

Medicina cardiovascular traslacional (V)

Bases moleculares de las interacciones leucocito-Endotelio durante la respuesta inflamatoria

Olga Barreiro y Francisco Sánchez-Madrid

Servicio de Inmunología. Hospital Universitario de la Princesa. Universidad Autónoma de Madrid.
Departamento de Biología Vasculare e Inflamación. Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares.
Madrid. España.

El proceso de extravasación leucocitaria, un paso crucial de la respuesta inflamatoria, implica la migración de los leucocitos desde la corriente sanguínea hasta los tejidos diana donde ejercen su función efectora. La extravasación de los leucocitos está orquestada por la acción conjunta de receptores de adhesión celular y factores quimiotácticos, e implica cambios morfológicos drásticos tanto en leucocitos como en células endoteliales. De este modo, constituye un proceso activo para ambos tipos celulares que promueve la rápida y eficiente llegada de los leucocitos a los focos inflamatorios sin comprometer la integridad de la barrera endotelial.

Este artículo revisa la extravasación leucocitaria, con especial hincapié en los hallazgos más recientes en este campo, tanto desde el punto de vista molecular como mecanístico. Incluye la descripción de nuevos pasos en la cascada de adhesión tales como el enlentecimiento del rodamiento, la locomoción intraluminal o la ruta alternativa de migración transcelular, así como el papel funcional de nuevos receptores de adhesión, la organización espaciotemporal de los receptores en la membrana plasmática y las rutas de señalización que controlan los diferentes estadios del proceso de extravasación.

Palabras clave: *Inflamación. Extravasación. Interacción leucocito-endotelio. Adhesión. Transmigración.*

Molecular Basis of Leukocyte-Endothelium Interactions During the Inflammatory Response

The process of leukocyte extravasation, a critical step in the inflammatory response, involves the migration of leukocytes from the bloodstream towards target tissues, where they exert their effector function. Leukocyte extravasation is orchestrated by the combined action of cellular adhesion receptors and chemotactic factors, and involves radical morphological changes in both leukocytes and endothelial cells. Thus, it constitutes an active process for both cell types and promotes the rapid and efficient influx of leukocytes to inflammatory foci without compromising the integrity of the endothelial barrier. This article provides a review of leukocyte extravasation from both molecular and mechanical points of view, with a particular emphasis on the most recent findings on the topic. It includes a description of newly revealed steps in the adhesion cascade, such as slow rolling motion, intraluminal crawling and alternative pathways for transcellular migration, and discusses the functional role of novel adhesion receptors, the spatiotemporal organization of receptors at the plasma membrane and the signaling pathways that control different phases of the extravasation process.

Key words: *Inflammation. Extravasation. Leukocyte-endothelial interaction. Adhesion. Transmigration.*

Full English text available from: www.revvespcardiol.org

Sección patrocinada por el Laboratorio Dr. Esteve

Los receptores de adhesión desempeñan una función esencial en el mantenimiento fisiológico de la integridad tisular regulando numerosos procesos, tales como activación, migración, crecimiento, diferenciación y muerte celulares^{1,2}, mediante la trans-

ducción directa de señales y la modulación de otras cascadas de señalización intracelular desencadenadas por diferentes factores de crecimiento³. Las interacciones celulares son esenciales para la regulación de la hematopoyesis^{4,5} y la respuesta inflamatoria^{6,7}. Por ello, las moléculas de adhesión están particularmente implicadas en una gran variedad de trastornos cardiovasculares que cursan con inflamación, como los procesos de aterogénesis y progresión de la placa aterosclerótica, el infarto de miocardio, el daño por isquemia-reperfusión o el rechazo de trasplantes, y en menor medida en la estenosis valvular y la cardiomiopatía.

El funcionamiento coordinado de los receptores de adhesión, el citoesqueleto y las moléculas de señalización es crucial para la extravasación leucoci-

Financiado por el proyecto RD06/0014-0030 de la Red Temática de Investigación Cooperativa en Enfermedades Cardiovasculares RECAVA. El CNIC está sustentado por el Ministerio de Sanidad y Consumo y la Fundación Pro-CNIC.

Correspondencia: Prof. F. Sánchez-Madrid.
Servicio de Inmunología. Hospital Universitario de la Princesa. Universidad Autónoma de Madrid.
Diego de León, 62. 28006 Madrid. España.
Correo electrónico: fsanchez.hlpr@salud.madrid.org

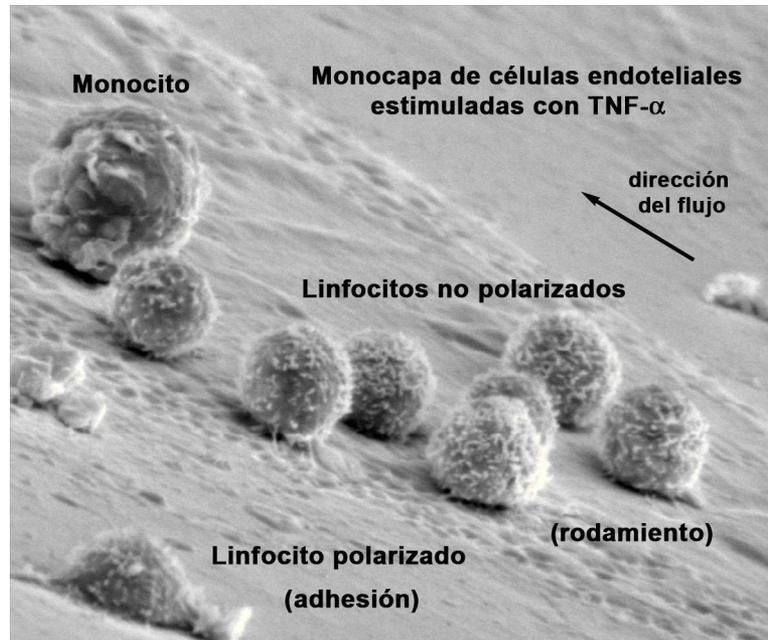


Fig. 1. La cascada de adhesión. La imagen de microscopio electrónico de barrido muestra una monocapa endotelial humana tratada con estímulos proinflamatorios en la que se han perfundido linfocitos y monocitos humanos de sangre periférica con flujo fisiológico (1,8 din/cm²). Varios leucocitos no polarizados han establecido contacto con el endotelio y han sido captados durante el proceso de rodamiento. También se muestra un linfocito que ha conseguido adherirse firmemente al endotelio y ha cambiado drásticamente su morfología de redondeada a polarizada.

taria, un proceso central en la respuesta inmunitaria. Así, la correcta integración de señales «del exterior al interior» y «del interior al exterior» en leucocitos y endotelio durante cada paso de la extravasación es fundamental para permitir la consecución de este fenómeno, el llamado paradigma multiseccional^{6,8} (fig. 1). La extravasación leucocitaria tiene lugar no sólo durante la respuesta inflamatoria, sino también durante la recirculación de los linfocitos a los órganos linfoides secundarios, pero este último proceso no será objeto de análisis en esta revisión.

