

UCH-FC
Biotecnología
M 193
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias
Escuela de Pregrado



EFFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS TOLEROGÉNICAS SOBRE LINFOCITOS T CD4+

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

JAXAIRA AMILENE MAGGI ORELLANA

Director de Seminario de Título:
Dr. Juan Carlos Aguillón Gutiérrez

Co-director de Seminario de Título:
Dr. Diego Catalán Martina

Patrocinante de Seminario de Título:
Dr. María Rosa Bono Merino

Septiembre 2014
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Jaxaira Amilene Maggi Orellana:

“EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS TOLEROGÉNICAS SOBRE LINFOCITOS T CD4+”

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dr. Juan Carlos Aguillón Gutiérrez
Director Seminario de Título

Dr. Diego Catalán Martina
Co-director Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono Merino
Patrocinante Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dra. Daniela Sauma Mahaluf
Presidente Comisión

Dr. Elías Utreras Puratich
Evaluador

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.



Santiago, Septiembre del 2014.

*A los que están, los que estuvieron
y los que siempre estarán.*

Biografía

Mi nombre es Jaxaira Maggi Orellana, nací el 9 de Marzo de 1990 en Santiago de Chile. Como única hija de Guillermo Maggi y Ximena Orellana, crecí mimada por el apego de mi padre y protegida incondicionalmente por la entrega de mis hermanos, Joao, Jair y Jerson. Aprovechando el tiempo que nos entregó la vida, de la mano de mi madre, una mujer abnegada por sus hijos y espectacular por donde se le mire, fui sembrando las semillas que definirían a futuro mi forma de ser. Tuve una bella infancia en las lejanas tierras de San Bernardo, enriquecida por experiencias memorables en compañía de mis inseparables amigas de toda la vida; y un notable paso por el colegio, el Instituto San Pablo Misionero, donde tuve la fortuna de encontrarme con personas espectaculares que forman parte de mi camino hasta el día de hoy. Es verdad, siempre fui bien “ñoña” y aplicada en mis estudios, y es porque desde pequeña se me inculcó el valor de aprender, mirar a mi alrededor y tener la constancia para forjar los elementos necesarios en la búsqueda de respuestas. Es así como nació mi curiosidad y con esto, mi amor por la ciencia. Entré a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile y el reto no fue menor. Si bien alguna vez pensé en dar un paso al costado y llegué a sentir que no era lo mío, a medida que fue pasando el tiempo el desafío se tornó fascinante y con ello mis ansias de conocimiento fueron creciendo. Me encontré con un mundo por descubrir, donde cada detalle importa y marca la diferencia. Observar, leer, cuestionarse, entender, buscar,



discutir, experimentar, caerse y levantarse, disfrutar los aciertos, aprender de las frustraciones y probar diferentes caminos en pos de un objetivo. Sí, definitivamente esto es lo que quería, definitivamente esto es lo mío. Y resultó que cuando pensé que ya estaba llegando al final del proceso, me di cuenta que esto recién estaba empezando. Se me dio la oportunidad de realizar mi trabajo de seminario de título en el Laboratorio de Enfermedades Autoinmunes e Inflamatorias, en la Facultad de Medicina de la Universidad y, con el apoyo de un grupo humano y científico increíble, al fin pude poner en práctica todas las herramientas que fui adquiriendo durante mi formación profesional, ¡todo lo aprendido sí tenía sentido!

Hoy, *ad portas* de mi titulación, mis anhelos van en pos de contribuir, en poder aplicar el conocimiento científico como motor de cambios en esta sociedad. Llegó la hora de ir dejando huellas. Me declaro expectante a lo que esté por venir y lo recibo con los brazos abiertos.

Agradecimientos

Son muchas las personas que han formado parte de este lindo proceso de crecimiento, por lo cual las palabras se me hacen pocas a la hora de expresar lo profundamente agradecida que me siento. Es por esto, que como no quiero que se quede nadie afuera, es que aparecen los “que están, los que estuvieron y los que siempre estarán”.

Quisiera hacer mención especial a mi familia, que representa un soporte fundamental en mí. Mi madre, quien fuera simplemente la mejor y hoy la luz en mi camino; y mi padre, un hombre muy sabio que me ha apoyado y sostenido como ha podido, me entregaron todo su amor y los valores fundamentales que constituyen mi forma de ser. Y mis hermanos, mis compañeros de toda la vida, definitivamente “los que siempre estarán”, cada cual con sus particularidades increíbles es trascendental en cada etapa de mi vida. Ustedes son mi motivación.

Agradezco muchísimo a mis amigos, quienes me han acompañado “en las buenas y en las malas”, como dicen por ahí. Esos con los que aunque pase el tiempo, siempre tendremos una excusa para arrancarnos de la rutina.

Más que agradecida estoy de haber tenido la suerte de conocer personas maravillosas que han formado parte de mi vida; algunas se han quedado en el camino, otras me han acompañado incondicionalmente, y hay quien ha llegado para quedarse y mostrarme que no existe mejor cotidiano que el que se comparte con una sonrisa.

No puedo dejar de mencionar a mis compañeros de universidad, con quienes emprendí una linda aventura en los misteriosos pasajes de la ciencia y hoy me llena de alegría ver cómo se van convirtiendo en grandes profesionales.

Finalmente, muy agradecida me siento de haber conocido a cada una de las personas que forman parte del “IRTgroup”, donde pude desenvolverme de la mejor manera gracias al apoyo docente y humano de grandes profesionales, formadores y compañeros de rutina. En especial, agradezco al Dr. Juan Carlos Aguillón por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, entregándome la confianza necesaria para sacar adelante este trabajo de tesis, bajo su dirección y consejo; y a los doctores Diego Catalán y Karina Pino, por su excelente disposición y el sinnúmero de críticas constructivas indispensables en el desarrollo de este trabajo.

Financiamiento

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de “Enfermedades Autoinmunes e Inflamatorias” perteneciente al grupo de “Inmunorregulación y Tolerancia” (IRTgroup) del Programa Disciplinario de Inmunología, ubicado en el Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Su realización fue posible con el financiamiento de los proyectos FONDECYT 1100102 y del Instituto Milenio en Inmunología e Inmunoterapia P09/016-F.

Índice

Biografía.....	iv
Agradecimientos	vi
Financiamiento	viii
Índice.....	ix
Índice de figuras.....	xi
Lista de abreviaturas	xiv
Resumen.....	1
Abstract	3
Introducción	4
- Células dendríticas.....	5
- Linfocitos T.....	7
- Interacción célula dendrítica-linfocito T.....	10
- Células dendríticas y tolerancia.....	13
- Generación <i>in vitro</i> de células dendríticas tolerogénicas.....	16
Hipótesis.....	20
Objetivos	21
Objetivo General:	21
Objetivos Específicos:.....	21
Materiales y Métodos.....	22
- Purificación de poblaciones celulares a partir de sangre periférica.....	22
- Generación de células dendríticas.....	23
- Caracterización fenotípica de células dendríticas.....	24

- Evaluación de la capacidad endocítica de células dendríticas.	24
- Ensayos de proliferación antígeno-específicos.	25
- Evaluación del perfil de producción de citoquinas de linfocitos T CD4+ co-cultivados con células dendríticas.	26
- Ensayos de re-estimulación de linfocitos T.	27
- Evaluación de la presencia de poblaciones T reguladoras en el co-cultivo.	28
- Análisis estadísticos.	29
Resultados	30
- Purificación de poblaciones celulares a partir de sangre periférica.	30
- Generación de células dendríticas (DCs).	31
- Caracterización fenotípica de células dendríticas.	35
- Evaluación de la capacidad endocítica de células dendríticas.	37
- Ensayos de proliferación antígeno-específicos.	38
- Evaluación del perfil de producción de citoquinas de linfocitos T CD4+ co-cultivados con células dendríticas.	41
- Ensayos de re-estimulación de linfocitos T.	45
- Evaluación de la presencia de poblaciones T reguladoras.	50
Discusión	52
Conclusiones	65
Bibliografía	66
Figura Suplementaria	73

Índice de figuras

Figura 1.	Fases de una respuesta inmune adquirida.....	9
Figura 2.	Sinapsis inmunológica.....	11
Figura 3.	Polarización de respuesta de linfocitos T CD4+.....	13
Figura 4.	Protocolo de 5 días para la generación de células dendríticas.....	23
Figura 5.	Co-cultivo autólogo de linfocitos T CD4+ y células dendríticas.....	27
Figura 6.	Ensayos de re-estimulación de linfocitos T CD4+.....	28
Figura 7.	Evaluación de pureza de monocitos, linfocitos T vírgenes y de memoria sometidos a aislamiento desde sangre periférica.	30
Figura 8.	Rendimiento y viabilidad de diferentes tipos de células dendríticas generadas a partir de monocitos de sangre periférica.....	32
Figura 9.	Morfología de diferentes tipos de células dendríticas generadas a partir de monocitos de sangre periférica.	33
Figura 10.	Evaluación de la diferenciación de monocitos en células dendríticas tras 5 días de cultivo.....	34
Figura 11.	Caracterización fenotípica de diferentes tipos de células dendríticas generadas a partir de monocitos de sangre periférica al día 5 de cultivo.....	36

Figura 12.	Evaluación de la capacidad endocítica de diferentes tipos de células dendríticas generadas desde monocitos de sangre periférica.....	37
Figura 13.	Evaluación de la capacidad de diferentes tipos de células dendríticas generadas a partir de monocitos de sangre periférica de estimular la proliferación antígeno-específica de linfocitos T de memoria CD4+.....	39
Figura 14.	Evaluación de la capacidad de los diferentes tipos de células dendríticas generadas a partir de monocitos de sangre periférica de estimular la proliferación antígeno-específica de linfocitos T vírgenes CD4+.....	40
Figura 15.	Evaluación de la viabilidad de los linfocitos T CD4+ vírgenes co-cultivados con los diferentes tipos de células dendríticas (DCs) pulsadas con PPD.....	41
Figura 16.	Evaluación del perfil de citoquinas producidas por linfocitos T de memoria CD4+ estimulados con diferentes tipos de células dendríticas pulsadas con PPD.....	43
Figura 17.	Concentración de IL-10 en los sobrenadantes de los co-cultivos de linfocitos T CD4+ vírgenes y los distintos tipos de células dendríticas (DCs) en estudio.....	44

Figura 18.	Evaluación del perfil proliferativo y de producción de IFN γ por linfocitos T de memoria CD4+ re-estimulados con DCs maduras pulsadas con PPD.....	46
Figura 19.	Evaluación del perfil proliferativo y de producción de IFN γ por linfocitos T vírgenes CD4+ re-estimulados con DCs maduras pulsadas con PPD.	48
Figura 20.	Evaluación del perfil proliferativo y de producción de IFN γ por linfocitos T vírgenes CD4+ re-estimulados con anti-CD3.....	49
Figura 21.	Evaluación de la presencia de células T reguladoras en co-cultivos autólogos de linfocitos T de memoria CD4+ y diferentes tipos de células dendríticas.	50
Figura 22.	Evaluación de la presencia de células T reguladoras en co-cultivos autólogos de linfocitos T vírgenes CD4+ y diferentes tipos de células dendríticas	51
Figura S1.	Evaluación de la expresión de CD4 y CD11c en células recuperadas de co-cultivos primarios de linfocitos T CD4+ y células dendríticas (DCs) sometidas a distintos tratamientos, para su posterior re-estimulación.....	73

Lista de abreviaturas

7-AAD	7-aminoactinomicina.
ANOVA	Análisis de varianza.
APC	Inglés para “Allophycocyanin”
CFSE	Carboxifluoresceina succinimidil éster.
CIA	Artritis inducida por colágeno.
CPA	Célula presentadora de antígenos.
DCs	Células dendríticas.
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental.
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima.
FACS	Inglés para “Fluorescence-activated cell sorting”.
FITC	Inglés para “Fluorescein isothiocyanate”.
FSC	Inglés para “Forward scatter”.
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
iDCs	Células dendríticas inmaduras.
IFN	Interferón.
IL	Interleuquina.
LPS	Lipopolisacárido.
mDCs	Células dendríticas maduras.
MFI	Intensidad de fluorescencia media geométrica.
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad.
MPLA	Monofosforil Lípido A.

MPLA-tDCs	Células dendríticas tolerogénicas activadas con MPLA.
NF-κB	Factor nuclear kappa B.
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica.
PBS	Tampón fosfato salino.
PE	Inglés para "Phycoerythrin"
PPD	Derivado proteico purificado de tuberculina.
PMA	Forbol 12-miristato 14-acetato.
rh	Proteína humana recombinante.
rpm	Revoluciones por minuto.
SFB	Suero fetal bovino.
SSC	Inglés para "Side scatter".
TCR	Receptor de linfocito T.
tDCs	Células dendríticas tolerogénicas.
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta.
Th	Linfocito T "helper" o colaboradores.
TLR	Receptor de tipo "Toll".
TNF	Factor de necrosis tumoral.
Tregs	Linfocitos T reguladores.

Resumen

Las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígeno que inician y modulan respuestas inmunes. En función de su estado de maduración son capaces de inducir inmunidad o tolerancia. En su estado tolerogénico (tDCs), las DCs poseen el potencial de ser empleadas como terapia celular en el control de enfermedades mediadas por linfocitos T, de manera que ha incrementado el interés por generarlas *ex vivo*. Recientemente nuestro grupo describió un protocolo de 5 días para la generación de tDCs derivadas de monocitos, tratadas con dexametasona como agente inmunomodulador y monofosforil lípido A como estímulo de activación (MPLA-tDCs), con características fenotípicas y funcionales tolerogénicas. Ahora bien, para su inclusión como herramienta terapéutica es importante validar que son capaces de actuar en los distintos niveles de una respuesta inmune. Bajo este contexto, en el presente trabajo se estudiaron los efectos de las MPLA-tDCs sobre respuestas antígeno-específicas de linfocitos T CD4+ vírgenes y de memoria, en términos de proliferación y producción de citoquinas. Los resultados muestran que las MPLA-tDCs presentan una capacidad reducida para inducir la proliferación de linfocitos T CD4+ de memoria e inhiben la producción de citoquinas pro-inflamatorias, promoviendo un estado de anergia. Por otro lado, se demostró que las MPLA-tDCs son capaces de instruir a los linfocitos T CD4+ vírgenes en un primer encuentro, reduciendo su proliferación y secreción de citoquinas pro-inflamatorias frente a la re-estimulación. Esta información sustenta que las MPLA-

tDCs son capaces de modular respuestas de linfocitos T CD4+ vírgenes y de memoria en una dirección pro-tolerogénica.

