SHP2 y SHI-1) y al transcrito 2 activado por sarcoma de Ewing (EAT2) que transmiten otras señales inmunomoduladoras. A pesar de esto, la vía de señalización no se conoce por completo, pero se sabe que están involucradas numerosas moléculas como RAS, Raf, p38 y LAT (conectores para la activación de células T) (Buller *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2021).

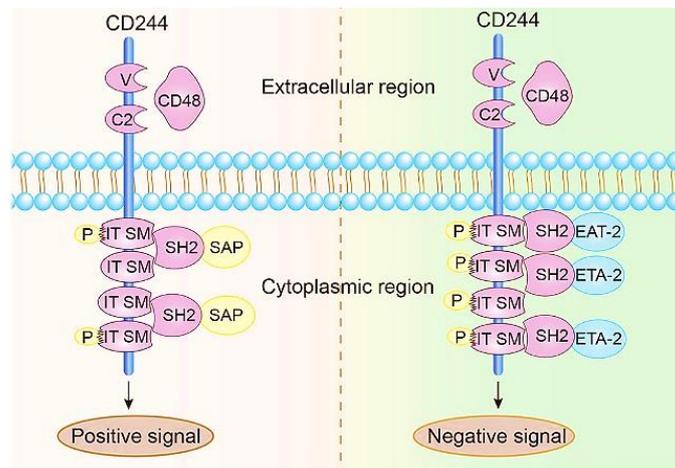


Figura 17. Estructura y modelo de señalización de CD244 (2B4). Intracelularmente puede unirse mediante la fosforilación de los residuos de tirosina de ITSM tanto a SAP (izquierda) como a EAT2 (derecha) y otras fosfatasas (SHP1, SHP2 y SHI1). Dependiendo de que proteína se una, la señal será positiva o negativa (Sun *et al.*, 2021).

La interacción de 2B4 y CD48 se ha relacionado con la actividad citotóxica de las células NK y la producción y secreción de IFN- γ mediante la activación de la vía AP-1 y la vía de MAPK (Sun *et al.*, 2021).

En el caso de las células T $CD8^+$, si se bloquea la interacción de CD48 y 2B4 se reduce la expresión de IFN- γ , perforina y granzima B entre otros y su citotoxicidad. Sin embargo, varios autores han informado de resultados opuestos a los anteriormente mencionados. Esto se debe a que depende de que moléculas se encuentren unidas a la cola citoplásmica se transmitirán señales activadoras o inhibitoras. Por ejemplo, en el caso de que se encuentre unida SAP, la señal que se transmita será activadora. Por el contrario, si se encuentra unido EAT2, la señal que se transmita será inhibitoria (Sun *et al.*, 2021).

Recientemente se ha descubierto que 2B4 influye también en células DC, inhibiendo su función, tanto la respuesta inflamatoria inducida por las DC como la activación de células T y NK mediada por células DC (Sun *et al.*, 2021).

2B4 se ha relacionado con distintas enfermedades como pueden ser enfermedades infecciosas, alergias, enfermedades autoinmunes o tumores. Por lo general, en las infecciones virales, 2B4 estimula a las células NK. En los procesos de sepsis, impulsan un ambiente inmunosupresor en los pacientes. A su vez, son esenciales para el inicio y desarrollo del procesos alérgicos y otras enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide o lupus. Por último, puede ser una gran vía de investigación en la inmunoterapia tumoral debido a que media en la capacidad de ataque de las células NK a las células tumorales y su expresión se correlaciona con el estado de agotamiento de las células T (Buller *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2021).

Otra de las vías de investigación actuales es el papel de 2B4 en los trasplantes humanos. Hasta ahora, se ha determinado que la expresión constitutiva de 2B4 contribuye positivamente a la

supervivencia del aloinjerto y limita su alorreactividad, ya que disminuye la acumulación de células T CD8⁺ del donante tras el trasplante. Por todo ello, 2B4 es una diana terapéutica que tendrá que ser estudiada en investigaciones futuras (Laurie *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2021).