INTERACCIONES INICIALES ENTRE LEUCOCITOS CIRCULANTES Y EL ENDOTELIO: CAPTURA Y RODAMIENTO MEDIADO POR SELECTINAS Y SUS LIGANDOS

Los leucocitos circulantes en el torrente sanguíneo deben establecer contacto con la pared vascular y adherirse a ella soportando fuerzas de cizallamiento para iniciar la respuesta inflamatoria. El contacto (*tethering*) y el rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio activado son los primeros pasos del proceso secuencial de extravasación, seguidos de la adhesión firme y la migración transendotelial. Estos contactos iniciales están mediados esencialmente por selectinas y sus ligandos, y requieren que haya flujo para ser eficientes⁹. Aunque las selectinas y sus ligandos tienden a interactuar con afinidad variable, la elevada frecuencia de asociación-disociación de sus interacciones les permite mediar contactos lábiles y transitorios entre leuco-

citocitos y endotelio^{10,11}. Estos contactos producen la disminución de velocidad de los leucocitos y permiten su rodamiento sobre la superficie endotelial, favorecen las posteriores interacciones mediadas por integrinas y sus ligandos aumentando la adherencia de los leucocitos, lo que finalmente los detiene en la pared vascular¹².

Las selectinas (P, E y L) son glicoproteínas transmembrana de tipo I que se unen a hidratos de carbono fucosilados y sialilados presentes en sus ligandos, de forma dependiente de Ca²⁺. La selectina L se expresa en la mayoría de los leucocitos, mientras que la E y la P se expresan en células endoteliales activadas por estímulos proinflamatorios, y en el caso de la selectina P también es expresada por plaquetas activadas (revisado por Barreiro et al¹³). Aparte de la interacción de la selectina L leucocitaria con las selectinas P y E endoteliales, la proteína PSGL1 tiene un papel dominante como ligando de las tres selectinas. De hecho, la unión de PSGL1 a las selectinas E y P promueve la interacción de los leucocitos con el endotelio, mientras que la unión de PSGL1 a la selectina L permite la interacción entre leucocitos, por la cual los leucocitos adheridos facilitan la captura de otros leucocitos circulantes en zonas de endotelio inflamado, independientemente de que éstos expresen ligandos para las selectinas endoteliales¹⁴, proceso denominado reclutamiento secundario. Aparte de PSGL1, las selectinas también pueden unirse a otras glicoproteínas, como CD44 o ESL1 en el caso de la selectina E. Cada ligando parece desempeñar un papel diferencial durante el proceso de captura de neutrófilos. Así, PSGL1 es el principal ligando implicado en la

captura inicial de los leucocitos, mientras que ESL1 es necesario para convertir las uniones transitorias iniciales en un rodamiento más lento y estable. Por último, CD44 controla la velocidad de rodamiento e interviene en la polarización de PSGL1 y selectina L, probablemente para permitir el reclutamiento secundario¹⁵. Las plaquetas también pueden actuar como reclutadores secundarios de leucocitos debido a su capacidad de interactuar con ellos y con el endotelio simultáneamente. Además, son capaces de secretar quimiocinas que se inmovilizan en la superficie luminal endotelial favoreciendo el proceso de adhesión¹⁶.

Aparte de las selectinas y sus ligandos, las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$ —a través de su interacción con VCAM-1 y MAdCAM-1 respectivamente— pueden mediar de manera independiente estos contactos iniciales¹⁷⁻¹⁹. Por otra parte, la interacción LFA-1/ICAM-1 coopera con la función de la selectina L estabilizando la fase de contacto transitorio y disminuyendo la velocidad de rodamiento^{20,21}.

La localización topográfica de los receptores de adhesión es necesaria para su correcto funcionamiento durante el tráfico leucocitario²². Por ello, las selectinas, sus ligandos y las integrinas $\alpha 4$ se encuentran agrupadas en los extremos de los *microvilli* de los leucocitos. Por otra parte, el anclaje de las selectinas al citoesqueleto de actina mediante proteínas como alpha-actinina o ERM es necesario para su adecuado funcionamiento²³⁻²⁶.

Se ha demostrado que las selectinas activan múltiples rutas de señalización, que conectan con procesos como la reorganización del citoesqueleto de actina, tales como la cascada de MAPK, p56lck, Ras o Rac2 (revisado por Barreiro et al¹³). Por otra parte, PSGL-1 activa también diferentes rutas de señalización intracelular que tienen un efecto inductor de la activación de los leucocitos aumentando la expresión de diferentes moléculas que están implicadas en los pasos siguientes del proceso de extravasación y en funciones efectoras, así como un papel inesperado en la inducción de funciones tolerogénicas en células dendríticas²⁷⁻³⁰.

PAPEL CENTRAL DE LAS INTEGRINAS LEUCOCITARIAS Y SUS LIGANDOS ENDOTELIALES EN LOS PROCESOS DE ACTIVACIÓN, PARADA, ADHESIÓN FIRME Y LOCOMOCIÓN

El tráfico de los leucocitos a través de los diferentes tejidos y órganos y su interacción posterior con otras células inmunitarias son esenciales para el desarrollo de las inmunidades innata y adquirida³¹. Las integrinas son moléculas fundamentales en la migración celular que controlan las interacciones intercelulares y célula-matriz extracelular durante la

recirculación y la inflamación. Una de sus características más importantes estriba en la regulación de su actividad adherente, independientemente de su grado de expresión en membrana³². Así, los leucocitos circulantes en sangre mantienen sus integrinas en conformación inactiva para evitar contactos inespecíficos con paredes vasculares no inflamadas, pero cuando encuentran un foco inflamatorio, se produce una rápida activación *in situ* de sus integrinas³³. Como en el caso de las selectinas, la distribución espacial de las integrinas y sus ligandos en estructuras de membrana especializadas es esencial para su funcionamiento adecuado. Esta organización topográfica requiere una precisa regulación del citoesqueleto para permitir el reclutamiento de intermediarios de señalización y segundos mensajeros que desencadenen la activación celular^{34,35}.