Abstract

Dendritic cells (DCs) are antigen-presenting cells that initiate and modulate immune responses. Depending on their maturation state DCs are able to induce immunity or tolerance. In their tolerogenic stage (tDCs), DCs are considered as promising cell therapy for T cell-mediated pathology control, whereby the interest for their *ex vivo* generation has been increased. Recently, we described a 5-day protocol for generation of monocyte-derived tDCs using dexamethasone as immunomodulatory agent and monophosphoryl lipid A as activation stimulus (MPLA-tDCs), with phenotypic and functional tolerogenic characteristics. Now, for their inclusion as therapeutic tool is important to validate that they are able to act at different levels of an immune response. In this context, in this work we study the effects of MPLA-tDCs on antigen-specific responses of naïve and memory CD4⁺ T cells in terms of proliferation and cytokine production. Results show that MPLA-tDCs have a reduced ability to induce memory T cells proliferation and inhibit the pro-inflammatory cytokines production, promoting an anergy state. Furthermore, it was demonstrated that MPLA-tDCs are able to instruct naïve T cells at the initial priming, reducing their proliferation and pro-inflammatory cytokines secretion after re-stimulation. This data supports that MPLA-tDCs are able to modulate naïve and memory CD4⁺ T cells responses in a pro-tolerogenic direction.

Introducción

El sistema inmunológico está conformado por diversos órganos, tejidos, células y moléculas, que en conjunto constituyen una red de defensa natural para el organismo frente a una amplia gama de agentes infecciosos, como son los hongos, las bacterias y los virus. La cadena de eventos desencadenados para llevar a cabo esta función protectora se conoce como respuesta inmune. Esta respuesta se basa principalmente en la capacidad del sistema inmunitario de reconocer sustancias peligrosas, conocidas como antígenos, y reaccionar. Bajo este contexto, se pueden distinguir respuestas de tipo innata o adaptativa.

La respuesta inmune innata establece la primera línea de defensa del hospedero frente a microorganismos, y está constituida por: Barreras físicas y químicas, como los epitelios y las sustancias antimicrobianas que se forman en su superficie; células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) y linfocitos citolíticos naturales (NK, *natural killer*); proteínas sanguíneas, como los factores del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; y citoquinas, un tipo de proteínas encargadas de regular y coordinar muchas de las actividades de las células que forman parte del sistema inmune (Abbas & Lichman, 2007). Si bien estos mecanismos de defensa aportan un buen esquema de protección, en ocasiones no son del todo suficientes y se requiere de un sistema más potente y evolucionado, la inmunidad adaptativa.

Las respuestas inmunes adaptativas son altamente específicas y promueven el desarrollo de memoria inmunológica, esto es, el despliegue de respuestas más rápidas y efectivas frente a un segundo encuentro con un mismo tipo de patógeno. Sus principales

componentes son los linfocitos T CD4+ y CD8+ y los linfocitos B, junto con sus productos de secreción (citoquinas y anticuerpos) (Abbas & Lichman, 2007).

Ahora bien, en la práctica el sistema inmune funciona de forma unitaria e integral, de manera que el desarrollo de una respuesta inmune eficiente resulta de la interacción entre la inmunidad innata y adaptativa. El vínculo entre ambas está dado por la presencia de células dendríticas (DCs), un grupo de células especializadas en la presentación de antígenos.

Si bien las DCs forman parte de la inmunidad innata, actuando como verdaderas centinelas en los tejidos periféricos, en búsqueda de agentes potencialmente dañinos para su captura, su función principal es la de procesar este material antigénico, devolverlo a su superficie y presentarlo a células especializadas del sistema inmune adaptativo, los linfocitos T (Murphy y col., 2007).

- **Células dendríticas.**

Las células dendríticas constituyen un grupo heterogéneo de células en cuanto a su localización, fenotipo, y función (Guermonprez y col., 2002). Se han identificado diferentes subtipos de DCs: De origen mieloide, como las células de Langerhans, presentes en la epidermis y membranas mucosas; las DCs intersticiales, de los órganos parenquimatosos; las DCs interdigitantes, presentes en áreas ricas en linfocitos T de los ganglios linfáticos y el bazo; las DCs circulantes, de sangre periférica; y las DCs de origen linfoide, que se encuentran en los folículos de los linfocitos B de los órganos linfoides secundarios (Wright-Browne y col., 1997).

En estado fisiológico normal, los diferentes subtipos de DCs llevan a cabo sus respectivas funciones de acuerdo a su ubicación anatómica (Schäkel y col., 2009).

Las DCs tienen la capacidad de responder a señales de peligro, pues expresan receptores de tipo "toll" (TLR, *toll-like receptors*), principalmente TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-8 y TLR-9, los cuales son específicos para una amplia diversidad de moléculas microbianas, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Dentro de estos, encontramos lipoproteínas derivadas de procariontes, flagelina, histidina-guanosina fosfato (CpG) del DNA bacterial, oligonucleótidos (ODN), doble hebra de RNA viral (dsRNA), y carbohidratos bacterianos como lipopolisacáridos (LPS) o manosa, entre otros (Warncke y col., 2006). En respuesta a estos estímulos, las DCs inmaduras residentes en los tejidos periféricos se movilizan, capturan el material antigénico, lo procesan en péptidos más simples, mientras viajan a los órganos linfoides secundarios, en donde se completa su maduración, y los presentan en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) a linfocitos T (Revy y col., 2001). Los péptidos exógenos son presentados en moléculas del MHC de clase II, mientras que los antígenos endógenos (de componentes propios o virus), en moléculas del MHC de clase I (Shortman & Liu Yong-jun, 2002).

Este proceso coordinado de activación, maduración y migración de las DCs hacia los órganos linfoides implica a su vez una serie de cambios morfológicos. En estado inmaduro, las DCs se caracterizan por presentar una alta capacidad fagocítica (Sallusto y col., 1995); expresar receptores de quimioquinas asociados a la migración hacia los sitios de inflamación (Lanzavecchia & Sallusto, 2001); y tener una baja expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, moléculas activadoras funcionales

como CD40 y moléculas del MHC de clase II, de manera que tienen un potencial activador de linfocitos T muy bajo (Steinman y col., 1999). Una vez internalizado el antígeno, comienza el proceso de maduración de las DCs, que trae consigo una disminución de su capacidad fagocítica; un incremento en la expresión de receptores de quimioquinas, como CCR7, relacionados con la migración hacia los nódulos linfáticos; un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras y moléculas de adhesión (Ueno y col., 2007); y un perfil de secreción de citoquinas y quimioquinas asociadas a la iniciación y/o amplificación de respuestas mediadas por linfocitos T y B, tales como, la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia diferentes fenotipos celulares; la activación e incremento de la citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8+; la maduración de linfocitos B, el cambio de clase de inmunoglobulina y la producción de anticuerpos (Wallet y col., 2005).

- **Linfocitos T.**

Los linfocitos T se desarrollan y diferencian en el timo a partir de células progenitoras originadas en la médula ósea, y atraviesan una fase de maduración compleja definida por diversas etapas, en las cuales adquieren las características funcionales y fenotípicas de una célula madura. De esta manera, se gatilla la expresión de receptores de células T (TCR), para el reconocimiento del antígeno, y moléculas de superficie accesorias CD4 (característica de linfocitos T de tipo “*helper*” o colaboradores) o CD8 (presente en linfocitos T citotóxicos) (Abbas & Lichman, 2007).

Una vez que estas células han madurado completamente, reciben el nombre de linfocitos T vírgenes (caracterizados por no haberse encontrado nunca con algún antígeno extraño), los cuales migran a colonizar los órganos linfoides secundarios.

Durante el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa (Fig. 1), los linfocitos T vírgenes son activados por las DCs, mediante la presentación de antígenos capturados en la periferia. A raíz de esta interacción se gatilla la expansión clonal de los linfocitos T, esto es, la proliferación de los clones linfocitarios específicos para el antígeno que originó la respuesta. Posteriormente, se genera la diferenciación de las progenies de linfocitos T tanto a células efectoras, que llevan a cabo la eliminación del antígeno, como a células de memoria. Frente al control y eliminación del antígeno, la respuesta inmune comienza a menguar, a fin de recuperar la homeostasis inmune, a través de la muerte por apoptosis de un gran número de linfocitos, una vez que han cumplido su función (Abbas & Lichman, 2007).

Aquellas células que se diferencian a células de memoria, poseen la función de intervenir en respuestas rápidas y de mejor calidad (respuestas secundarias) tras exposiciones posteriores al mismo antígeno (Sprent & Charles, 2002). Los linfocitos T de memoria pueden sobrevivir muchos años en un estado latente desde el punto de vista funcional o con un ritmo de división lento luego de la eliminación del antígeno. Su expresión de proteínas de superficie los distingue de los linfocitos T vírgenes y efectores recién activados: Los linfocitos T de memoria y vírgenes expresan grandes cantidades de receptores para IL-7, al contrario de los linfocitos T efectores. Los linfocitos T de memoria también expresan altos niveles de integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$, CD44, CD54 y CD58 en comparación a las células vírgenes (Hamann y col., 1997). Sin embargo, pierden la

expresión de CD62L y CCR7, moléculas asociadas a la migración hacia los nódulos linfáticos, mientras los linfocitos T vírgenes las expresan de manera uniforme (Sallusto y col., 1999).

No obstante los marcadores descritos, CD45, una fosfatasa-tirosina que regula la señalización a través del TCR y el receptor de ciertas citoquinas (Irie-Sasaki y col., 2001), es uno de los marcadores de superficie más usado para la discriminación entre linfocitos T de memoria y vírgenes. Se han identificado múltiples isoformas de esta molécula, de modo que mientras las células T vírgenes expresan la isoforma CD45RA, las de memoria expresan CD45RO (Berard & Tough, 2002).

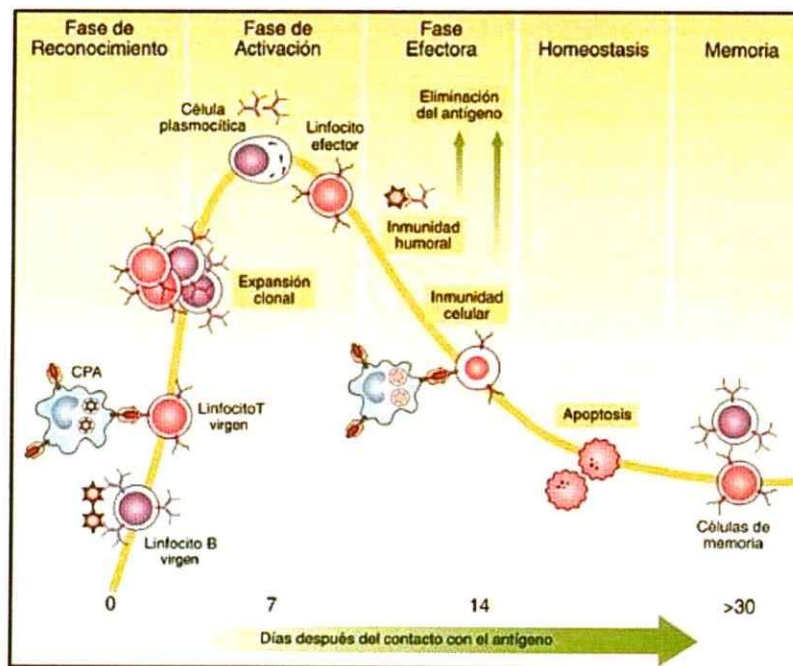


Figura 1. Fases de una respuesta inmune adaptable. Las fases de una respuesta inmune adaptable comienzan con el reconocimiento del antígeno, seguido de la activación y fase efectora de los linfocitos T y B, hasta conseguir la homeostasis del sistema inmune y finalmente preservar la memoria inmunológica (Adaptada de Abbas AK and Lichman AH. Cellular and molecular immunology, 2007).

- **Interacción célula dendrítica-linfocito T.**

Los linfocitos T CD4⁺ tienen un papel central en la labor protectora del sistema inmune, a través del desarrollo de distintas tareas: Contribuyen en la producción de anticuerpos por los linfocitos B; estimulan a los macrófagos a mejorar su actividad microbicida; participan en el reclutamiento de neutrófilos, eosinófilos y basófilos a los sitios de infección e inflamación; y orquestan el desarrollo de una respuesta inmune mediante la liberación de diversas citoquinas y quimioquinas. A su vez, los linfocitos T CD8⁺ ejercen una función citotóxica, mediante la destrucción de células blanco que han sido infectadas intracelularmente (Abbas & Lichman, 2007).

Para poder llevar a cabo sus diferentes funciones, los linfocitos T deben ser activados por células presentadoras de antígeno (CPAs). Bajo este contexto, una vez que las DCs, CPAs profesionales, capturan el antígeno en la periferia y lo degradan en péptidos antigénicos más simples capaces de unirse al MHC-de clase I o de clase II, viajan hacia los nódulos linfáticos donde interactúan con los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente. La activación de los linfocitos T por las DCs requiere de un contacto denominado “sinapsis inmunológica” (Van Gisbergen y col., 2005) y de tres señales independientes: 1) El reconocimiento del complejo péptido-MHC en las DCs, por el receptor de los linfocitos T (TCR); 2) La interacción entre moléculas de coestimulación expresadas en las DCs y sus respectivos ligandos en los linfocitos T; 3) El microambiente en el cual ocurre la interacción dado por las citoquinas secretadas por las DCs (Fig. 2).

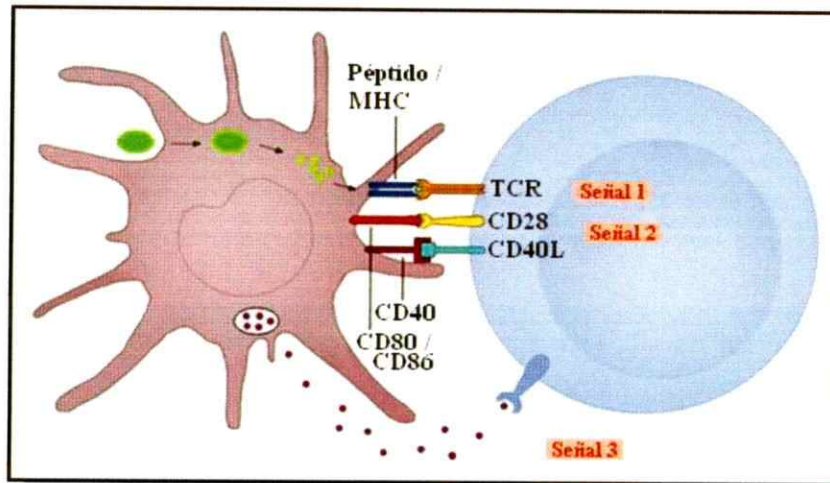


Figura 2. Sinapsis inmunológica. Fase de reconocimiento del antígeno, en la cual se establece el contacto entre la DC y el linfocito T. Las DCs activan a los linfocitos T a través de 3 señales independientes: La interacción entre el complejo MHC / péptido y el TCR (*señal 1*); la interacción entre diversas moléculas coestimuladoras y accesorias y sus ligandos en la célula T (*señal 2*); y la secreción de citoquinas por las DCs (*señal 3*).