6. CONCLUSIONES

A partir del trabajo de fin de grado desarrollado, se pueden concluir los siguientes puntos clave:

- a) La mayor comprensión de las vías de co-señalización implicadas en la activación de las células T ha permitido aumentar el conocimiento del funcionamiento de nuestro sistema inmunitario y el desarrollo de las respuestas inmunitarias. A partir de estos nuevos conocimientos, se han podido desarrollar nuevos tratamientos aplicados a la clínica para combatir las alteraciones producidas en la respuesta inmunitaria que desencadenan el desarrollo de enfermedades. Asimismo, ha permitido identificar posibles factores de riesgo a la hora de padecer enfermedades como el cáncer o enfermedades autoinmunes y su evolución. De esta forma, se están introduciendo nuevas inmunoterapias para el tratamiento de enfermedades que, anteriormente, tenían un espectro de tratamientos limitado. Cabe destacar que la vía de co-señalización más importante hasta el momento es PD-1/PD-L1 ya que, de forma general, los tratamientos que se desarrollan basados en otras vías se administran en combinación con esta.
- b) Existen muchas vías de co-señalización que actualmente se encuentran en proceso de estudio para la comprensión total de su funcionamiento y su posible aplicación en clínica. El desarrollo de tratamientos basados en estas vías de co-señalización en estudio podría suponer una revolución en el campo de la inmunoterapia, aumentando el número de posibilidades a la hora de tratar enfermedades en las que la respuesta inmunitaria se encuentra alterada.

7. REFERENCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. y Pillai S (2015) “Capítulo 9: Activación de los linfocitos T” en Barcelona, Elsevier España, S.L.U. (ed.) *INMUNOLOGÍA celular y molecular*. 8.a ed. España: Elsevier Inc., pp 199-212.
- Acharya, N., Sabatos-Peyton, C. A. y Anderson, A. C. (2020) "Tim-3 finds its place in the cancer immunotherapy landscape", *Journal for ImmunoTherapy of Cáncer*. doi:<https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000911>.
- Ai, L., Xu, A. y Xu, J. (2020). “Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond”, en Xu, J. (ed.) *Regulation of Cancer Immune Checkpoints: Molecular and Cellular Mechanisms and Therapy*. 1.a ed. Singapore: Springer, pp. 33-59.
- AstraZeneca (2022) Imjudo (tremelimumab) in combination with Imfinzi approved in the US for patients with unresectable liver cancer. Disponible en: <https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2022/imfinzi-and-imjudo-approved-in-advanced-liver-cancer.html> (Accedido: 3 de junio de 2023).
- Berg, K. A. y Clarke, W. (2018) "Making Sense of Pharmacology: Inverse Agonism and Functional Selectivity", *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 21(10), pp. 962–977.