Las integrinas constituyen una familia de 24 receptores heterodiméricos, compuesto cada uno de ellos por una subunidad α y otra β . Son moléculas que regulan dinámicamente sus propiedades adhesivas mediante cambios conformacionales (afinidad), así como por redistribución espacial en la superficie celular (avidez)³⁶. Las observaciones recientes predicen la existencia de tres estados conformacionales (plegado con baja afinidad, extendido con afinidad intermedia y extendido con alta afinidad)^{37,38}. Las integrinas más relevantes para la adhesión leucocitaria al endotelio son miembros de la subfamilia $\beta 2$, particularmente LFA-1 (CD11a/CD18 o $\alpha L\beta 2$) y la integrina específica de linaje mielóide Mac-1 (CD11b/CD18 o $\alpha M\beta 2$), así como las integrinas $\alpha 4$ VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) y $\alpha 4\beta 7$. La mayoría de sus ligandos son proteínas transmembrana que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. LFA-1 puede unirse a cinco moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1 a ICAM-5), aunque las más relevantes son ICAM-1 e ICAM-3³⁹. ICAM-1 se expresa en leucocitos, células dendríticas y células epiteliales. Además, su expresión es baja en células endoteliales quiescentes y aumenta con estímulos proinflamatorios⁴⁰. ICAM-3 se expresa constitutivamente en todos los leucocitos⁴¹. Un ligando adicional de LFA-1 es la molécula de adhesión de uniones intercelulares JAM-A, que se concentra selectivamente en la región apical de las uniones estrechas endoteliales y se redistribuye parcialmente a la cara apical del endotelio con ciertos estímulos proinflamatorios⁴². Por otra parte, Mac-1 interacciona con ICAM-1, JAM-C y el receptor RAGE^{43,44}. La integrina VLA-4 interacciona con VCAM-1⁴⁵, que es una molécula de adhesión que se expresa *de novo* tras la activación endotelial⁴⁶ y también se une a JAM-B⁴⁷. Además, VLA-4 interacciona con ADAM-28, fibronectina, osteopontina, trombospondina, el factor de coagulación von Willebrand y la proteína bacteriana invasina⁴⁸.

Finalmente, la integrina $\alpha_4\beta_7$, aparte de interactuar con VCAM-1 y fibronectina, reconoce específicamente MAdCAM-1, un receptor expresado en los tejidos linfoides de las mucosas¹⁹.

Modulación de la actividad de las integrinas mediada por quimiocinas

Durante el establecimiento de los contactos iniciales con el endotelio vascular, los leucocitos disminuyen su velocidad de rodamiento y se activan al encontrar quimiocinas inmovilizadas y ligandos de integrinas expuestos en la superficie apical endotelial. Este paso de activación permite la parada y la adhesión firme de los leucocitos al endotelio en condiciones de flujo fisiológico^{49,50}. La activación del leucocito implica un marcado cambio morfológico: la célula redondeada circulante se transforma en una célula promigratoria con morfología polarizada, en la cual se distinguen al menos dos regiones, el frente de avance y el urópodo⁵¹. La polarización del leucocito permite a la célula la coordinación de las fuerzas intracelulares para producir la locomoción celular necesaria durante el proceso de extravasación⁵².

Las quimiocinas unidas a los glucosaminoglucanos de la membrana apical endotelial actúan señalizando a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) localizados en los *microvilli* del leucocito, induciendo una gran variedad de señales «del interior al exterior» en fracciones de segundo, que conducen a múltiples cambios conformacionales en las integrinas⁵³⁻⁵⁵. La complejidad y el corto margen de tiempo de los mecanismos de señalización inducidos por las quimiocinas que controlan la activación de integrinas son compatibles con la existencia de redes proteínicas compartimentadas y preformadas («señalosomas») en los leucocitos⁵⁶. La presencia de quimiocinas específicas en diferentes lechos vasculares contribuye a orquestar el reclutamiento selectivo de las diferentes subpoblaciones leucocitarias a los focos inflamatorios o a los órganos linfoides secundarios⁵⁷. Además, las quimiocinas pueden producir un efecto diferencial en integrinas específicas dentro del mismo microambiente⁵⁸.

Modulación de la afinidad de las integrinas mediada por sus ligandos

Tras la activación inducida por las quimiocinas, la conformación de las integrinas cambia de manera reversible de inactiva (plegada) a extendida con afinidad intermedia. Este evento prepara a la integrina para unirse a su ligando endotelial. Las integrinas que contienen un dominio I insertado en sus subunidades α sufren un ulterior cambio conforma-

cional tras la unión a ligando, que culmina en la activación total de la integrina y la parada del leucocito⁵⁹⁻⁶¹. Por lo tanto, el estado conformacional de alta afinidad para la parada inmediata del leucocito en el endotelio requiere de las quimiocinas inmovilizadas y los ligandos de integrinas una inducción bidireccional^{55,62}. Sin embargo, las integrinas α_4 , que contienen un dominio *I-like* en sus cadenas β , pueden interactuar espontáneamente con sus ligandos endoteliales sin estimulación quimiotáctica previa¹⁷.

La señalización inducida por la unión a ligando conlleva la separación de las regiones citoplásmicas de las subunidades de la integrina, lo que favorece su asociación con el citoesqueleto cortical de actina. Las integrinas α_4 se asocian fundamentalmente a través de paxilina y las β_2 a través de talina, filamina y otras moléculas estructurales. Además, la unión al ligando aumenta el reclutamiento de integrinas adicionales para incrementar la adhesión firme del leucocito en condiciones de estrés de flujo⁶³. Este agrupamiento de integrinas depende de la liberación de su anclaje al citoesqueleto de actina, que está mediada por la proteincinasa C (PKC) y calpaína, para aumentar su movilidad lateral en la membrana⁶⁴. Además, se ha descrito recientemente el papel de Rap-1 y su activador CalDAG-GEFI, así como la acción coordinada de kindlina-3 con talina en la activación de integrinas para mediar la adhesión firme leucocitaria en diferentes tipos celulares hematopoyéticos^{65,66}. En relación con la organización espacial de las integrinas, se ha señalado la existencia de nanoagrupamientos de LFA-1 no unidos a ligando en la membrana plasmática de los leucocitos, que promueven la formación eficiente de los microagrupamientos inducidos por unión a ligando^{67,68}.

Por otra parte, varios estudios indican que el estrés de flujo también regula las integrinas reforzando sus enlaces e incluso aumentando su afinidad^{69,70}. La integración de la señalización derivada de las quimiocinas y las fuerzas externas para favorecer la trans migración se ha definido como el fenómeno de quimiorreotaxis⁷¹.

Regulación de la locomoción de los leucocitos por integrinas

Las señales implicadas en la adhesión firme de los leucocitos al endotelio mediadas por integrinas deben ser atenuadas y debilitar los contactos originales lo suficiente para permitir la migración del leucocito hacia un sitio apropiado para iniciar el proceso de trans migración endotelial. Las integrinas β_2 parecen tener una implicación importante en este proceso de locomoción, ya que su bloqueo o el de sus ligandos genera migración al azar, fallo de