Se ha visto que las DCs son las únicas CPAs capaces de activar linfocitos T CD4+ vírgenes (Th0), y que dependiendo de su estado de maduración y del perfil de citoquinas secretado, pueden determinar su diferenciación hacia distintos subtipos celulares (Fig. 3): Linfocitos T cooperadores o “*helper*” de tipo 1 (Th1), de tipo 2 (Th2), de tipo 17 (Th17) o linfocitos T reguladores inducidos (iTreg) (Zhou y col., 2009).

Un microambiente enriquecido en IL-12, promueve la polarización de respuestas de linfocitos T CD4+ vírgenes hacia un fenotipo Th1. Estas células participan en respuestas inmunes contra patógenos intracelulares (Paul & Seder, 1994) y se caracterizan porque sus principales productos de secreción son IFN- γ e IL-2 y regulan positivamente el factor de transcripción t-bet (Szabo y col, 2000).

La presencia de IL-4 e IL-2 en el medio promueve la diferenciación de linfocitos Th0 hacia un perfil Th2, mediador de la defensa del organismo contra parásitos

extracelulares (Kopf y col., 1993) y de respuestas inmunes humorales (Zhu y col., 2001). Linfocitos con este fenotipo son secretores de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 y expresan altos niveles del factor de transcripción GATA-3 (Weaver y col., 2006).

La secreción de TGF- β e IL-6 por las DCs, induce la diferenciación de linfocitos T CD4+ vírgenes hacia células Th17, un grupo celular reconocido recientemente, mediador de respuestas inmunes contra bacterias extracelulares y hongos (Ivanov y col., 2006). Los linfocitos Th17 producen IL-17A, IL-17F, IL-21, e IL-22 y su factor de transcripción característico es ROR γ t (Sakaguchi y col., 2004).

Finalmente, para la diferenciación celular hacia linfocitos T reguladores (Tregs), centrales en la mantención de la tolerancia frente a lo propio y la regulación de respuestas inmunes (Fontenot y col., 2003) es necesaria la presencia de IL-10 ó TGF- β e IL-2 en el microambiente. Los linfocitos T reguladores (Treg) presentan altos niveles de Foxp3 y son secretores de IL-10 y TGF- β (Chen y col., 1994). Dentro de los linfocitos reguladores se han descubierto otros subtipos celulares, incluyendo las células Th3 y TR1, productoras de altos niveles de TGF- β e IL-10, respectivamente (Groux y col., 1997).

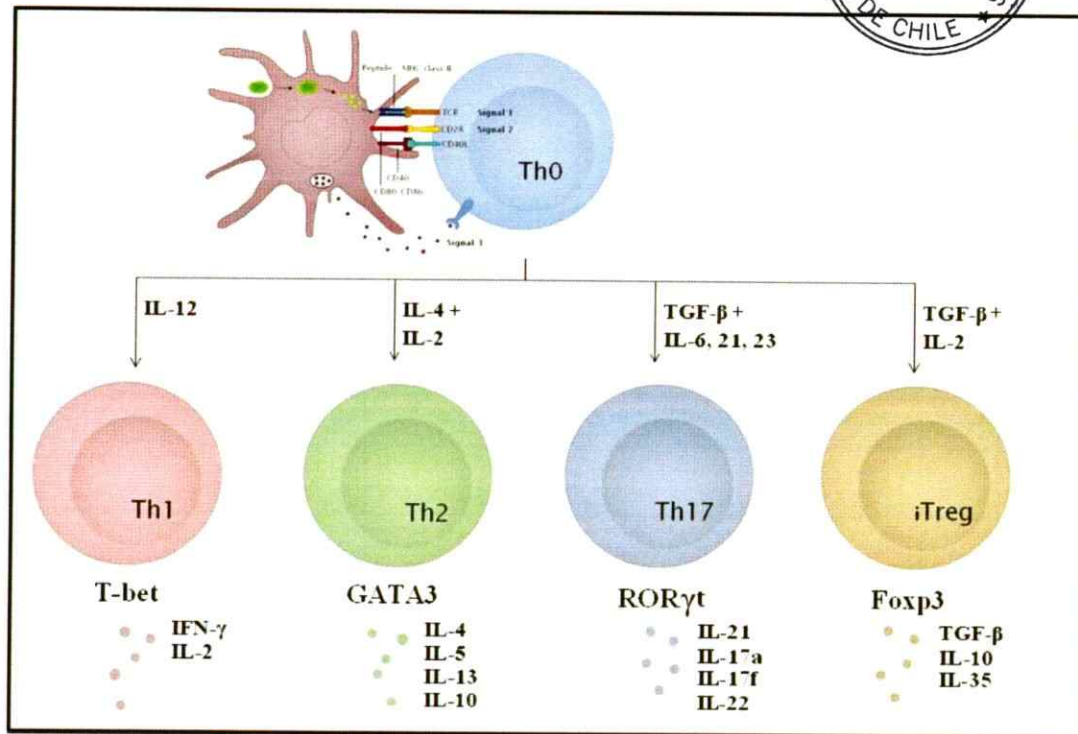


Figura 3. Polarización de respuestas de linfocitos T CD4+. Las DCs activan a los linfocitos T CD4+ vírgenes, y dependiendo de las citoquinas que secretan, dirigen su diferenciación hacia 4 posibles subtipos celulares: Linfocitos Th1, Th2, Th17 o reguladores, cada uno de los cuales presenta un perfil de secreción de citoquinas y factor de transcripción característicos.

- **Células dendríticas y tolerancia.**

Junto con ser importantes en el control de la magnitud e intensidad de una respuesta inmune, las DCs juegan un papel trascendental en su modulación, actuando como mediadoras elementales en el desarrollo de tolerancia periférica y en la mantención de la homeostasis inmune (Lipscomb & Masten, 2002). El despliegue de estas funciones diametralmente distintas está relacionado con el estado de maduración de las DCs, de manera que mientras las células dendríticas inmaduras (iDCs) son capaces de generar una respuesta de tolerancia y, por ende, son consideradas

tolerogénicas (tDCs), las maduras son, por el contrario, inmunogénicas y asociadas a la inducción de respuestas efectoras (Steinman y col., 2003).

El principal mecanismo de inducción de tolerancia que posee el sistema inmune se lleva a cabo en el timo y se conoce como tolerancia central (Starr y col., 2003). A través de ésta, los timocitos (o linfocitos T inmaduros) que reconocen con alta afinidad antígenos derivados de proteínas endógenas, son eliminados (selección negativa). Aquellos linfocitos T autorreactivos que escapan a este proceso y salen a la periferia, se enfrentan a un segundo mecanismo de tolerancia, la tolerancia periférica. Este proceso es llevado a cabo por las iDCs, las cuales tienen la capacidad de internalizar antígenos para procesarlos, y en ausencia de señales de coestimulación, presentarlos a linfocitos T vírgenes (Lanzavecchia & Sallusto, 2001).

Dentro de los mecanismos por los cuales las DCs inducen tolerancia, se incluyen: (1) Delección de células T; (2) Inducción de anergia en células T; (3) Desviación en el perfil de producción de citoquinas de células T; (4) Inducción de Tregs (Steinman y col., 2003).

En la actualidad ha incrementado el interés por explorar las características tolerogénicas de las DCs con fines biomédicos (Lipscomb & Masten, 2002), tanto en la promoción de tolerancia a trasplantes como en la modulación de patologías autoinmunes.

Si bien los mecanismos por los cuales se gatilla y se mantiene una respuesta inmunológica anómala frente a “lo propio” no están del todo esclarecidos, es sabido que las células T son uno de los principales mediadores de este fenómeno, a través de respuestas no deseadas frente a auto-antígenos. Es por esto que se han diseñado

diferentes estrategias sustentadas en la utilización de tDCs generadas *ex vivo* capaces de procesar potenciales auto-antígenos y presentarlos a linfocitos T CD4+ autorreactivos en un contexto de tolerancia, y así evitar respuestas auto-inmunes aberrantes.

La generación *in vitro* de DCs con propiedades tolerogénicas y su uso en modelos murinos de trasplante (Lutz y col., 2000) y de enfermedades autoinmunes como la artritis inducida por colágeno (CIA) (Healy y col., 2008; Salazar y col., 2008), diabetes (Adorini y col., 2003) y encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Chorny y col., 2005) han demostrado que son capaces de inhibir respuestas inmunes destructivas mediadas por linfocitos T CD4+. Ahora bien, pese a que estos resultados son bastante promisorios, los modelos animales no reflejan completamente el escenario de una enfermedad autoinmune en humanos, por lo cual la seguridad, factibilidad y efectividad de una terapia basada en tDCs debe ser corroborada por estudios clínicos. Bajo este contexto, en el año 2011 se llevaron a cabo dos ensayos clínicos de fase 1 utilizando tDCs: El primero en pacientes con diabetes tipo 1 (Giannoukakis y col., 2011), y el segundo en pacientes con artritis reumatoide (Thomas y col., 2011). En ambos casos el tratamiento fue bien tolerado por los pacientes, sin efectos secundarios, pero no se observó gran mejoría en la respuesta inflamatoria a nivel sistémico. Esto más que nada demuestra que la administración de estas células es segura, lo cual representa un importante avance en el área y la base para seguir investigando al respecto y llevar a cabo estudios en los cuales se ratifique su eficacia.

- **Generación *in vitro* de células dendríticas tolerogénicas.**

Las propiedades tolerogénicas de las iDCs han sido documentadas en humanos, donde se ha visto que es factible inducir tolerancia antigénica sobre linfocitos T específicos (Dhodapkar y col., 2001). Sin embargo, el empleo de estas iDCs en clínica presenta el inconveniente de que su fenotipo pudiera ser inestable, es decir, que *in vivo* experimenten un proceso de maduración en respuesta al ambiente pro-inflamatorio que caracteriza a ciertas enfermedades y, como resultado, se vuelvan inmunogénicas, estimulando una respuesta descontrolada de linfocitos T. Por consiguiente, como las iDCs no son seguras para su uso terapéutico, se han desarrollado diversas estrategias para la obtención de tDCs fenotípicamente estables, en búsqueda de protocolos que sean reproducibles y permitan la obtención de células de alta pureza y viabilidad, aspectos indispensables para su aplicación terapéutica en humanos.

Hasta el momento el método más ampliamente utilizado para la obtención de DCs, es la diferenciación de monocitos *in vitro* cultivados en presencia de GM-CSF e IL-4 durante 7 días (Sallusto y Lanzavecchia, 1994). A su vez, la inducción de un fenotipo tolerogénico se ha llevado a cabo por diversos métodos, dentro de los cuales se incluyen: Modificación genética, por ejemplo, a través del uso de RNA interferente para el bloqueo de moléculas como CD40, CD80, CD86, RelB o IL-12 p35 (Zheng y col., 2010); modulación con fármacos inmunosupresores y anti-inflamatorios como el ácido acetilsalicílico, vitamina D3, resveratrol y glucocorticoides como la dexametasona (Anderson y col., 2008; Buckland y col., 2006; Švajger y col., 2010); y tratamiento con citoquinas anti-inflamatorias, como IL-10, TGF- β e IFN- γ (Fu y col., 2009; Torres-Aguilar y col., 2010; Sato y col., 2003).

Si bien dependiendo de la estrategia utilizada, las propiedades de las tDCs generadas pueden variar, en general mantienen las siguientes características: baja expresión de moléculas coestimuladoras y de presentación antigénica; baja secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-12, IL-23, IL-6 y TNF- α , y elevada producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β , junto con la habilidad de suprimir respuestas T efectoras (Steinbrink y col., 2002; Hilkens y col., 2010).

Recientemente se ha estudiado una nueva variante en la generación de tDCs, la denominada “activación alternativa” (Lan y col., 2006) en la cual DCs que en primera instancia han sido tratadas con agentes inmuno-moduladores, reciben a su vez un estímulo de activación/maduración, como el LPS (Lan y col., 2006), de manera de que sin perder sus propiedades tolerogénicas, se potencie su capacidad presentadora de antígenos y la expresión de moléculas asociadas a la migración hacia los linfonodos secundarios, el lugar físico donde finalmente se encontrarán con los linfocitos T y podrán ejercer su función moduladora (Anderson y col., 2009; Lau y col., 2008).

En nuestro laboratorio se ha descrito un protocolo de 5 días para la generación de tDCs estables, a través de un tratamiento combinado con dexametasona, como agente inmuno-modulador y monofosforil lípido A (MPLA-tDCs), como estímulo de activación (García-González y col., 2013).

La dexametasona es un glucocorticoide ampliamente investigado por sus efectos moduladores sobre las DCs (Kooten y col., 2009), que actúa inhibiendo la vía del NF- κ B, una de las principales vías de señalización relacionadas con la maduración de las DCs. Su administración trae consigo una disminución en la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86), activadoras funcionales (CD40), de maduración

(CD83), de presentación antigénica (MHC-II) y de migración hacia los linfonodos secundarios (CCR7). Además, las DCs muestran una baja producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-12, una elevada producción de IL-10, y una capacidad alo-estimuladora disminuida (García-González y col., 2013).

Por su parte, el monofosforil lípido A (MPLA) es un análogo no tóxico del LPS, que actúa a nivel del TLR-2 y del TLR-4. Se ha visto que induce la secreción de altos niveles de IL-10 y bajos de IL-12, potenciando la capacidad presentadora de antígenos y migratoria de las DCs (García-González y col., 2013).

En comparación con otras tDCs, la estrategia utilizada para la generación de MPLA-tDCs, mediante la combinación de los agentes mencionados, induce la secreción de altos niveles de IL-10, de manera que se potencia su efecto tolerogénico y anti-inflamatorio; y se sustenta en el uso de compuestos que cumplen con las condiciones clínicas adecuadas para su potencial aplicación como terapia celular en humanos, como ocurre con el reemplazo del LPS por MPLA.

Ahora bien, para validar la utilización de las MPLA-tDCs como herramienta inmuno-terapéutica, es importante confirmar que son capaces de actuar en los diferentes niveles de una respuesta inmune, ya sea, dirigiendo la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia un perfil regulador, en respuesta a potenciales auto-antígenos; controlando el desarrollo de respuestas inmunes efectoras en el mismo escenario; e interviniendo en el despliegue de respuestas efectoras por parte de los linfocitos T de memoria.

En la literatura se han reportado diferentes estudios sobre los efectos de DCs tolerogénicas (tDCs) inmuno-moduladas con dexametasona sobre linfocitos T CD4+

vírgenes y de memoria (todos llevados a cabo utilizando poblaciones celulares alogénicas, esto es, provenientes de donantes distintos). Por un lado, se ha visto que estas tDCs son capaces de volver hipo-respondedoras a ambas sub-poblaciones de linfocitos T, frente a la re-estimulación con DCs maduras (mDCs) (Woltman y col., 2006); mientras que por otro lado, se ha estipulado que tDCs generadas con dexametasona sola o en combinación con vitamina D3 y LPS, son capaces de modular diferencialmente respuestas de linfocitos T CD4+ vírgenes y de memoria, induciendo la diferenciación de los primeros hacia un perfil regulador, productor de IL-10 (Unger y col., 2009; Anderson y col., 2008) y un estado de anergia en los segundos, en términos de proliferación y producción de citoquinas (Anderson y col., 2008).