- Buller, C. W., Mathew, P. A. y Mathew, S. O. (2020) "Roles of NK Cell Receptors 2B4 (CD244), CS1 (CD319), and LLT1 (CLEC2D) in Cancer", *Cancers*, 12(7), pp. 1755–1755.
- Cavanagh, M. y Gwyer Findlay, E. (2021) Activación de la célula T | British Society for Immunology. Disponible en: <https://www.immunology.org/es/public-information/inmunolog%C3%ADa-bitesized/systems-processes/activacion-de-la-celula-#:~:text=Las%20c%C3%A9lulas%20T%20se%20generan,por%20sus%20siglas%20en%20ingl%C3%A9s> (Accedido: 27 de octubre de 2022).
- Chen, R., Kang, R. y Tang, D. (2022) "The mechanism of HMGB1 secretion and release", *Experimental & Molecular Medicine*, 54(2), pp. 91–102.
- Chocarro, L., Blanco, E., Zuazo, M., Arasanz, H., Bocanegra, A., Fernández-Rubio, L., Morente, P., Fernandez-Hinojal, G., Echaide, M., Garnica, M., Ramos, P., Vera, R., Kochan, G. y Escors, D. (2021) "Understanding LAG-3 Signaling", *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), pp. 5282–5282.
- Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. (2020) Omalizumab. Disponible en: <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/omalizumab> (Accedido: 17 de abril de 2023).
- De Sousa, A., Leitner, J., Grabmeier-Pfistershammer, K. y Steinberger, P. (2018) "Not All Immune Checkpoints Are Created Equal", *Frontiers in Immunology*, doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01909>.
- Dean, A. Q., Luo, S., Twomey, J. D. y Zhang, B. (2021) "Targeting cancer with antibody-drug conjugates: Promises and challenges", *mAbs*. 13(1): 1951427 .
- Fernández Valerón, J. P., Fernández Pérez, L., Navarro Bosch, D. y Chirino Godoy, R. (2004) "Señalización celular básica. Disponible en: <http://www.biocancer.com/journal/1095/2-ciclo-celular-y-cancer> (Accedido: 19 de octubre de 2022).
- Fu, Z., Li, S., Han, S., Shi, C. y Zhang, Y. (2022) "Antibody drug conjugate: the "biological missile" for targeted cancer therapy", *Signal Transduction and Targeted Therapy*. doi:<https://doi.org/10.1038/s41392-022-00947-7>.
- Hafeez, U., Parakh, S., Gan, H. K. y Scott, A. M. (2020) "Antibody–Drug Conjugates for Cancer Therapy", *Molecules*, 25(20), pp. 4764–4764.
- Han, Y., Liu, D. y Li, L. (2020) "PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer", *American journal of cancer research*. 10(3), pp. 727–742.
- Harjunpää, H. y Guillerey, C. (2020) "TIGIT as an emerging immune checkpoint", *Clinical and Experimental Immunology*, 200(2), pp. 108–119.
- Hosseini, A., Gharibi, T., Marofi, F., Babaloo, Z. y Baradaran, B. (2020) "CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy", *International Immunopharmacology*, 80:106221.
- Jayapal, K. P., Wlaschin, K. F., Shou Hu, W. y Yap, M. G. S. (2007) "Recombinant protein therapeutics from CHO Cells - 20 years and counting", *Chemical Engineering Progress*, 103(10), pp. 40–47.
- Jutz, S., Hennig, A., Paster, W., Asrak, Ö., Dijanovic, D., Kellner, F., Pickl, W. F., Huppa, J. B., Leitner, J. y Steinberger, P. (2017) "A cellular platform for the evaluation of immune checkpoint molecules", *Oncotarget*, 8(39), pp. 64892–64906.
- Jutz, S., Leitner, J., Schmetterer, K. G., Doel-Perez, I., Majdic, O., Grabmeier-Pfistershammer, K., Paster, W., Huppa, J. B. y Steinberger, P. (2016) "Assessment of costimulation and coinhibition in a triple parameter T cell reporter line: Simultaneous measurement of NF- κ B, NFAT and AP-1", *Journal of Immunological Methods* 430, pp. 10–20.
- Kim, G.-R. y Choi, J.-M. (2022) "Current Understanding of Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 (CTLA-4) Signaling in T-Cell Biology and Disease Therapy", *Molecules and Cells*, 45(8), pp. 513–521.
- Kim, W. S., Huang, Y.-H., Gandhi, A. y Blumberg, R. S. (2019) "CEACAM1 structure and function in immunity and its therapeutic implications", *Seminars in Immunology*, 42:101296.