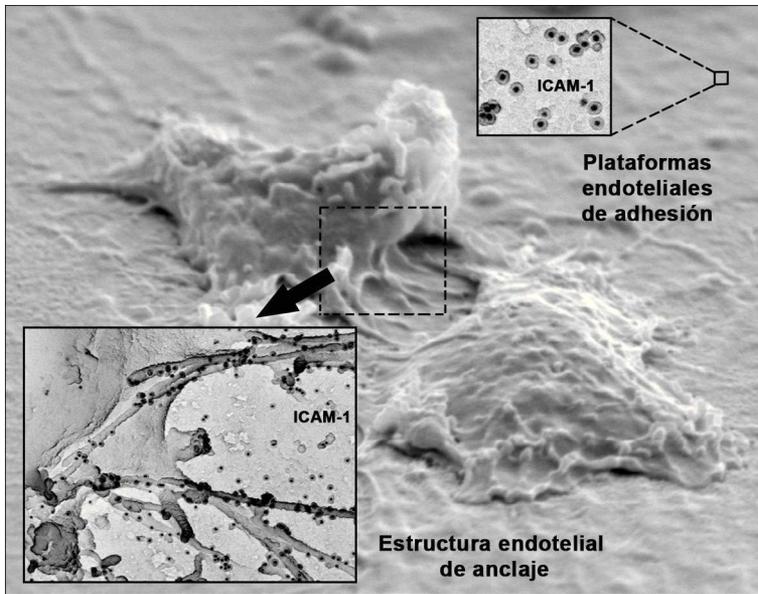


Fig. 2. Papel activo del endotelio durante la extravasación. La imagen de microscopio electrónico de barrido muestra la organización de los receptores de adhesión endotelial en nanoagrupamientos en la membrana apical (plataformas endoteliales de adhesión; la tinción corresponde a ICAM-1 usando anticuerpos acoplados a oro coloidal). Cuando un leucocito establece contacto con el endotelio, los receptores endoteliales de adhesión se concentran en la llamada estructura de anclaje endotelial, que mantiene el leucocito firmemente adherido e impide que se separe por la fuerza del flujo que ha de soportar.

posicionamiento en las uniones interendoteliales y diapedesis defectuosa⁷². Los estudios *in vivo* utilizando ratones genéticamente modificados deficientes en LFA-1 o Mac-1 claramente delinearon mecanismos fundamentalmente diferentes para cada una de estas integrinas β_2 . Mientras la adhesión firme está mediada por LFA-1, la locomoción depende de Mac-1; ambos procesos contribuyen a una eficiente migración⁷³. Tras su activación por unión a ligando, las integrinas regulan diferentes efectores de contractilidad de miosina, GTPasas remodeladoras de actina y moléculas implicadas en la regulación de la red de microtúbulos tanto en el frente de avance como en el urópodo. Así, la integración de señales generadas en ambos polos celulares conduce a un movimiento coordinado del leucocito³⁴.

Papel funcional de las moléculas de adhesión endoteliales VCAM-1 e ICAM-1 en la captura de leucocitos

Las moléculas VCAM-1 e ICAM-1, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, son las principales moléculas de adhesión endotelial implicadas en la unión a las integrinas VLA-4 y LFA-1, respectivamente^{45,74}. Solamente ICAM-1 se expresa escasamente en el endotelio quiescente, mientras que se induce la expresión de ambas moléculas tras la activación celular por citocinas proinflamatorias tales como la interleucina (IL) 1 y el factor de necrosis tumoral (TNF) alfa^{40,46}. Además, se ha descrito la unión de VCAM-1 e ICAM-1 al citoesqueleto de actina a través de dos miembros de la familia ERM, ezrina y moesina^{75,76}. Estas moléculas funcionan como conectores de la membrana con el ci-

toesqueleto de actina regulando la morfogénesis cortical y la adhesión celular.

Se ha estudiado la dinámica de VCAM-1 e ICAM-1 en células HUVEC (células primarias de vena de cordón umbilical) activadas con TNF durante el proceso de interacción leucocito-endorelio. Se ha observado que, tras la parada de los leucocitos en el endotelio, la unión de VCAM-1 e ICAM-1 con sus ligandos desencadena la reorganización del citoesqueleto cortical endotelial de actina y genera una estructura tridimensional de anclaje que rodea el leucocito y previene la desunión de los leucocitos adheridos en condiciones de flujo fisiológico. Dicha estructura contiene gran acumulación de dichos receptores de adhesión, así como las proteínas ezrina y moesina activadas. La estructura endotelial de anclaje se sostiene por el citoesqueleto de actina, proteínas entrecruzantes de actina tales como alpha-actinina, proteínas típicas de adhesiones focales como talina, paxilina y vinculina y proteínas nucleadoras de actina. También, segundos mensajeros tales como PI(4,5)P2 o la ruta de señalización Rho/160ROCK son importantes para la generación y el mantenimiento de la estructura endotelial de anclaje⁷⁵ (fig. 2). Además, ambos receptores, ICAM-1 y VCAM-1, se agrupan de manera conjunta en la estructura endotelial de anclaje, aunque uno de ellos no se encuentre unido a su correspondiente ligando. Este reclutamiento conjunto también es independiente del anclaje del citoesqueleto de actina y de la formación de heterodímeros ICAM-1/VCAM-1, ya que se debe a la inclusión de VCAM-1 e ICAM-1 en microdominios ricos en traspaninas, que actúan como plataformas endoteliales de adhesión especializadas⁷⁷ (fig. 2). Las te-

traspaninas son pequeñas proteínas que atraviesan cuatro veces la membrana y se asocian lateralmente a través de su segundo dominio extracelular con otras proteínas integrales de membrana, regulan su función y forman dominios multiproteínicos en la membrana plasmática. Se les ha implicado en varias funciones celulares, entre otras migración, adhesión intercelular homotípica y heterotípica, así como presentación antigénica, infección viral y fusión de gametos⁷⁸⁻⁸².

Mediante el empleo de técnicas de microscopía analítica innovadoras, se han caracterizado las propiedades difusivas, la organización a escala nanométrica y las interacciones moleculares específicas dentro de los microdominios en células endoteliales primarias vivas. Este análisis ha proporcionado evidencias convincentes sobre la existencia de las plataformas endoteliales de adhesión como entidades físicas en la membrana plasmática distintas de las balsas lipídicas⁷⁷. La microscopía electrónica de barrido en muestras tratadas con un péptido bloqueador específico de las tetraspaninas pone de manifiesto el nanoagrupamiento o avidéz de VCAM-1 e ICAM-1 inducido por las plataformas endoteliales de adhesión como un nuevo mecanismo de organización supramolecular que regula la eficiente capacidad adhesiva de ambos receptores endoteliales de adhesión a sus receptores, las integrinas leucocitarias⁷⁷. La relevancia funcional de la inclusión de ICAM-1 y VCAM-1 en microdominios de tetraspaninas en las células endoteliales se ha demostrado mediante el uso de una estrategia experimental con ARN interferente frente a las tetraspaninas CD9 y CD151 en células endoteliales humanas primarias y mediante el bloqueo por competición con péptidos de fusión GST que contienen la segunda región extracelular de CD9⁸³. Por lo tanto, la inclusión de ICAM-1 y VCAM-1 en dominios de tetraspaninas es necesaria para su adecuado funcionamiento en condiciones dinámicas estrictas como el estrés de flujo. No solamente VCAM-1 e ICAM-1 interactúan con microdominios de tetraspaninas, sino también otros receptores de adhesión tales como JAM-A, PECAM-1, ICAM-2 o CD44. Así pues, podría postularse que los microdominios de tetraspaninas actuarían como plataformas especializadas que organizarían de manera constitutiva en la membrana los receptores de adhesión apropiados para la rápida cinética y eficiente consecución del proceso de extravasación leucocitaria⁷⁷.