En base a lo mencionado anteriormente, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos de células dendríticas tolerogénicas humanas inmuno-moduladas con dexametasona y activadas con MPLA (MPLA-tDCs) sobre respuestas antígeno-específicas de linfocitos T CD4+ vírgenes y de memoria, utilizando células provenientes de un mismo individuo (modelo autólogo).

El conocimiento adquirido permitirá establecer la efectividad de acción de las MPLA-tDCs sobre los diferentes niveles de una respuesta inmune, y de esta forma avanzar en la validación de su implementación como terapia celular en el tratamiento de enfermedades auto-inmunes mediadas por células T, como la artritis reumatoide.

Hipótesis

Células dendríticas humanas inmuno-moduladas con dexametasona y activadas con monofosforil lípido A (MPLA) poseen propiedades tolerogénicas y la capacidad de modular respuestas antígeno-específicas de linfocitos T CD4+ vírgenes y de memoria.

Objetivos

Objetivo General:

Estudiar los efectos de células dendríticas tolerogénicas humanas inmunomoduladas con dexametasona y activadas con MPLA sobre respuestas antígeno-específicas de linfocitos T CD4+ vírgenes y de memoria.

Objetivos Específicos:

- 1) Generar células dendríticas tolerogénicas activadas, mediante un tratamiento combinado con dexametasona y MPLA (MPLA-tDCs).
- 2) Estudiar los efectos de las MPLA-tDCs sobre respuestas antígeno-específicas de linfocitos T CD4+ de memoria, en cuanto a su capacidad proliferativa y patrón de citoquinas producidas.
- 3) Estudiar los efectos de las MPLA-tDCs sobre respuestas antígeno-específicas de linfocitos T CD4+ vírgenes, evaluando proliferación, el perfil de citoquinas secretadas y la expresión de moléculas características.

Materiales y Métodos

- Purificación de poblaciones celulares a partir de sangre periférica.

Muestras de concentrados leucocitarios (*buffy coats*) de donantes sanos fueron obtenidas desde el Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, previa firma de un consentimiento informado por parte de los individuos involucrados. Desde una misma muestra, se purificaron monocitos y células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Los monocitos fueron aislados por selección negativa, utilizando el *kit* de enriquecimiento *RosetteSep® Human Monocyte Enrichment Cocktail* (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) y un gradiente de densidad de Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, USA), de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante. La obtención de PBMC se llevó a cabo por medio de un gradiente de Ficoll-Paque, y a partir de esta población celular se purificaron linfocitos T vírgenes $CD4^+CD45RA^+RO^-$ o de memoria $CD4^+CD45RO^+RA^-$ según fuera necesario, utilizando el *kit* de aislamiento por selección magnética negativa *EasySep®* (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá), para linfocitos T $CD4^+$ vírgenes o de memoria, respectivamente. La pureza de las diferentes poblaciones celulares aisladas se evaluó por inmuno-tinción de moléculas de superficie características, con anticuerpos conjugados a los fluorocromos disponibles, para su posterior análisis por citometría de flujo. De esta manera, los monocitos purificados se tiñeron con anti-CD14 FITC, mientras que los linfocitos T $CD4^+$ vírgenes y de memoria, con anticuerpos anti-CD4 APC, anti-CD45RO FITC y anti-CD45RA PE.

- **Generación de células dendríticas.**

Para la generación de DCs humanas, a partir de la diferenciación *in vitro* de monocitos, se utilizó un protocolo de 5 días previamente estandarizado en el laboratorio (Fig. 4) (García-González y col., 2013). Monocitos aislados de sangre periférica se cultivaron ($2-3 \times 10^6$ células/mL) a 37°C y $5\% \text{CO}_2$ en medio AIM-V (GIBCO, USA) suplementado con rhGM-CSF y rhIL-4 (eBioscience, USA) a una concentración de 500 U/mL. Tras 3 días de cultivo, se realizó un cambio de medio y adición de citoquinas frescas. Para la generación de MPLA-tDCs, al tercer día las células fueron tratadas con dexametasona ($1 \mu\text{M}$, Sigma-Aldrich, USA) como agente inmuno-modulador, y al día 4 con MPLA ($1 \mu\text{g/mL}$, Avanti Polar Lipids Inc, USA) como agente de activación. Se utilizaron 3 controles: Células sin tratar (iDCs); células tratadas sólo con dexametasona (tDCs); y células tratadas sólo con MPLA (mDCs). Al quinto día de cultivo, las DCs generadas fueron cosechadas, lavadas con PBS1X y preparadas para análisis posteriores.

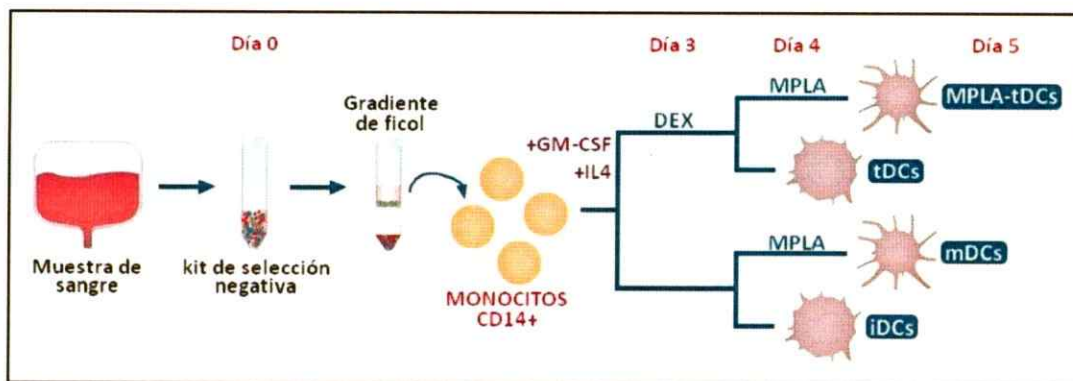


Figura 4. Protocolo de 5 días para la generación de células dendríticas (DCs). Monocitos purificados de sangre periférica se cultivaron en AIM-V en presencia de IL-4 y GM-CSF. Para la inducción de un perfil tolerogénico, se adicionó dexametasona al día 3 de cultivo, generando DCs tolerogénicas (tDCs). 24h después se agregó MPLA para la obtención de DCs maduras (mDCs) o tolerogénicas activadas (MPLA-tDCs). Como control, se dejaron DCs inmaduras sin tratar (iDCs).

- **Caracterización fenotípica de células dendríticas.**

La expresión de diversas moléculas de superficie, se evaluó por citometría de flujo. Para tales efectos, 2×10^5 DCs en 100 μ L de PBS1X 10% SFB se incubaron a 4°C durante 30 minutos con los anticuerpos de interés conjugados a los fluorocromos disponibles: anti-CD11c APC, anti-CD14 FITC, anti-CD40 PE, anti-CD80 FITC, anti-CD83 FITC, anti-CD86 PE, anti-MHC-II FITC (eBioscience, USA). Pasados los 30 minutos, las células se lavaron con PBS1X 3% SFB y se resuspendieron en buffer de fijación (eBioscience, USA) para su posterior análisis por citometría de flujo. Para la recolección de datos se utilizó el equipo FACSCalibur™ (Becton Dickinson, CA, EUA) y el software CELLQuest™, mientras que el análisis de datos se llevó a cabo con el programa Weasel. Por otro lado, también se evaluó la viabilidad celular de las DCs sometidas a distintos tratamientos, mediante una tinción de anexina V y 7-AAD (eBioscience, USA).

- **Evaluación de la capacidad endocítica de células dendríticas.**

A fin de evaluar la capacidad endocítica de las DCs generadas bajo distintos tratamientos, éstas fueron pulsadas con el péptido sintético dextran conjugado a FITC (40KDa, Molecular PROBES, Leiden Netherland) a una concentración de 1 mg/mL, por distintos períodos de tiempo (1/2, 1, 2 y 4 horas), en oscuridad y a 37°C. A su vez, para determinar la endocitosis no específica de dextran por parte de las DCs, como control negativo, otro grupo fue incubado a 4°C, en las mismas condiciones. Transcurrido el

tiempo de incubación, las células fueron lavadas con PBS1X frío y resuspendidas en buffer de fijación (eBioscience), para su posterior análisis por citometría de flujo.

- **Ensayos de proliferación antígeno-específicos.**

Para la realización de ensayos funcionales antígeno-específicos, al día 4 de generación de las DCs, éstas fueron pulsadas con PPD (Derivado proteico purificado de tuberculina, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), como fuente antigénica. En el caso de las células que recibirían un estímulo de maduración (MPLA-tDCs y mDCS), la adición del antígeno fue realizada 4 horas antes del tratamiento con MPLA (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Fig. 5). Al día 5, las DCs sin pulsar (como control) y pulsadas con PPD (3×10^4 células/ $100\mu\text{L}$), tras ser lavadas y resuspendidas en RPMI 10% suero AB, se co-cultivaron con linfocitos T CD4+ vírgenes o de memoria autólogos, previamente teñidos con la molécula fluorescente CFSE a una concentración de $5\mu\text{M}$ (Sigma-Aldrich), en una relación DCs/LT de 1:10 o 1:5 respectivamente, a 37°C y $5\%\text{CO}_2$, por 6 días (Fig. 5). Como control positivo de proliferación 2×10^5 linfocitos T CD4+/ $100\mu\text{L}$ se estimularon con anti-CD3 (clon OKT3, eBioscience); y como control negativo, se dejaron linfocitos T CD4+ sin estimular, incubados sólo en presencia de medio de cultivo. Al sexto día de co-cultivo, se recuperaron las células y se tiñeron con anti-CD4 PE (eBioscience), siguiendo el protocolo de tinción extracelular detallado anteriormente. El análisis de proliferación se realizó por citometría de flujo, evaluando la dilución de CFSE en linfocitos T CD4+. A su vez, se evaluó la viabilidad celular de los linfocitos, por medio de una tinción combinada de anexina V y 7-AAD (eBioscience).

- **Evaluación del perfil de producción de citoquinas de linfocitos T CD4+ co-cultivados con células dendríticas.**

Para la detección de citoquinas intracelulares producidas por los linfocitos T CD4+, tras 6 días de co-cultivo con las DCs, se estimularon con PMA (Sigma-Aldrich) (50 ng/mL) e ionomicina (Sigma-Aldrich) (1 µg/mL) y se trataron con brefeldina A (eBioscience) (1 µl/ mL) durante 5 horas, a 37°C, dejando como control células tratadas sólo con brefeldina A. Transcurridas las 5 horas, se recuperaron las células y se tiñeron extracelularmente con anti-CD4 PE (eBioscience, USA), tal como se mencionó anteriormente. A continuación se procedió a realizar la tinción intracelular; para tales efectos, las células se resuspendieron en buffer *fixation/permeabilization* (eBioscience) y se incubaron a 4°C por 30 minutos, en oscuridad. Pasado este tiempo, se lavaron con buffer *permwash* (eBioscience) y se realizó la tinción intracelular con los anticuerpos de interés conjugados a los fluorocromos disponibles: anti-IFNγ PE-Cy7 y anti-IL-17 APC, por 30 minutos a 4°C. Una vez cumplido el tiempo de incubación, las células se lavaron con buffer *permwash* y se resuspendieron en buffer FACS (eBioscience, USA) para su posterior análisis por citometría de flujo.

Por otro lado, la detección de IL-10 secretada se determinó mediante ensayos de ELISA tipo sándwich (eBioscience, EUA) de los sobrenadantes recolectados de los co-cultivos al día 6, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. La recolección de datos se llevó a cabo utilizando el lector de ELISA 3550 BioRad (Bedford, MA, USA).

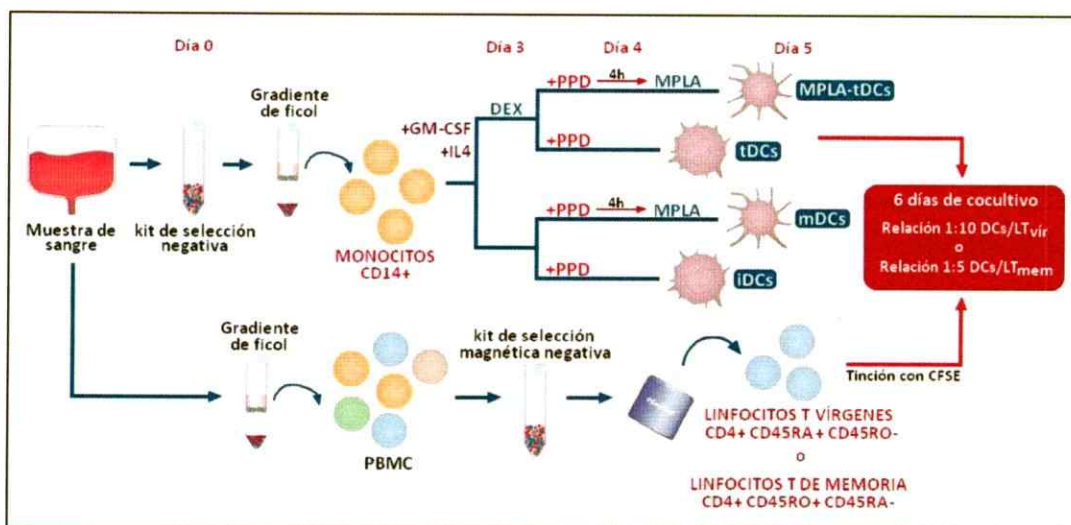


Figura 5. Co-cultivo autólogo de linfocitos T CD4+ y células dendríticas (DCs). DCs generadas a partir de monocitos, y sometidas a distintos tratamientos, fueron pulsadas con PPD y co-cultivadas con linfocitos T CD4+ vírgenes o de memoria aislados de PBMC del mismo donante.

- **Ensayos de re-estimulación de linfocitos T.**

Se realizaron co-cultivos de linfocitos T CD4+ vírgenes y de memoria sin ser teñidos con CFSE, con DCs sometidas a los distintos tratamientos (iDCs, tDCs, MPLA-tDCs y mDCs). A fin de evaluar los efectos funcionales de este primer encuentro de las DCs sobre las células T, se recuperaron los linfocitos del co-cultivo primario, se lavaron con medio de cultivo, se tiñeron con CFSE (5µM), y se re-estimularon con mDCs del mismo donante pulsadas con PPD (Fig. 6), en una relación DCs/LT 1:10 para el caso de los linfocitos T CD4+ vírgenes, y 1:5 para los de memoria, por 4 días a 37°C y 5%CO₂. En el caso de los linfocitos T CD4+ vírgenes, en paralelo la re-estimulación se realizó de manera policlonal utilizando anti-CD3 (clon OKT3, eBioscience), en ausencia de DCs. Al cuarto día de co-cultivo, se estimularon las células con PMA/ionomicina junto a un tratamiento con brefeldina A durante 5 horas, de tal forma de evaluar la producción de

IFN γ por tinción intracelular. A su vez, para la detección de IL-10 secretada se realizaron ensayos de ELISA tipo sándwich (eBioscience, EUA) de los sobrenadantes recolectados de los co-cultivos al día 4, tal como se mencionó anteriormente.