- Laurie, S. J., Liu, D., Wagener, M. E., Stark, P. C., Terhorst, C. y Ford, M. L. (2018) "2B4 Mediates Inhibition of CD8⁺ T Cell Responses via Attenuation of Glycolysis and Cell Division", *The Journal of Immunology*, 201(5), pp. 1536–1548.
- Maruhashi, T., Sugiura, D., Okazaki, I. y Okazaki, T. (2020) "LAG-3: from molecular functions to clinical applications", *Journal for ImmunoTherapy of Cáncer*, 8(2):001014.
- NCBI (2020) Taxonomy browser (Cricetulus griseus). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=10029> (Accedido: 17 de octubre de 2022).
- Ning, Z., Liu, K. y Xiong, H. (2021) "Roles of BTLA in Immunity and Immune Disorders", *Frontiers in Immunology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.654960>.
- Ovcinnikovs, V., Ross, E. M., Petersone, L., Edner, N. M., Heuts, F., Ntavli, E., Kogimtzis, A., Kennedy, A., Jing Wang, C., Bennett, C. L., Sansom, D. M. y Walker, L. S. (2019) "CTLA-4-mediated transendocytosis of costimulatory molecules primarily targets migratory dendritic cells", *Science Immunology*. doi:<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaw0902>
- Paik, J. (2022) "Nivolumab Plus Relatlimab: First Approval", *Drugs*, 82(8), pp. 925–931.
- Reinhart, D., Damjanovic, L., Kaisermayer, C. y Kunert, R. (2015) "Benchmarking of commercially available CHO cell culture media for antibody production", *Applied microbiology and biotechnology*, 99(11), pp. 4645–4657.
- Saad, P. and Kasi, A. (2023) Ipilimumab. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557795/> (Accedido: 3 de junio de 2023).
- Salminen, A. (2022) "Role of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) and kynurenine pathway in the regulation of the aging process", *Ageing Research Reviews*, 75:101573.
- Serpieri, F., Inocencio, A. L., de Oliveira, J. M., Pimenta, A. A., Garbuio, A., Kalil, J., Brigido, M. M. y Moro, A. M. (2010) "Comparison of Humanized IgG and FvFc Anti-CD3 Monoclonal Antibodies Expressed in CHO Cells", *Molecular Biotechnology*, 45(3), pp. 218–225.
- Sun, L., Gang, X., Li, Z., Zhao, X., Zhou, T., Zhang, S.-W. y Wang, G. (2021) "Advances in Understanding the Roles of CD244 (SLAMF4) in Immune Regulation and Associated Diseases", *Frontiers in Immunology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.648182>.
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J. y Lotze, M. T. (2012) "PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity", *Immunological reviews*, 249(1), pp. 158–175.
- Téllez Castillo, N., Siachoque Jara, J. J., Siachoque Jara, J. S., Siachoque Jara, M. A. y Siachoque Montañez, H. O. (2017) "Activación de la célula T, alteraciones en el lupus eritematoso sistémico, una revisión narrativa", *Revista Colombiana de Reumatología*, 25(1), pp. 38–54.
- Van Coillie, S., Wiernicki, B. y Xu, J. (2020) "Molecular and Cellular Functions of CTLA-4", en Xu, J. (ed.) *Regulation of Cancer Immune Checkpoints: Molecular and Cellular Mechanisms and Therapy*. 1.a ed. Singapore: Springer, pp. 7–32.
- Wojciechowicz, K., Spodzieja, M., Lisowska, K. A. y Wardowska, A. (2022) "The role of the BTLA-HVEM complex in the pathogenesis of autoimmune diseases", *Cellular Immunology*, 376:104532.
- Wu, Q., Jiang, L., Li, S., He, Q., Yang, B. y Cao, J. (2020) "Small molecule inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 signaling pathway", *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(1), pp. 1–9.
- Wülfing, C. y Dovedi, S. J. (2023) "For optimal antibody effectiveness, sometimes less is more", *Nature* 614, pp. 416–418.
- Yue, C., Gao, S., Li, S., Xing, Z., Qian, H., Hu, Y., Wang, W. y Hua, C. (2022) "TIGIT as a Promising Therapeutic Target in Autoimmune Diseases", *Frontiers in Immunology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.911919>.