Los receptores endoteliales de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 son capaces de transmitir señales tras su unión con el ligando. La molécula VCAM-1 está implicada en la apertura de las uniones interendoteliales para facilitar la extravasación de los leucocitos. De hecho, VCAM-1 induce la activación de la NADPH oxidasa (NOX2 posiblemente) y la pro-

ducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) de manera dependiente de la GTPasa Rac, con la consiguiente activación de metaloproteinasas de matriz y pérdida de la adhesión mediada por VE-cadherina debido a la fosforilación de beta-catenina por Pyk-2⁸⁴⁻⁸⁹, lo que favorece el proceso de extravasación. Por otra parte, VCAM-1 e ICAM-1 son capaces de inducir un rápido incremento de las concentraciones de Ca²⁺ intracelular, produciendo la activación de Src cinasa y la consiguiente fosforilación de cortactina⁹⁰⁻⁹³. ICAM-1 también puede activar RhoA induciendo la formación de fibras de estrés y la fosforilación de FAK, paxilina y p130Cas, que a su vez están implicados en rutas de señalización que implican a JNK y p38⁹⁴⁻⁹⁷, que incrementan la permeabilidad endotelial y conllevan un aumento de la migración transendotelial leucocitaria. También se ha descrito la inducción de la transcripción de c-fos y rhoA vía ICAM-1⁹⁶. Finalmente, ICAM-1 también puede inducir su propia expresión y la de VCAM-1, actuando como un mecanismo de regulación para facilitar la trans migración leucocitaria⁹⁸.

INTEGRINAS Y SUS LIGANDOS DURANTE LA TRANSMIGRACIÓN ENDOTELIAL

Durante la trans migración endotelial (TEM), las uniones endoteliales se deshacen parcialmente evitando el daño de la monocapa o importantes cambios de permeabilidad. Así, las membranas del leucocito y el endotelio se mantienen en estrecho contacto durante la diapedesis y, posteriormente, las membranas endoteliales vuelven a sellar sus conexiones.

Una vez que los leucocitos encuentran un sitio apropiado para trans migrar (preferentemente en las uniones intercelulares), extienden pseudópodos exploratorios entre dos células endoteliales adyacentes. A continuación, los pseudópodos evolucionan a una lamela que va atravesando el espacio abierto en la monocapa. Durante este proceso, la molécula LFA-1 es la integrina que tiene el papel preponderante. Esta molécula se relocaliza rápidamente, formando un agrupamiento en forma de anillo en la interfaz de contacto entre leucocito y endotelio, donde interactúa con ICAM-1⁹⁹ y, en algunos otros modelos celulares, con JAM-A¹⁰⁰. Cuando el proceso de trans migración concluye, LFA-1 se concentra finalmente en el urópodo¹⁰¹. Otras proteínas implicadas en el proceso de trans migración son ICAM-2, JAM-B, JAM-C, PECAM-1 (CD31), ESAM, CD99, etc. Muchas de ellas son capaces de interactuar homofílica y heterofílicamente manteniendo las uniones interendoteliales o las interacciones leucocito-endotelio¹⁰²⁻¹⁰⁵.

En el proceso de la trans migración leucocitaria, además de la ruta clásica de diapedesis, en la que

los leucocitos cruzan a través de uniones interendoteliales (ruta paracelular), cada vez hay más indicios de que habría una ruta alternativa, en la que los leucocitos podrían migrar a través de células endoteliales individuales (ruta transcelular) sin perturbar las uniones interendoteliales. Este proceso tiene lugar preferencialmente en la microvasculatura, la barrera hematoencefálica o en vénulas de endotelio alto de los órganos linfoides secundarios, por contraposición a la macrovasculatura¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Las observaciones recientes sobre el mecanismo de este proceso de migración transcelular indican que inicialmente los leucocitos generan podosomas invasivos dependientes de la actividad de Src cinasa y de WASP para palpar la superficie endotelial, que después evolucionan para formar el poro transcelular. En el endotelio es necesaria la fusión de membranas regulada por calcio y complejos que contienen SNARE, así como el aporte necesario de membrana mediado por orgánulos vacuolovesiculares¹⁰⁸. También se ha descrito la translocación de ICAM-1 a caveolas tras la adhesión leucocitaria y la posterior formación de una especie de canal multivesicular, que contiene ICAM-1 y caveolina-1, alrededor del seudópodo leucocitario que penetra a través de la célula endotelial. Ambas proteínas, ICAM-1 y caveolina, siguen el paso de todo el leucocito moviéndose hacia la membrana endotelial basal¹⁰⁹. Además, la proteína de filamentos intermedios vimentina también parece tener un papel importante en la ruta transcelular¹¹⁰. Recientemente se ha descrito la existencia *in vivo* de estructuras endoteliales en forma de cúpula que cubren al leucocito durante la migración transendotelial¹¹¹. Estas observaciones parecen indicar que las estructuras endoteliales de anclaje podrían llegar a ser cúpulas que envolvieran totalmente los leucocitos en la cara luminal del endotelio, lo que permitiría la rotura de la membrana basolateral sin poner en peligro la función de barrera endotelial.

LAS TERAPIAS BASADAS EN LA ANTIADHESIÓN

Los avances en nuestro conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a la migración celular y la cascada de la extravasación han dado lugar a la identificación de moléculas diana para terapias antiadhesión para inflamación. Así, los anticuerpos monoclonales contra las cadenas α_4 y α_L han mostrado un efecto beneficioso muy claro en diferentes modelos animales de estados inflamatorios y autoinmunitarios, así como en enfermedades humanas como la esclerosis múltiple, la enfermedad inflamatoria del colon y la psoriasis. Resultados similares se han obtenido en modelos animales con diferentes péptidos sintéticos de VLA-4.

Los prometedores resultados obtenidos en estos estudios con animales han llevado a diferentes grupos y empresas farmacéuticas dedicadas al desarrollo de nuevos fármacos a la realización de ensayos clínicos. A este respecto, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-VLA4 ha mostrado un claro efecto terapéutico en las recidivas de la esclerosis múltiple¹¹² y la enfermedad de Crohn¹¹³. Otros usos potenciales de este tipo de anticuerpos monoclonales terapéuticos serían en enfermedades inflamatorias y/o autoinmunitarias de gran incidencia en la población general, como la artritis reumatoide, el asma y la diabetes mellitus tipo 1^{114,115}. Como en el caso de VLA-4, se ha observado que el anticuerpo monoclonal anti-LFA-1 tiene un efecto terapéutico significativo en humanos, ya que un monoclonal anti- α_L humanizado ha sido aprobado para la terapia de formas de psoriasis de moderadas a graves¹¹⁶.