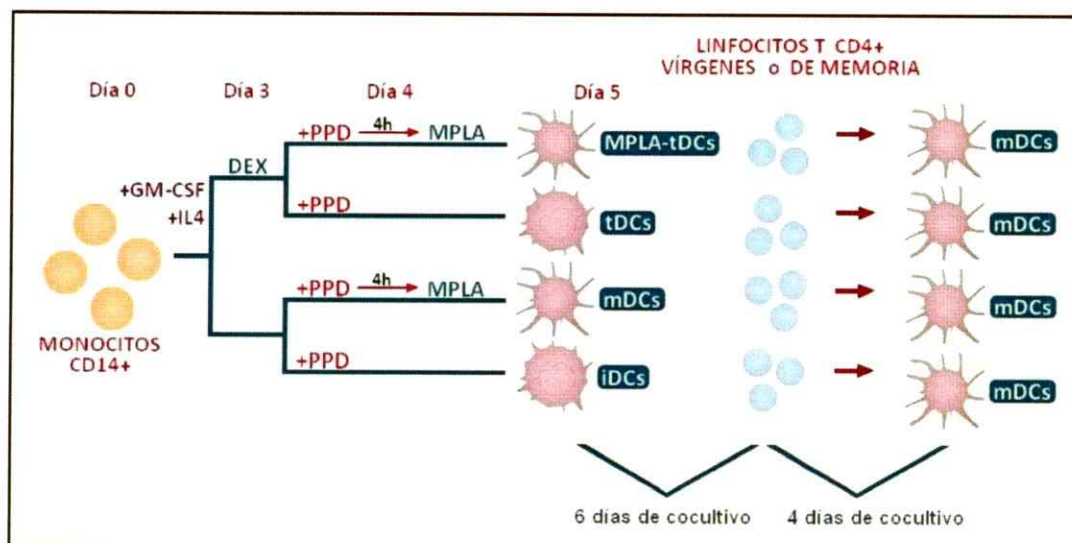


Figura 6. Ensayo de re-estimulación de linfocitos T CD4+. Células dendríticas (DCs) generadas a partir de monocitos, y sometidas a distintos tratamientos, fueron pulsadas con PPD y co-cultivadas con linfocitos T CD4+ vírgenes o de memoria aislados del mismo donante. Para ensayos de re-estimulación, se recuperaron estos linfocitos, se lavaron y se co-cultivaron con DCs maduras autólogas pulsadas con PPD.

- **Evaluación de la presencia de poblaciones T reguladoras en el co-cultivo.**

Para la evaluación de la presencia de poblaciones T reguladoras en cultivo, al cuarto día de re-estimulación con mDCs pulsadas con PPD, se recuperaron las células y se tiñeron extracelularmente con anti-CD4 FITC e intracelularmente usando anti-FoxP3 PE, de acuerdo a los protocolos previamente descritos. A su vez, se realizaron análisis complementarios del fenotipo regulador de las poblaciones en estudio, en base a los ensayos de ELISA de IL-10 llevados a cabo sobre los sobrenadantes de lo co-cultivos.



- **Análisis estadísticos.**

Los datos se procesaron en el software Graphpad Prism versión 5.01 (San Diego, CA, USA) para Windows. Para el análisis estadístico y la determinación de significancia entre las distintas condiciones en estudio, se utilizó el test de ANOVA de una vía con Tukey como post-test, considerando los valores * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ como significativos.

Resultados

- Purificación de poblaciones celulares a partir de sangre periférica.

Para la purificación de distintas poblaciones celulares a partir de una misma muestra de sangre, un tercio de ésta se destinó para monocitos y el resto para PBMC, del cual posteriormente se purificaron linfocitos T CD4+ vírgenes o de memoria, según fuese necesario. Por citometría de flujo, se pudo determinar el porcentaje de pureza de cada población aislada: En el caso de los monocitos, dicho valor se obtuvo en base al nivel de expresión del marcador de linaje CD14, y resultó ser >75%; mientras que para linfocitos T vírgenes CD4+CD45RA+CD45RO- y de memoria CD4+CD45RO+CD45RA-, alcanzó valores >94% y >90% respectivamente (Fig. 7)

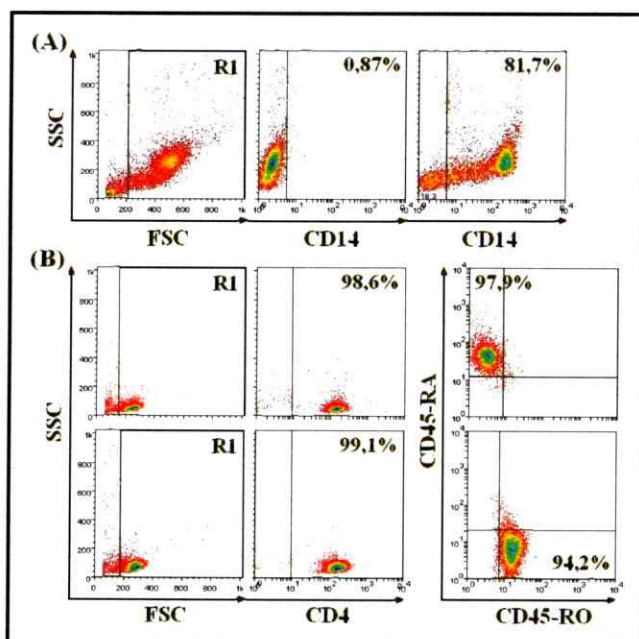


Figura 7. Evaluación de la pureza de monocitos, linfocitos T CD4+ vírgenes y de memoria aislados desde sangre periférica. En todos los casos, por tamaño (FSC) y granularidad (SSC) se seleccionó la población de células vivas (R1) para análisis consecutivos. En (A) se aplicó el control FMO para la fijación del cuadrante y se evaluó la pureza de la población de monocitos en base a la expresión de CD14. En (B) el porcentaje de pureza de linfocitos T vírgenes (fila superior) y de memoria (fila inferior) se obtuvo por medio del producto del porcentaje de células CD4+ y el

de células CD45RA+/RO- o CD45RA-/RO+, respectivamente. En la figura, se muestran imágenes representativas de 10 experimentos independientes.

- **Generación de células dendríticas (DCs).**

La generación de DCs se llevó a cabo siguiendo el protocolo de 5 días previamente descrito en la sección de materiales y métodos, a partir de la diferenciación *in vitro* de monocitos purificados desde sangre periférica.

Se trabajó con el grupo de interés de DCs tolerogénicas activadas, moduladas con dexametasona al día 3 y activadas con MPLA al día 4 de cultivo (MPLA-tDCs), y 3 grupos controles: DCs inmaduras, sin tratar (iDCs); DCs tolerogénicas, tratadas sólo con dexametasona (tDCs); y DCs maduras, estimuladas con MPLA (mDCs).

La cosecha de las células al día 5 se llevó a cabo mecánicamente, con un pipeteo suave y reiterado con el medio de cultivo, sobre las células adheridas. En esta instancia, se pudo apreciar que tanto las iDCs como las tDCs se encontraban más adheridas a la superficie de la placa, lo que hizo más compleja su cosecha. Por el contrario, resultó más sencillo despegar las mDCs y las MPLA-tDCs.

Ahora bien, pese a los diversos niveles de dificultad a la hora de cosechar las células, el rendimiento de recuperación de DCs al término del cultivo, expresado como porcentaje de DCs obtenidas en relación al número de monocitos cultivados al día 0, no varió significativamente entre las distintas condiciones en estudio (Fig. 8A).

Tras la cosecha de las células, se evaluó viabilidad celular por citometría de flujo, utilizando un marcaje combinado de anexina V y 7-AAD (Fig. 8C). De esta manera, se determinó que independiente del tratamiento al que fueran sometidas las DCs no se ve afectada significativamente su tasa de supervivencia (Fig. 8B).

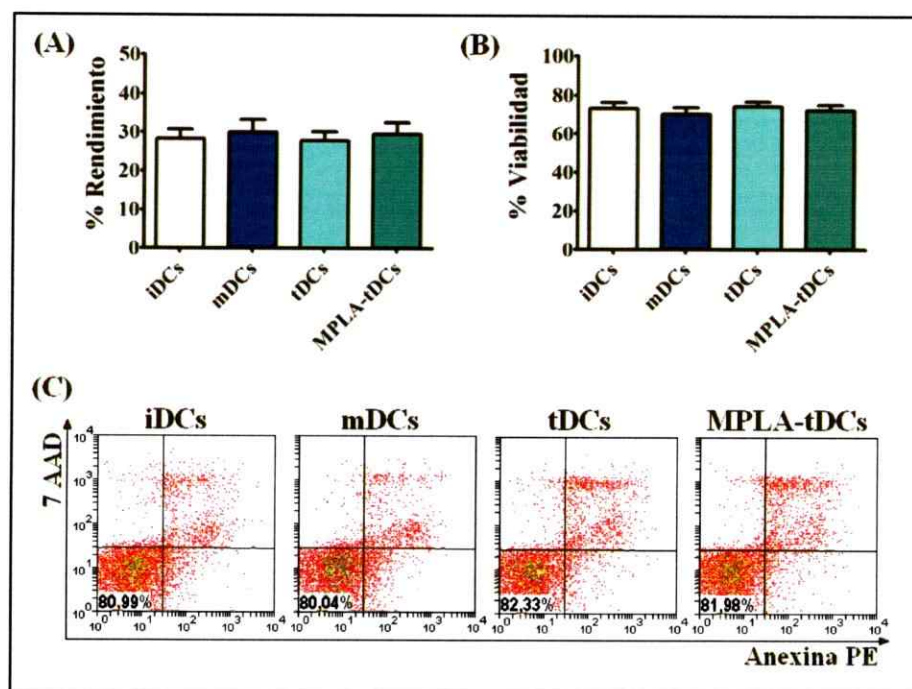


Figura 8. Rendimiento y viabilidad de los diferentes tipos de células dendríticas (DCs) generadas a partir de monocitos de sangre periférica. En la figura se muestra (A) el rendimiento de recuperación de las DCs generadas bajo distintos tratamientos, expresado como el porcentaje de células cosechadas al día 5 de cultivo en relación al número inicial de monocitos cultivados por condición (mean \pm SEM) (n=10); (B) el porcentaje de viabilidad celular al día 5 de cultivo, expresado como porcentaje de células dobles negativas para anexina V y 7-AAD (mean \pm SEM) (n=5); y (C) una imagen representativa del ensayo de viabilidad de un total de 5 experimentos independientes.

Para la evaluación fenotípica de las células obtenidas al quinto día de cultivo, se utilizó un microscopio óptico. Se evidenciaron diferencias morfológicas entre los distintos tipos de DCs, de manera que mientras las iDCs y tDCs exhibieron un fenotipo redondeado, las MPLA-tDCs y mDCs presentaron una morfología más alargada, con prolongaciones más definidas en el segundo caso (Fig. 9).

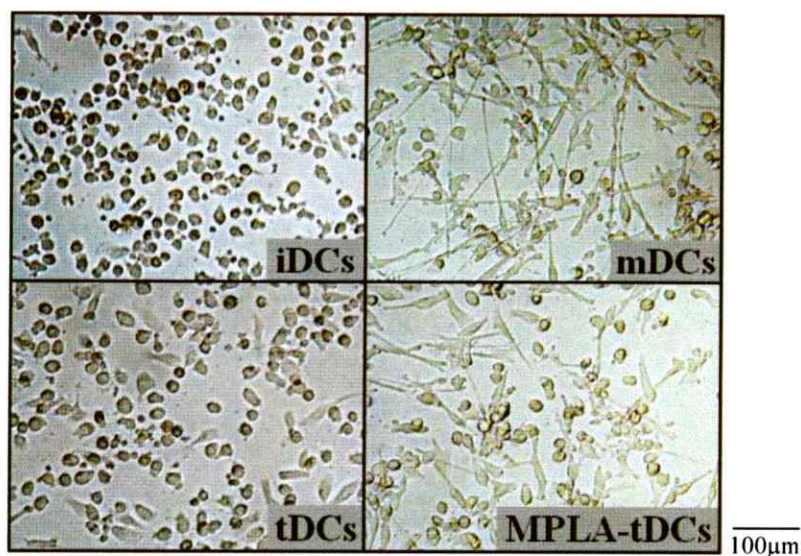


Figura 9. Morfología de los diferentes tipos de células dendríticas (DCs) generadas a partir de monocitos de sangre periférica. Al día 5 de cultivo se evaluó la morfología celular de las DCs sometidas a distintos tratamientos, usando un microscopio óptico. En la figura se muestran fotografías representativas de cada condición.

Para verificar que efectivamente se estaba consiguiendo la diferenciación de monocitos en DCs, por citometría de flujo se evaluó el fenotipo y la expresión de los marcadores de superficie CD11c, CD1a y CD14 al día 0 y 5 de cultivo (Fig. 10).

Como se puede observar en la figura 10, se evidenciaron diferencias claras de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) entre la población celular dispuesta al inicio del cultivo, y la obtenida al final de éste. A su vez, los análisis fenotípicos revelaron que al día 0, los monocitos expresan altos niveles de CD14 y CD11c, y muy bajos de CD1a; mientras que al quinto día, independiente del tratamiento al que fuesen sometidas las DCs, presentan altos niveles de CD11c y CD1a y una pérdida en la expresión de CD14. Bajo este contexto, si bien las tDCs y las MPLA-tDCs expresan un poco más de CD14 y

un poco menos de CD1a que las iDCs y mDCs, las diferencias no son significativas entre ellas, pero si con respecto a los monocitos ($p < 0,001$ y $p < 0,01$ respectivamente).