No hay duda de que los anticuerpos monoclonales terapéuticos dirigidos contra las moléculas de adhesión o coestimuladoras representan un gran paso en la terapia de la inflamación y las enfermedades autoinmunes. Sin embargo, estos agentes biológicos, tales como los anticuerpos monoclonales contra las cadenas α_4 y α_L de integrinas leucocitarias están dirigidos contra receptores con múltiples funciones biológicas diferentes: la generación de una respuesta inmunitaria, la diferenciación de los linfocitos a Th1/Th2¹¹⁷, la fase efectora de las células inmunitarias y la extravasación de los leucocitos a los focos inflamatorios, entre otras. Además, es evidente que algunos anticuerpos monoclonales pueden actuar como moléculas agonistas, con lo que se generan señales intracelulares tras la unión a su antígeno. De esta manera, la administración a largo plazo de este tipo de fármacos terapéuticos podría tener consecuencias inesperadas e incluso indeseadas. Sería muy importante tener en cuenta toda la información derivada tanto de los estudios básicos como de los trabajos preclínicos para guiar adecuadamente los ensayos clínicos futuros con este tipo de agentes biológicos (revisado por González Amaro et al¹¹⁸).

Por otra parte, también se han probado numerosas terapias antiinflamatorias contra distintas moléculas diana en el endotelio. Se ha demostrado la eficacia del bloqueo de la selectina P contra el daño producido durante procesos de isquemia-reperfusión (trasplante, trombosis, ictus, etc.), así como los efectos beneficiosos de anticuerpos anti-ICAM-1 para prevenir lesiones reestenóticas en modelos animales, que emergen como posibles terapias en humanos¹¹⁹⁻¹²⁰. También existen numerosos estudios de enfermedades autoinmunes o inflamatorias crónicas en los que se aplicaron terapias basadas en anticuerpos anti-TNF, anti-VCAM-1 o

anti-ICAM-1. Nuestras investigaciones apuntan a las tetraspaninas y, concretamente, a CD9 como una potencial diana antiinflamatoria general, que podría regular la función adhesiva de múltiples receptores de adhesión y resultar más efectiva que la inhibición individualizada de cada uno de ellos. Sin embargo, la tetraspanina CD9 tiene una expresión ubicua en el organismo, por lo que la liberación de fármacos bloqueadores dirigidos contra CD9 debería realizarse de manera localizada y restringida a la zona de inflamación. Es necesario llevar a cabo estudios previos utilizando ratones modificados genéticamente y carentes de la expresión de CD9 y otras tetraspaninas para esclarecer si esta hipótesis es plausible. En este sentido, se ha descrito recientemente el papel de la tetraspanina CD81 endotelial como posible marcador diagnóstico y terapéutico de aterogénesis en humanos. La expresión de CD81 en la cara luminal del endotelio aumenta en los estadios iniciales de la enfermedad, por lo que podría desempeñar un papel crucial en la formación de la placa aterosclerótica al favorecer la adhesión de monocitos en una etapa anterior al estallido de la respuesta inflamatoria¹²¹.

BIBLIOGRAFÍA

- Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules —Part I. *N Engl J Med.* 1996;334:1526-9.
- Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules —Part II: Blood vessels and blood cells. *N Engl J Med.* 1996;335:43-5.
- Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev.* 1998;50:197-263.
- Levesque JP, Zannettino AC, Pudney M, Niutta S, Haylock DN, Snapp KR, et al. PSGL-1-mediated adhesion of human hematopoietic progenitors to P-selectin results in suppression of hematopoiesis. *Immunity.* 1999;11:369-78.
- Verfaillie CM. Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process. *Blood.* 1998;92:2609-12.
- Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell.* 1991;67:1033-6.
- Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* 1996;272:60-6.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multiple paradigm. *Cell.* 1994;76:301-14.
- Alon R, Ley K. Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20:525-32.
- Mehta P, Cummings RD, McEver RP. Affinity and kinetic analysis of P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Biol Chem.* 1998;273:32506-13.
- Nicholson MW, Barclay AN, Singer MS, Rosen SD, van der Merwe PA. Affinity and kinetic analysis of L-selectin (CD62L) binding to glycosylation-dependent cell-adhesion molecule-1. *J Biol Chem.* 1998;273:763-70.
- Evans EA, Calderwood DA. Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science.* 2007;316:1148-53.
- Barreiro O, Vicente-Manzanares M, Urzainqui A, Yáñez-Mó M, Sánchez-Madrid F. Interactive protrusive structures during leukocyte adhesion and transendothelial migration. *Front Biosci.* 2004;9:1849-63.
- Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J Exp Med.* 2001;194:205-18.
- Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D, Frenette PS. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity.* 2007;26:477-89.
- Von Hundelshausen P, Koenen RR, Weber C. Platelet-mediated enhancement of leukocyte adhesion. *Microcirculation.* 2009;16:84-96.
- Alon R, Kassner P, Carr M, Finger E, Hemler M, Springer T. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol.* 1995;128:1243-53.
- Berlin C, Bargatze R, Campbell J, Von Andrian U, Szabo M, Hasslen S, et al. Alpha4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell.* 1995;80:413-22.
- Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, et al. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell.* 1993;74:185-95.
- Henderson RB, Lim LH, Tessier PA, Gavins FN, Mathies M, Perretti M, et al. The use of lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice to determine the role of LFA-1, Mac-1, and alpha4 integrin in the inflammatory response of neutrophils. *J Exp Med.* 2001;194:219-26.
- Kadono T, Venturi GM, Steeber DA, Tedder TF. Leukocyte rolling velocities and migration are optimized by cooperative L-selectin and intercellular adhesion molecule-1 functions. *J Immunol.* 2002;169:4542-50.
- Von Andrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher EC. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell.* 1995;82:989-99.
- Dwir O, Kansas GS, Alon R. Cytoplasmic anchorage of L-selectin controls leukocyte capture and rolling by increasing the mechanical stability of the selectin tether. *J Cell Biol.* 2001;155:145-56.
- Ivetic A, Deka J, Ridley AJ, Ager A. The cytoplasmic tail of L-selectin interacts with members of the Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) family of proteins: cell activation-dependent binding of Moesin but not Ezrin. *J Biol Chem.* 2002;277:2321-9.
- Pavalko FM, Walker DM, Graham L, Goheen M, Doerschuk CM, Kansas GS. The cytoplasmic domain of L-selectin interacts with cytoskeletal proteins via alpha-actinin: receptor positioning in microvilli does not require interaction with alpha-actinin. *J Cell Biol.* 1995;129:1155-64.
- Killok DJ, Parsons M, Zarrouk M, Ameer-Beg SM, Ridley AJ, Haskard DO, et al. In vitro and in vivo characterization of molecular interactions between calmodulin, ezrin/radixin/moesin (ERM) and L-selectin. *J Biol Chem.* 2009 Jan 7 [Epub ahead of print].
- Urzainqui A, Martínez del Hoyo G, Lamana A, De la Fuente H, Barreiro O, Olazabal IM, et al. Functional role of P-selectin glycoprotein ligand 1/P-selectin interaction in the generation of tolerogenic dendritic cells. *J Immunol.* 2007;179:7457-65.
- Urzainqui A, Serrador JM, Viedma F, Yáñez-Mó M, Rodríguez A, Corbi AL, et al. ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1. *Immunity.* 2002;17:401-12.
- Zarbock A, Abram CL, Hundt M, Altman A, Lowell CA, Ley K. PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and FcR gamma to induce slow leukocyte rolling. *J Exp Med.* 2008;205:2339-47.
- Zarbock A, Lowell CA, Ley K. Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity.* 2007;26:773-83.