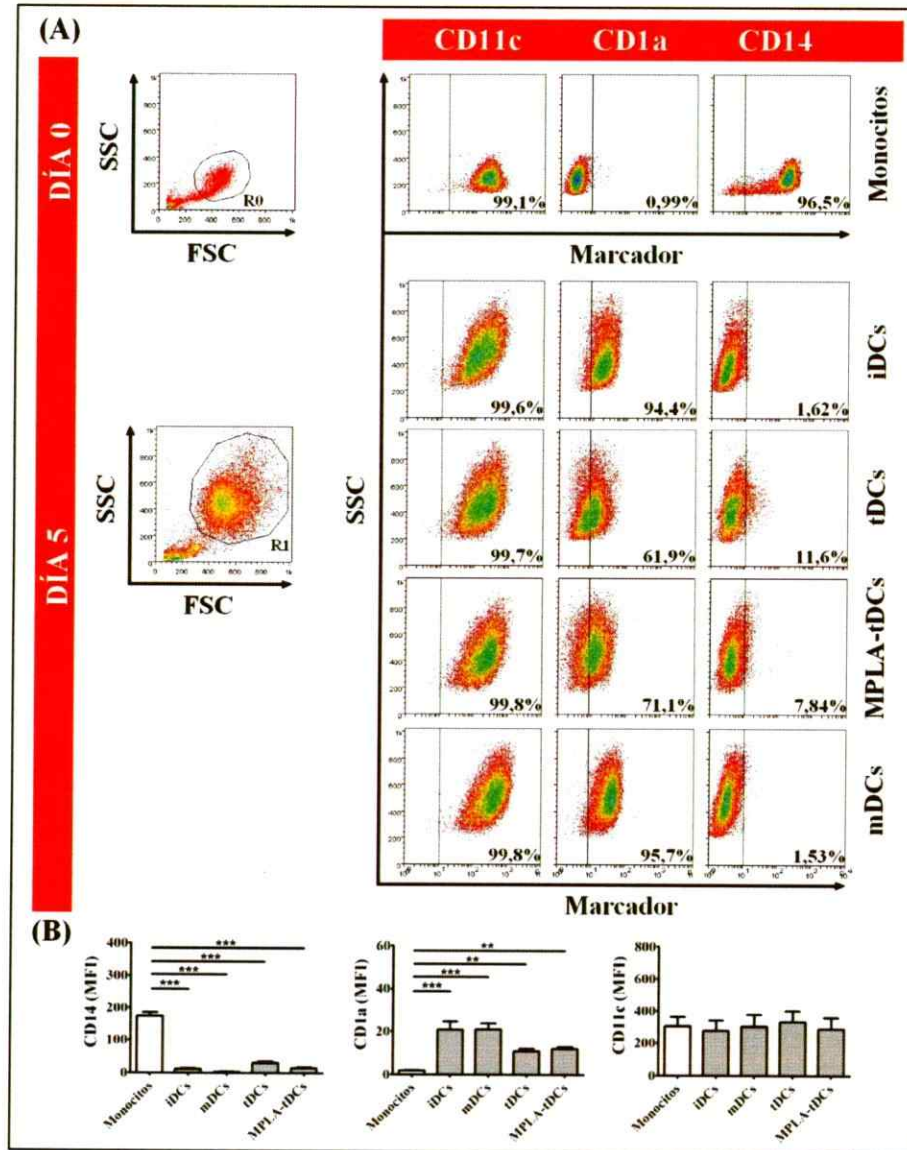


Figura 10. Evaluación de la diferenciación de monocitos en células dendríticas (DCs) tras 5 días de cultivo. (A) “Density plots” representativas de SSC y FSC (izquierda) y de la expresión de CD11c, CD1a y CD14 (derecha) de monocitos y DCs generadas bajo distintos tratamientos. (B) Intensidad de fluorescencia media (MFI) para CD14, CD1a y CD11c (n=8). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

- **Caracterización fenotípica de células dendríticas.**

Para la caracterización fenotípica de los distintos grupos de DCs en estudio, se evaluó por citometría de flujo la expresión de distintos marcadores de superficie: CD80, CD86, CD40, CD83 y MHC-II; usando como parámetro de medición la intensidad de fluorescencia media (MFI) (Fig. 11).

En cuanto a la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, y de la molécula activadora CD40, se pudo observar que si bien las MPLA-tDCs presentan niveles más altos que las iDCs y las tDCs, en todos los casos, esta diferencia no es significativa. Sin embargo, en comparación a las mDCs los niveles de expresión de dichas moléculas son ampliamente más bajos ($p < 0,05$ para CD80 y CD40; y $p < 0,001$ para CD86).

De la misma manera, la expresión del marcador de maduración CD83 en las MPLA-tDCs resultó ser mayor que en las iDCs y las tDCs y significativamente menor que en las mDCs ($p < 0,001$), dando cuenta de un fenotipo semi-maduro.

Por otro lado, se observó que la activación con MPLA de las DCs tratadas con dexametasona (MPLA-tDCs), implicó un aumento significativo en la expresión del MHC de tipo II en relación a las no activadas (tDCs) ($p < 0,05$), a un nivel similar al presentado por las mDCs.

En conjunto, esta información da cuenta que el patrón de marcadores celulares exhibido por las tDCs corresponde a un estadio inmaduro en la diferenciación fenotípica, mientras que el presentado por las MPLA-tDCs es concordante con un estado de transición entre un estadio inmaduro y maduro.

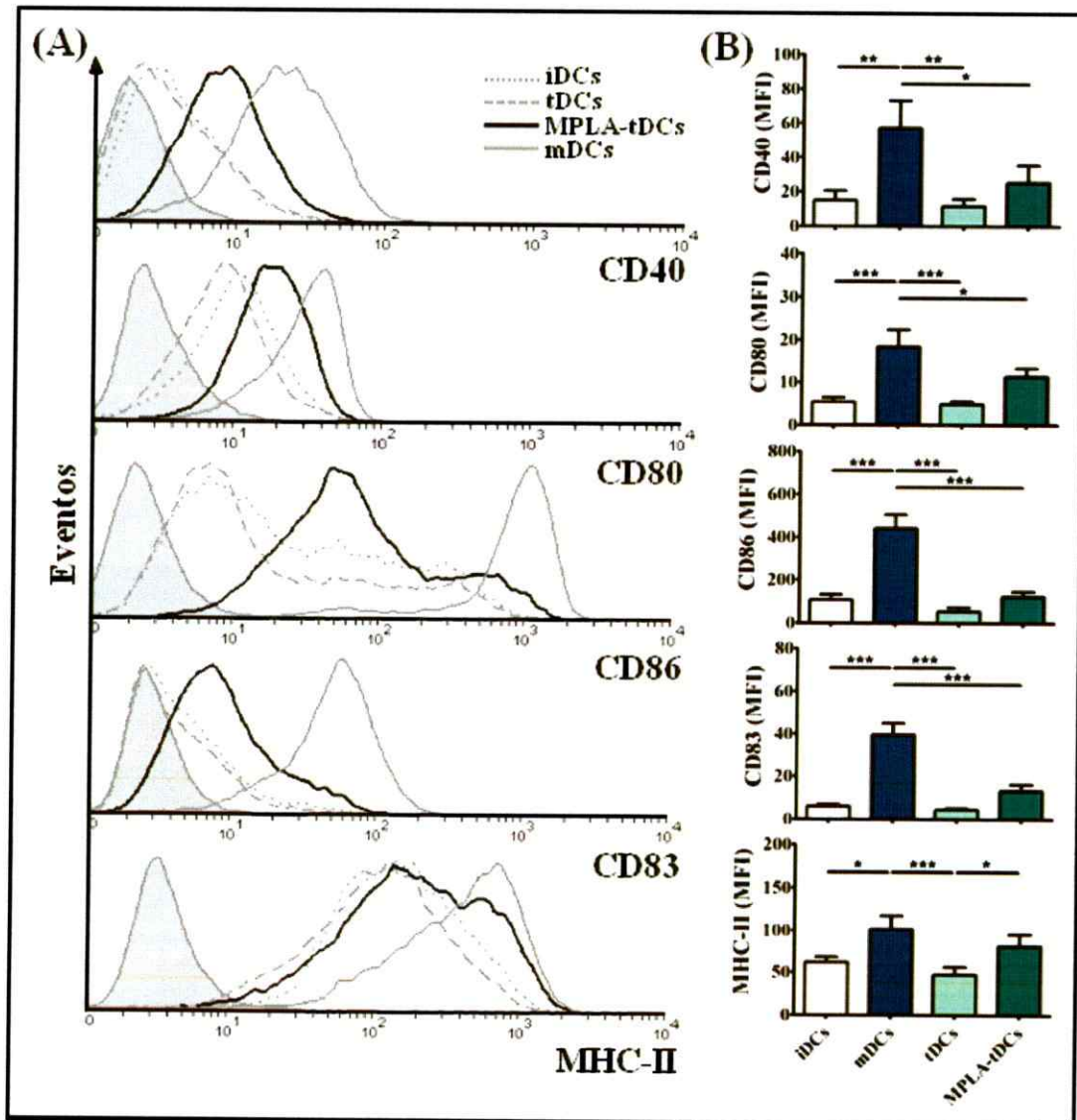


Figura 11. Caracterización fenotípica de los diferentes tipos de células dendríticas (DCs) generadas a partir de monocitos de sangre periférica al día 5 de cultivo. (A) Histogramas representativos para los marcadores de superficie analizados para las 4 condiciones de DCs en estudio. La curva gris corresponde al control de isotipo en cada caso. (B) Intensidad de fluorescencia media (MFI) \pm desviación estándar para cada marcador analizado (n = 6) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$).**

- **Evaluación de la capacidad endocítica de células dendríticas.**

Se determinó la capacidad de los distintos tipos de DCs generadas para endocitar el antígeno sintético Dextran-FITC a través de citometría de flujo. Para tales efectos se incubaron las células con el antígeno a 37°C por distintos periodos de tiempo, y a 4°C como control para cuantificar la endocitosis inespecífica. El valor obtenido como unión no específica fue restado a los valores obtenidos a 37°C.

Como se observa en la figura 12 tanto las iDCs como las tDCs tienen una elevada capacidad endocítica que se acentúa al incrementar el tiempo de incubación con el antígeno. Ahora bien, cuando las células son activadas con MPLA (mDCs y MPLA-tDCs) esta capacidad disminuye significativamente.

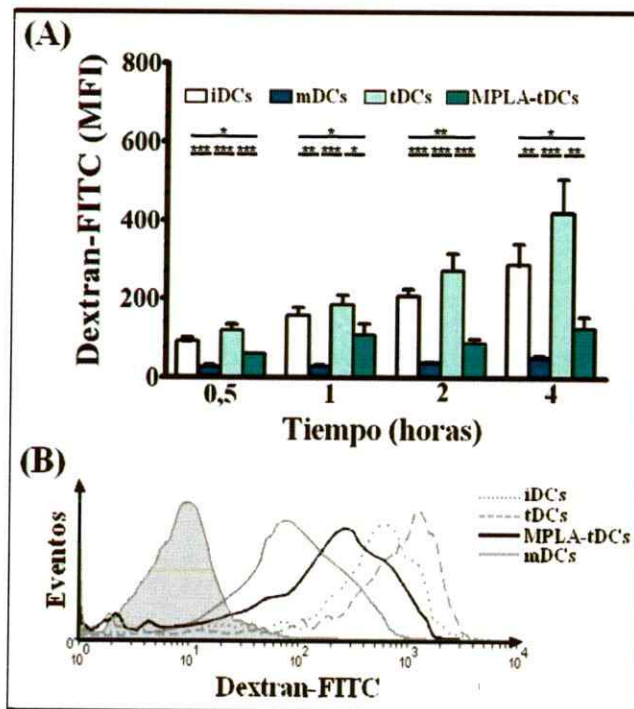


Figura 12. Evaluación de la capacidad endocítica de los diferentes tipos de células dendríticas (DCs) generadas desde monocitos de sangre periférica. (A) Intensidad de fluorescencia media (MFI) \pm desviación estándar de la expresión de dextran-FITC evaluada en las DCs en estudio a los 30 minutos, 1, 2 y 4 horas de incubación ($n = 3$) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

(B) Histograma representativo para la expresión de dextran-FITC evaluada a las 4 horas de incubación. La curva gris corresponde al control negativo de endocitosis (incubación de las células a 4°C).

- **Ensayos de proliferación antígeno-específicos.**

Previamente se había establecido con ensayos de alo-proliferación, que las MPLA-tDCs poseen una capacidad reducida para inducir la proliferación de linfocitos T CD4+, en comparación a las mDCs; lo cual se replicó de manera antígeno-específica en co-cultivos autólogos de MPLA-tDCs pulsadas con PPD y linfocitos T CD4+ totales (García-González y col., 2013).

Ahora bien, a fin de evaluar de qué manera la activación de las DCs tolerogénicas afecta su capacidad de estimular linfocitos T CD4+ vírgenes y de memoria, se realizaron co-cultivos autólogos de MPLA-tDCs pulsadas con PPD y las poblaciones linfocitarias de interés teñidas con CFSE, utilizando iDCs, tDCs y mDCs como controles y DCs sin pulsar como control de proliferación, de acuerdo a la metodología previamente descrita.

Como se observa en la figura 13B, cuando los linfocitos T CD4+ de memoria son co-cultivados con DCs que no han sido pulsadas con el antígeno, no proliferan. Cuando estos linfocitos son co-cultivados con tDCs o MPLA-tDCs pulsadas con PPD, su respuesta proliferativa antígeno-específica se ve significativamente reducida en comparación a lo que ocurre con las mDCs ($p < 0,001$).

A fin de dilucidar si la baja tasa de proliferación observada estaba relacionada con la muerte celular de los linfocitos en cultivo, por citometría de flujo se evaluó su viabilidad al día 5 de co-cultivo, mediante una tinción combinada de anexina V y 7-AAD (Fig. 13D). Con esto, se estableció que independiente del tratamiento que recibieran las DCs, al ser co-cultivadas con los linfocitos T CD4+ de memoria no afectan su tasa de sobrevivencia de manera significativa.