31. Von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med.* 2000;343:1020-34.
32. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002;110:673-87.
33. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science.* 1998;279:381-4.
34. Vicente-Manzanares M, Sánchez-Madrid F. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:110-22.
35. Barreiro O, De la Fuente H, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol Rev.* 2007;218:147-64.
36. Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15:547-56.
37. Beglova N, Blacklow SC, Takagi J, Springer TA. Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat Struct Biol.* 2002;9:282-7.
38. Nishida N, Xie C, Shimaoka M, Cheng Y, Walz T, Springer TA. Activation of leukocyte beta2 integrins by conversion from bent to extended conformations. *Immunity.* 2006;25:583-94.
39. Gahmberg CG, Nortamo P, Kantor C, Autero M, Kotovuori P, Hemio L, et al. The pivotal role of the Leu-CAM and ICAM molecules in human leukocyte adhesion. *Cell Differ Dev.* 1990;32:239-45.
40. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol.* 1986;137:245-54.
41. Acevedo A, Del Pozo MA, Arroyo AG, Sánchez-Mateos P, González-Amaro R, Sánchez-Madrid F. Distribution of ICAM-3-bearing cells in normal human tissues. Expression of a novel counter-receptor for LFA-1 in epidermal Langerhans cells. *Am J Pathol.* 1993;143:774-83.
42. Ostermann G, Weber KS, Zerneck A, Schroder A, Weber C. JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol.* 2002;3:151-8.
43. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, et al. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med.* 2003;198:1507-15.
44. Lamagna C, Meda P, Mandicourt G, Brown J, Gilbert RJ, Jones EY, et al. Dual interaction of JAM-C with JAM-B and alpha(M)beta2 integrin: function in junctional complexes and leukocyte adhesion. *Mol Biol Cell.* 2005;16:4992-5003.
45. Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell.* 1990;60:577-84.
46. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 1994;84:2068-101.
47. Cunningham SA, Rodríguez JM, Arrate MP, Tran TM, Brock TA. JAM2 interacts with alpha4beta1. Facilitation by JAM3. *J Biol Chem.* 2002;277:27589-92.
48. Mittelbrunn M, Cabanas C, Sánchez-Madrid F. Integrin alpha4. *AfCS-Nature Molecule Pages.* 2006 20 Jul. doi:10.1038/mp.a001203.01.
49. Alon R, Grabovsky V, Feigelson S. Chemokine induction of integrin adhesiveness on rolling and arrested leukocytes local signaling events or global stepwise activation? *Microcirculation.* 2003;10:297-311.
50. Rot A, Von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:891-928.
51. Del Pozo MA, Sánchez-Mateos P, Nieto M, Sánchez-Madrid F. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol.* 1995;131:495-508.
52. Geiger B, Bershadsky A. Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell.* 2002;110:139-42.
53. Constantin G, Majeed M, Giagulli C, Piccio L, Kim JY, Butcher EC, et al. Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity.* 2000;13:759-69.
54. Sánchez-Madrid F, Del Pozo MA. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* 1999;18:501-11.
55. Shamri R, Grabovsky V, Gauguet JM, Feigelson S, Manevich E, Kolanus W, et al. Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat Immunol.* 2005;6:497-506.
56. Laudanna C, Alon R. Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes. *Thromb Haemost.* 2006;95:5-11.
57. Luster AD. Chemokines —chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 1998;338:436-45.
58. Laudanna C. Integrin activation under flow: a local affair. *Nat Immunol.* 2005;6:429-30.
59. Cabanas C, Hogg N. Ligand intercellular adhesion molecule 1 has a necessary role in activation of integrin lymphocyte function-associated molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:5838-42.
60. Jun CD, Shimaoka M, Carman CV, Takagi J, Springer TA. Dimerization and the effectiveness of ICAM-1 in mediating LFA-1-dependent adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:6830-5.
61. Salas A, Shimaoka M, Kogan AN, Harwood C, Von Andrian UH, Springer TA. Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction. *Immunity.* 2004;20:393-406.
62. Grabovsky V, Feigelson S, Chen C, Bleijs DA, Peled A, Cinamon G, et al. Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J Exp Med.* 2000;192:495-506.
63. Dobereiner HG, Dubin-Thaler BJ, Hofman JM, Xenias HS, Sims TN, Giannone G, et al. Lateral membrane waves constitute a universal dynamic pattern of motile cells. *Phys Rev Lett.* 2006;97:038102.
64. Stewart MP, McDowell A, Hogg N. LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca²⁺-dependent protease, calpain. *J Cell Biol.* 1998;140:699-707.
65. Mory A, Feigelson SW, Yarali N, Kilic SS, Bayhan GI, Gershoni-Baruch R, et al. Kindlin-3: a new gene involved in the pathogenesis of LAD-III. *Blood.* 2008;112:2591.
66. Pasvolsky R, Feigelson SW, Kilie SS, Simon AJ, Tal-Lapidot G, Grabovsky V, et al. A LAD-III Syndrome is associated with defective expression of the Rap-1 activator CalDAG-GEFI in lymphocytes, neutrophils, and platelets. *J Exp Med.* 2007;204:1571-82.
67. Cairo CW, Mirchev R, Golan DE. Cytoskeletal regulation couples LFA-1 conformational changes to receptor lateral mobility and clustering. *Immunity.* 2006;25:297-308.
68. Cambi A, Joosten B, Koopman M, De Lange F, Beeren I, Torensma R, et al. Organization of the integrin LFA-1 in nanoclusters regulates its activity. *Mol Biol Cell.* 2006;17:4270-81.
69. Marschel P, Schmid-Schonbein GW. Control of fluid shear response in circulating leukocytes by integrins. *Ann Biomed Eng.* 2002;30:333-43.

70. Zwartz GJ, Chigaev A, Dwyer DC, Foutz TD, Edwards BS, Sklar LA. Real-time analysis of very late antigen-4 affinity modulation by shear. *J Biol Chem.* 2004;279:38277-86.
71. Cinamon G, Shinder V, Alon R. Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nat Immunol.* 2001;2:515-22.
72. Schenkel AR, Mamdough Z, Muller WA. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol.* 2004;5:393-400.
73. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med.* 2006;203:2569-75.
74. Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell.* 1987;51:813-9.
75. Barreiro O, Yáñez-Mó M, Serrador JM, Montoya MC, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, et al. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol.* 2002;157:1233-45.
76. Heiska L, Alfthan K, Gronholm M, Vilja P, Vaheri A, Carpen O. Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5- bisphosphate. *J Biol Chem.* 1998;273:21893-900.
77. Barreiro O, Zamai M, Yáñez-Mó M, Tejera E, López-Romero P, Monk PN, et al. Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *J Cell Biol.* 2008;183:527-42.
78. Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:801-11.
79. Gordon-Alonso M, Yáñez-Mó M, Barreiro O, Álvarez S, Muñoz-Fernández MA, Valenzuela-Fernández A, et al. Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion. *J Immunol.* 2006;177:5129-37.
80. Mittelbrunn M, Yáñez-Mó M, Sancho D, Ursa A, Sánchez-Madrid F. Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC. *J Immunol.* 2002;169:6691-5.
81. Yáñez-Mó M, Alfranca A, Cabanas C, Marazuela M, Tejedor R, Ursa MA, et al. Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with alpha3 beta1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *J Cell Biol.* 1998;141:791-804.
82. García-López MA, Barreiro O, García-Díez A, Sánchez-Madrid F, Penas PF. Role of tetraspanins CD9 and CD151 in primary melanocyte motility. *J Invest Dermatol.* 2005;125:1001-9.
83. Barreiro O, Yáñez-Mó M, Sala-Valdes M, Gutiérrez-López MD, Ovalle S, Higginbottom A, et al. Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood.* 2005;105:2852-61.
84. Cook-Mills JM. VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species. *Mol Immunol.* 2002;39:499-508.
85. Van Wetering S, Van Buul JD, Quik S, Mul FP, Anthony EC, Ten Klooster JP, et al. Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J Cell Sci.* 2002;115:1837-46.
86. Van Wetering S, Van Den Berk N, Van Buul JD, Mul FP, Lommerse I, Mous R, et al. VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;285:C343-52.
87. Deem TL, Cook-Mills JM. Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) activation of endothelial cell matrix metalloproteinases: role of reactive oxygen species. *Blood.* 2004;104:2385-93.
88. Van Buul JD, Fernández-Borja M, Anthony EC, Hordijk PL. Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:308-17.
89. Van Buul JD, Anthony EC, Fernández-Borja M, BurrIDGE K, Hordijk PL. Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) mediates vascular endothelial-cadherin-based cell-cell adhesion by regulating beta-catenin tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 2005;280:21129-36.
90. Etienne-Manneville S, Manneville JB, Adamson P, Wilbourn B, Greenwood J, Couraud PO. ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. *J Immunol.* 2000;165:3375-83.
91. Lorenzon P, Vecile E, Nardon E, Ferrero E, Harlan JM, Tedesco F, et al. Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *J Cell Biol.* 1998;142:1381-91.
92. Yang L, Kowalski JR, Yacono P, Bajmoczy M, Shaw SK, Froio RM, et al. Endothelial cell cortactin coordinates intercellular adhesion molecule-1 clustering and actin cytoskeleton remodeling during polymorphonuclear leukocyte adhesion and transmigration. *J Immunol.* 2006;177:6440-9.
93. Yang L, Kowalski JR, Zhan X, Thomas SM, Luscinskas FW. Endothelial cell cortactin phosphorylation by Src contributes to polymorphonuclear leukocyte transmigration in vitro. *Circ Res.* 2006;98:394-402.
94. Greenwood J, Etienne-Manneville S, Adamson P, Couraud PO. Lymphocyte migration into the central nervous system: implication of ICAM-1 signalling at the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol.* 2002;38:315-22.
95. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:1379-86.
96. Thompson PW, Randi AM, Ridley AJ. Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not ICAM-2, activates RhoA and stimulates c-fos and rhoA transcription in endothelial cells. *J Immunol.* 2002;169:1007-13.
97. Wang Q, Doerschuk CM. The signaling pathways induced by neutrophil-endothelial cell adhesion. *Antioxid Redox Signal.* 2002;4:39-47.
98. Clayton A, Evans RA, Pettit E, Hallett M, Williams JD, Steadman R. Cellular activation through the ligation of intercellular adhesion molecule-1. *J Cell Sci.* 1998;111:443-53.
99. Shaw SK, Ma S, Kim MB, Rao RM, Hartman CU, Froio RM, et al. Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial cell ICAM-1 accompany neutrophil transmigration. *J Exp Med.* 2004;200:1571-80.
100. Woodfin A, Reichel CA, Khandoga A, Corada M, Voisin MB, Scheiermann C, et al. JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration. *Blood.* 2007;110:1848-56.
101. Sandig M, Negrou E, Rogers KA. Changes in the distribution of LFA-1, catenins, and F-actin during transendothelial migration of monocytes in culture. *J Cell Sci.* 1997;110:2807-18.
102. Vestweber D. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol Rev.* 2007;218:178-96.
103. Weber C, Fraemohs L, Dejama E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:467-77.
104. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multifunctional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2514-23.
105. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 2003;24:327-34.
106. Engelhardt B, Wolburg H. Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol.* 2004;34:2955-63.

107. Carman CV, Springer TA. A transigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol.* 2004;167:377-88.
108. Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, De la Fuente MA, Geha RS, Ochs HD, et al. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity.* 2007;26:784-97.
109. Millan J, Hewlett L, Glyn M, Toomre D, Clark P, Ridley AJ. Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol.* 2006;8:113-23.
110. Nieminen M, Henttinen T, Merinen M, Marttila-Ichihara F, Eriksson JE, Jalkanen S. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat Cell Biol.* 2006;8:156-62.
111. Phillipson M, Kaur J, Colarusso P, Ballantyne CM, Kubes P. Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration. *PLoS ONE.* 2008;3:e1649.
112. Chaudhuri A, Behan PO. Natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2003;348:1598-9.
113. Lew EA, Stoffel EM. Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2003;348:1599.
114. Noseworthy JH, Kirkpatrick P. Natalizumab. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:101-2.
115. Von Andrian UH, Engelhardt B. Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. *N Engl J Med.* 2003;348:68-72.
116. Marecki S, Kirkpatrick P. Efalizumab. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3:473-4.
117. Mittelbrunn M, Molina A, Escribese MM, Yáñez-Mó M, Escudero E, Ursa A, et al. VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:11058-63.
118. González-Amaro R, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Therapeutic anti-integrin (alpha4 and alphaL) monoclonal antibodies: two-edged swords? *Immunology.* 2005;116:289-96.
119. Chamoun F, Burne M, O'Donnell M, Rabb H. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front Biosci.* 2000;5:E103-9.
120. Kollum M, Hofer I, Schreiber R, Bode C, Hehrlein C. Systemic application of anti-ICAM-1 monoclonal antibodies to prevent restenosis in rabbits: an anti-inflammatory strategy. *Coron Artery Dis.* 2007; 18:117-23.
121. Tohlens J, Volger OL, Van Buul JD, Hekking LH, Van Gils JM, Bonta PI, et al. Endothelial CD81 is a marker of early human atherosclerotic plaques and facilitates monocyte adhesion. *Cardiovasc Res.* 2009;81:187-96.