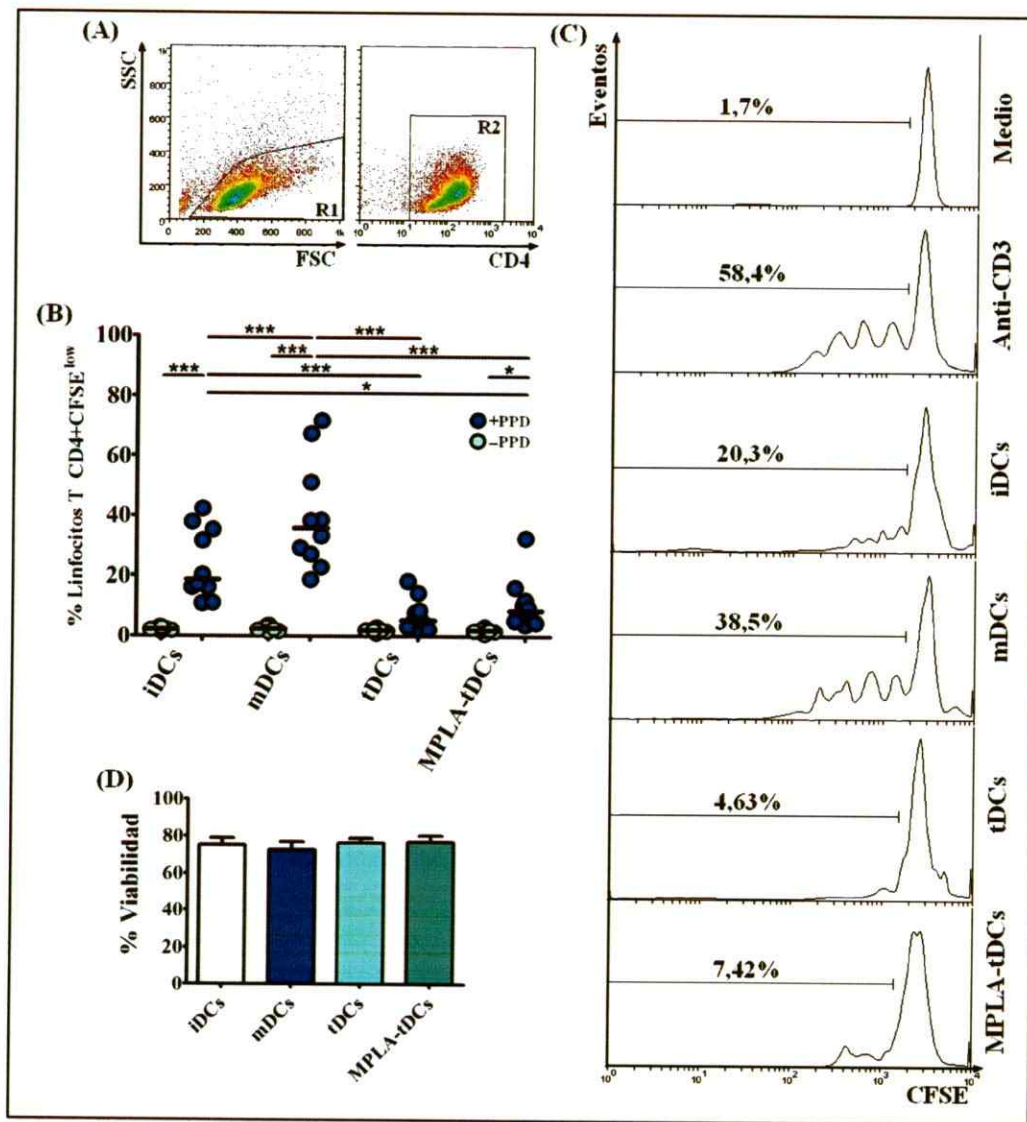


Figura 13. Evaluación de la capacidad de los diferentes tipos de células dendríticas (DCs) generadas a partir de monocitos de sangre periférica de estimular la proliferación antígeno-específica de linfocitos T CD4+ de memoria. (A) La población de interés se seleccionó en función de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) (R1) y de la expresión de CD4 (R2) (B) Proliferación de linfocitos T de memoria co-cultivados con DCs pulsadas con PPD, expresada como porcentaje de células CD4+CFSE^{low}. Como control se co-cultivaron linfocitos con DCs sin pulsar con el antígeno (n=10) (*p<0,05; ***p<0,001). (C) Histogramas representativos de los ensayos de proliferación. Como controles, se usaron linfocitos cultivados solos o en presencia de anti-CD3. (D) Viabilidad de los linfocitos al día 5 de cultivo, expresado como porcentaje de células dobles negativas para anexina V y 7-AAD (mean ± SEM) (n=4).

Por otro lado, como se observa en la figura 14, no se evidenciaron respuestas proliferativas cuando los linfocitos T CD4+ vírgenes fueron co-cultivados con las DCs sometidas a distintos tratamientos pulsadas o no con el antígeno, por 5, 6, 7 y 8 días.

Por citometría de flujo se evaluó la viabilidad mediante una tinción combinada de anexina V y 7-AAD (Fig. 15), y se descartó que la falta de proliferación estuviese relacionada con la muerte celular de los linfocitos en cultivo.

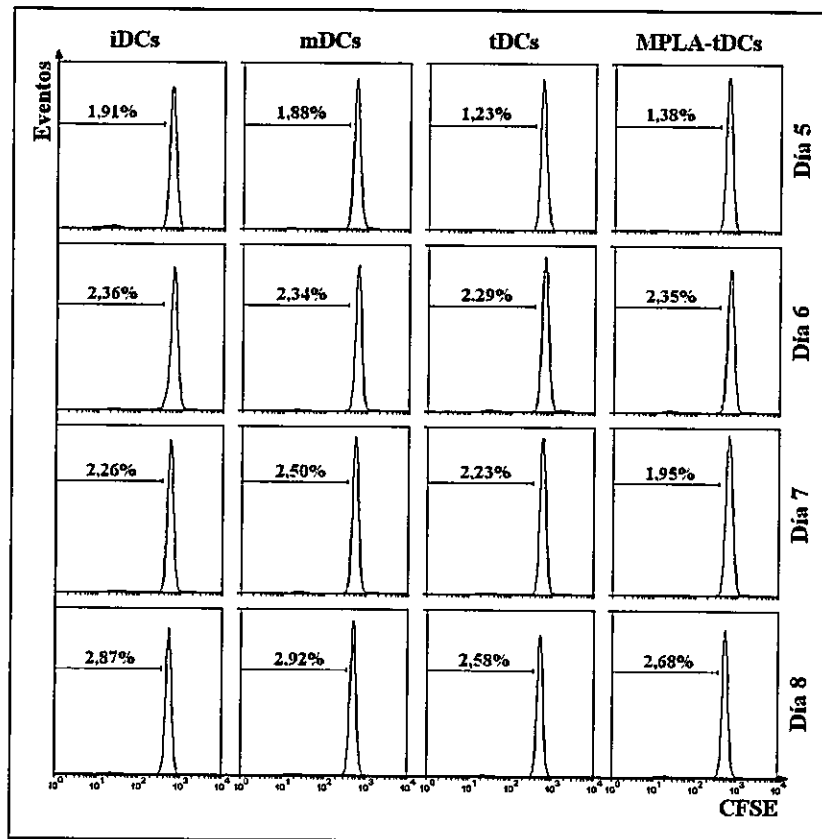


Figura 14. Evaluación de la capacidad de los diferentes tipos de células dendríticas (DCs) generadas a partir de monocitos de sangre periférica de estimular la proliferación antígeno-específica de linfocitos T CD4+ vírgenes. Histogramas representativos de 3 ensayos de proliferación de linfocitos T vírgenes co-cultivados con DCs pulsadas con PPD durante 5, 6, 7 y 8 días de cultivo.

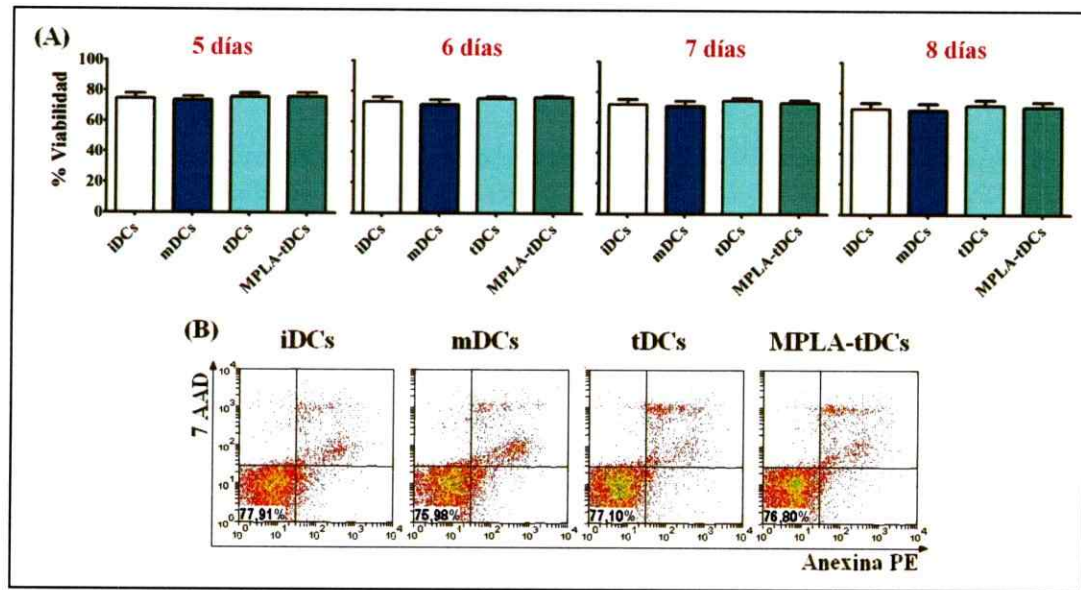


Figura 15. Evaluación de la viabilidad de los linfocitos T CD4+ vírgenes co-cultivados con los distintos tipos de células dendríticas (DCs). (A) Viabilidad de los linfocitos T CD4+ vírgenes al ser co-cultivados con DCs pulsadas con PPD durante 5, 6, 7 y 8 días, expresado como porcentaje de células dobles negativas para anexina V y 7-AAD (mean \pm SEM) (n=3). (B) *Density plots* representativos del ensayo de viabilidad realizado a los 6 días de co-cultivo, de un total de 3 experimentos independientes.

- **Evaluación del perfil de producción de citoquinas de linfocitos T CD4+ co-cultivados con células dendríticas.**

La producción de citoquinas pro-inflamatorias (IFN γ e IL-17) por los linfocitos T de memoria CD4+ al ser co-cultivados con DCs generadas bajo distintos tratamientos, pulsadas con PPD, se analizó por tinción intracelular; mientras que el nivel de IL-10 presente en los sobrenadantes de los co-cultivos, se evaluó por ELISA.

Cuando los linfocitos T de memoria teñidos con CFSE se co-cultivaron con tDCs o MPLA-tDCs, el porcentaje de linfocitos T activamente proliferantes, productores de

IFN γ y de IL-17 resultó ser significativamente menor a cuando se realizó el co-cultivo con mDCs ($p < 0.01$) (Fig. 16A y 16B respectivamente).

En contraste, cuando se estudió la presencia de IL-10 en los sobrenadantes, se observaron niveles más altos de esta citoquina en co-cultivos de MPLA-tDCs y linfocitos T CD4+ de memoria, que en co-cultivos con tDCs o iDCs ($p < 0.05$) (Fig. 16C).

Estos resultados sugieren que las MPLA-tDCs son capaces de modular respuestas antígeno-específicas de linfocitos T CD4+ reduciendo su proliferación y polarizando su perfil de producción de citoquinas.

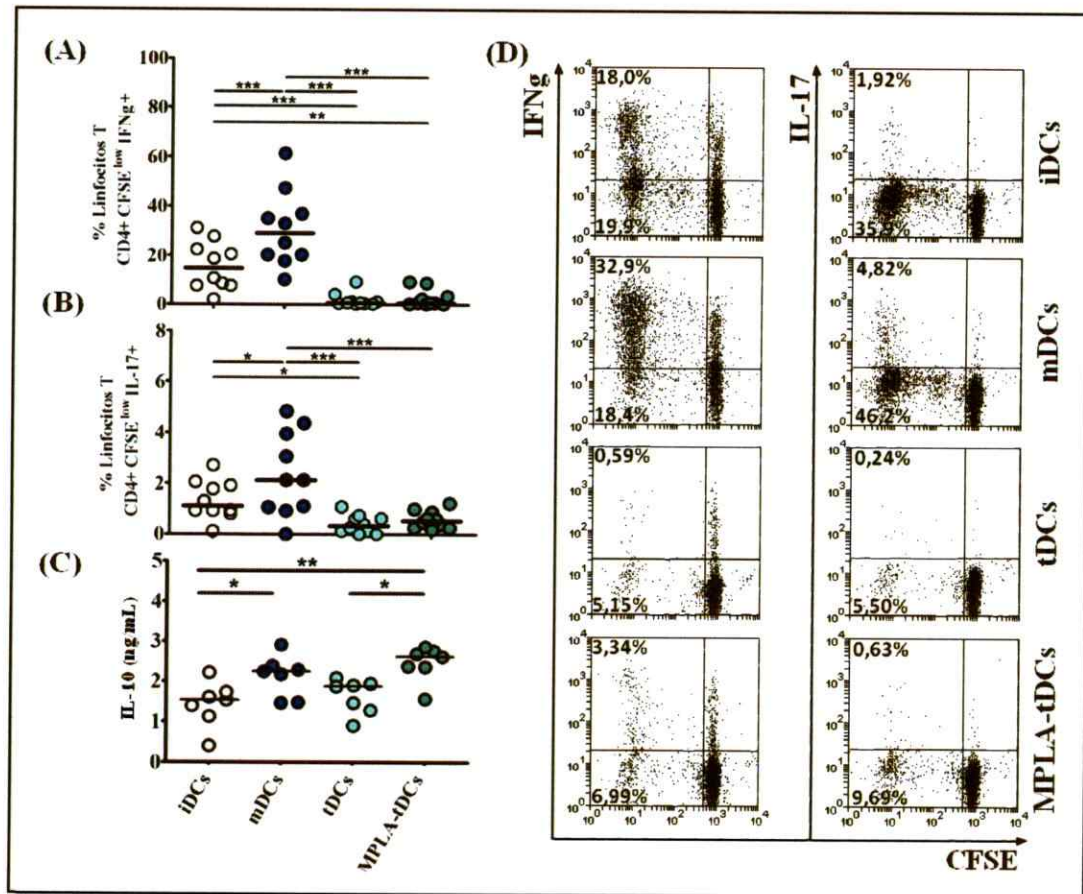


Figura 16. Evaluación del perfil de citoquinas producidas por linfocitos T CD4+ de memoria estimulados con diferentes tipos de células dendríticas (DCs) pulsadas con PPD. (A) Expresión de IFN γ de linfocitos T de memoria activamente proliferantes, expresado como porcentaje de células CD4+CFSE^{low}IFN γ + (n=10) (**p<0,01; ***p<0,001). (B) Expresión de IL-17 de linfocitos T de memoria activamente proliferantes, expresado como porcentaje de células CD4+CFSE^{low}IL17+ (n=10) (*p<0,05; ***p<0,001). (C) Concentración de IL-10 presente en los sobrenadantes de los co-cultivos (mean \pm SEM) (n=7) (*p<0,05; **p<0,01). (D) *Dot plots* representativos de la expresión de IFN γ e IL-17 de linfocitos T CD4+ de memoria teñidos con CFSE co-cultivados con DCs pulsadas con PPD.

En el caso de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes, no se detectó la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IFN γ e IL-17), en vista de que frente a un primer estímulo con los distintos tipos de DCs en estudio, pulsadas con PPD, no se observaron poblaciones de linfocitos T activamente proliferantes que pudiesen producir dichas citoquinas (Fig. 14). Ahora bien, de todas maneras, se evaluó por ELISA la presencia de IL-10 en los sobrenadantes de los co-cultivos, observándose altos niveles de esta citoquina en co-cultivos de tDCs o MPLA-tDCs y linfocitos T CD4⁺ vírgenes, en comparación a co-cultivos con iDCs o mDCs (Fig. 17).

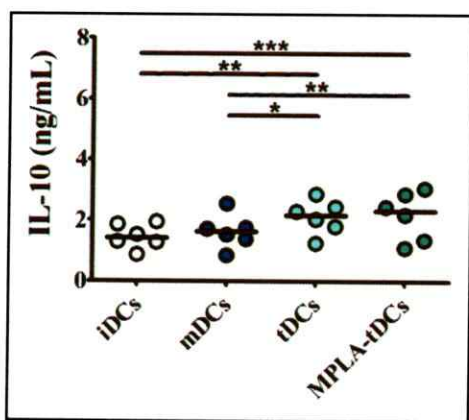


Figura 17. Concentración de IL-10 en los sobrenadantes de los co-cultivos de linfocitos T CD4⁺ vírgenes y los distintos tipos de células dendríticas (DCs). Niveles de IL-10 (ng/mL) detectados en co-cultivos de linfocitos T CD4⁺ vírgenes y DCs pulsadas con PPD, cuantificados mediante ensayos de ELISA realizados a los sobrenadantes en cuestión (mean \pm SEM) (n=6) (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).



- **Ensayos de re-estimulación de linfocitos T.**

Para ensayos de re-estimulación, se realizaron co-cultivos primarios de linfocitos T CD4+ sin teñir y DCs sometidas a distintos tratamientos, pulsadas con PPD, por 6 días. Al final del cultivo, se recuperaron los linfocitos por pipeteo suave, de manera de no despegar las DCs adheridas al fondo de la placa y quedarse sólo con los linfocitos T. A fin de corroborar la eficacia de este procedimiento, se realizó una tinción extracelular sobre la población recuperada, dirigida a los marcadores de superficie CD4 y CD11. De esta manera, se confirmó que las células recuperadas de la placa eran en su mayoría linfocitos T CD4+ (porcentaje de expresión de CD4+ mayor al 95% y de CD11c menor al 5%, figura S1). Con esta información, se procedió a marcar los linfocitos con CFSE y a re-estimularlos, con mDCs del mismo donante pulsadas con el antígeno de interés, o de manera policlonal con anti-CD3, según fuese el caso.

Estos ensayos se realizaron en primera instancia con linfocitos T CD4+ de memoria. Tal como se visualiza en la figura 18, linfocitos T de memoria previamente co-cultivados con tDCs se vuelven hipo-respondedores frente a un re-estímulo con mDCs, en términos de proliferación (Fig. 18A) y producción de citoquinas pro-inflamatorias como IFN γ (Fig. 18B), situación que se repite cuando son inicialmente estimulados con tDCs activadas (MPLA-tDCs). Estos resultados dan cuenta de que en un primer encuentro con DCs tolerogénicas (estén o no activadas), los linfocitos son afectados funcionalmente. A su vez, por ELISA se evaluó la presencia de IL-10 en los sobrenadantes de los co-cultivos, evidenciándose niveles superiores de esta citoquina en co-cultivos de linfocitos T CD4+ de memoria inicialmente co-cultivados con iDCs o

mDCs, y re-estimados con mDCs, en comparación a aquéllos co-cultivados en primera instancia con tDCs o MPLA-tDCs y re-estimados en las mismas condiciones (Fig. 18C).

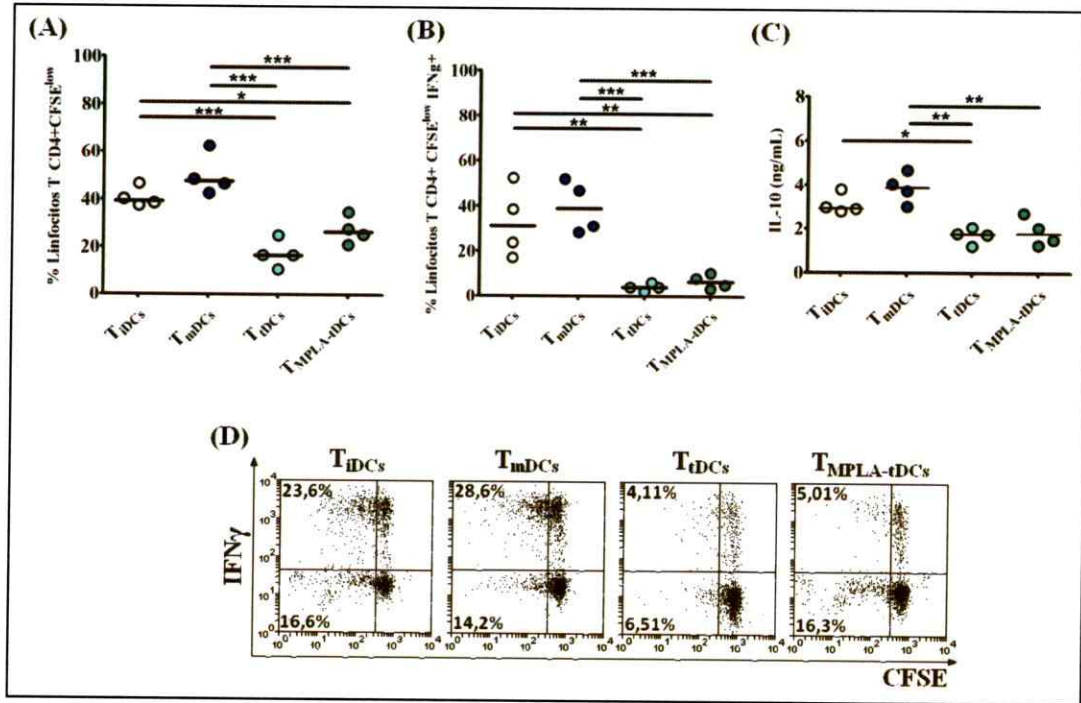


Figura 18. Evaluación del perfil proliferativo y de secreción de citoquinas de linfocitos T CD4⁺ de memoria re-estimados con DCs maduras (mDCs) pulsadas con PPD. (A) Proliferación de linfocitos T CD4⁺ de memoria inicialmente co-cultivados con los diferentes subtipos de DCs en estudio pulsadas con PPD, y re-estimados con mDCs del mismo donante, expresada como porcentaje de células CD4+CFSE^{low} (n=4) (*p<0,05; ***p<0,001). (B) Expresión de IFN γ de los linfocitos T de memoria CD4⁺ activamente proliferantes, expresado como porcentaje de células CD4+CFSE^{low}IFN γ ⁺ (n=4) (**p<0,01; ***p<0,001). (C) Concentración de IL-10 presente en los sobrenadantes de los co-cultivos de linfocitos T CD4⁺ de memoria y mDCs pulsadas con PPD, cuantificada por ensayos de ELISA (mean \pm SEM) (n=4) (*p<0,05; **p<0,01). (D) *Dot plots* representativos de la expresión de IFN γ por los linfocitos T CD4⁺ de memoria teñidos con CFSE, al ser re-estimados con mDCs.

Seguidamente se realizaron ensayos de re-estimulación de linfocitos T CD4+ vírgenes, en base a la misma estrategia ya descrita.

Tal como se visualiza en la figura 19, al co-cultivar mDCs (pulsadas con PPD) con linfocitos T CD4+ vírgenes previamente estimulados con tDCs y con MPLA-tDCs, se observa que estos responden con una baja tasa de proliferación (Fig. 19A) y producción de IFN γ (Fig. 19B), en comparación a lo que ocurre con aquéllos que inicialmente fueron estimulados con iDCs y mDCs.

Ahora bien, cuando linfocitos T CD4+ vírgenes previamente co-cultivados con los distintos tipos de DCs en estudio, son re-estimulados de manera policlonal (Fig. 20) no se observan diferencias significativas en términos de proliferación (Fig. 20A), pero se mantiene el mismo patrón de producción de IFN γ visualizado cuando el re-estímulo se realiza con mDCs (Fig. 20B).

Finalmente, por ELISA se evidenció que no existen diferencias significativas en los niveles de IL-10 presente en los sobrenadantes de los co-cultivos de mDCs y linfocitos T CD4+ vírgenes inicialmente estimulados con cualquiera de las DCs en estudio (Fig. 19C); situación que se repite cuando el re-estímulo es realizado de manera policlonal con anti-CD3 (Fig. 20C).

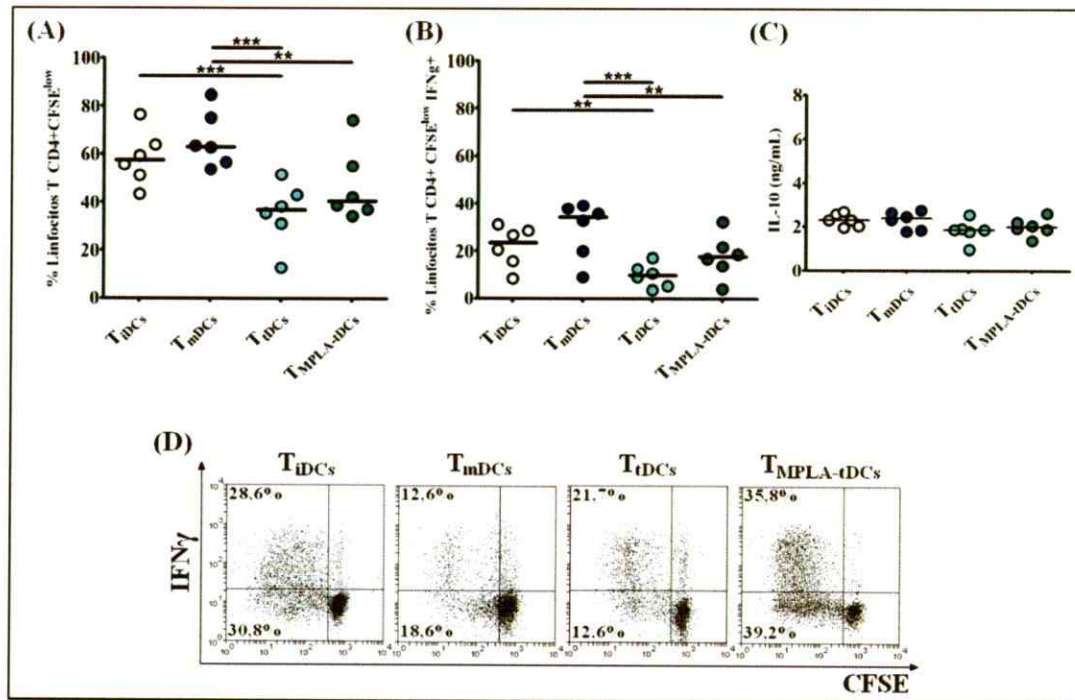


Figura 19. Evaluación del perfil proliferativo y de secreción de citoquinas de linfocitos T CD4+ vírgenes re-estimulados con DCs maduras (mDCs) pulsadas con PPD. (A) Proliferación de linfocitos T CD4+ vírgenes inicialmente co-cultivados con los diferentes subtipos de DCs en estudio pulsadas con PPD, y re-estimulados con mDCs del mismo donante, expresada como porcentaje de células CD4+CFSE^{low} (n=6) (**p<0,01; ***p<0,001). (B) Expresión de IFN γ de los linfocitos T CD4+ vírgenes activamente proliferantes, expresado como porcentaje de células CD4+CFSE^{low}IFN γ ⁺ (n=6) (**p<0,01; ***p<0,001). (C) Concentración de IL-10 presente en los sobrenadantes de los co-cultivos de linfocitos T CD4+ vírgenes y mDCs pulsadas con PPD, cuantificada por ensayos de ELISA (mean \pm SEM) (n=6). (D) *Dot plots* representativos de la expresión de IFN γ por los linfocitos T CD4+ vírgenes teñidos con CFSE al ser re-estimulados con mDCs.

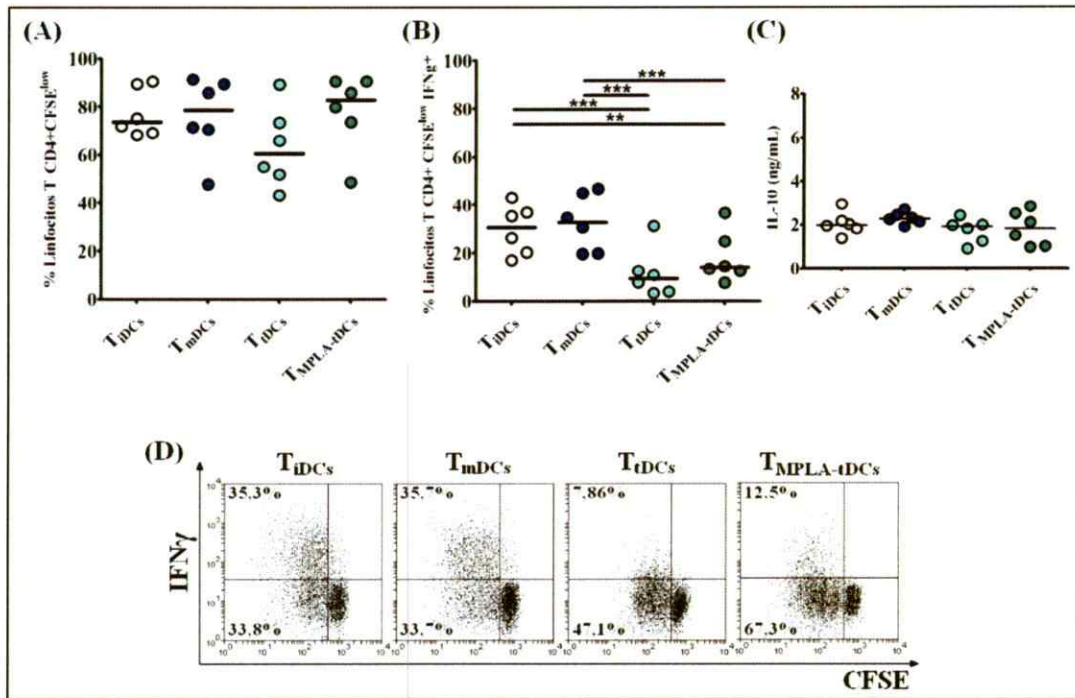


Figura 20. Evaluación del perfil proliferativo y de secreción de citoquinas de linfocitos T CD4+ vírgenes re-estimulados policlonalmente con anti-CD3. (A) Proliferación de linfocitos T CD4+ vírgenes inicialmente cocultivados con los diferentes subtipos de DCs en estudio pulsadas con PPD, y re-estimulados con anti-CD3, expresada como porcentaje de células CD4+CFSE^{low} (n=6) (**p<0,01; ***p<0,001). (B) Expresión de IFN γ de los linfocitos T CD4+ vírgenes activamente proliferantes, expresado como porcentaje de células CD4+CFSE^{low}IFN γ + (n=6) (**p<0,01; ***p<0,001). (C) Concentración de IL-10 presente en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos T CD4+ re-estimulados con anti-CD3, cuantificada por ensayos de ELISA (mean \pm SEM) (n=6). (D) *Dot plots* representativos de la expresión de IFN γ por los linfocitos T CD4+ vírgenes teñidos con CFSE al ser re-estimulados con anti-CD3.

- **Evaluación de la presencia de poblaciones T reguladoras.**

En el caso de los linfocitos T CD4⁺ de memoria, al cuarto día de co-cultivo secundario (linfocitos T de memoria inicialmente estimulados con los distintos tipos de DCs en estudio, y re-estimulados con mDCs pulsadas con PPD), fueron recuperados y teñidos extracelularmente con anti-CD4 FITC e intracelularmente usando anti-FoxP3 PE, de acuerdo a los protocolos previamente descritos. Como se observa en la figura 21, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de FoxP3 por los linfocitos T de memoria, independiente del tipo de DCs con el cual fuesen cultivados inicialmente.

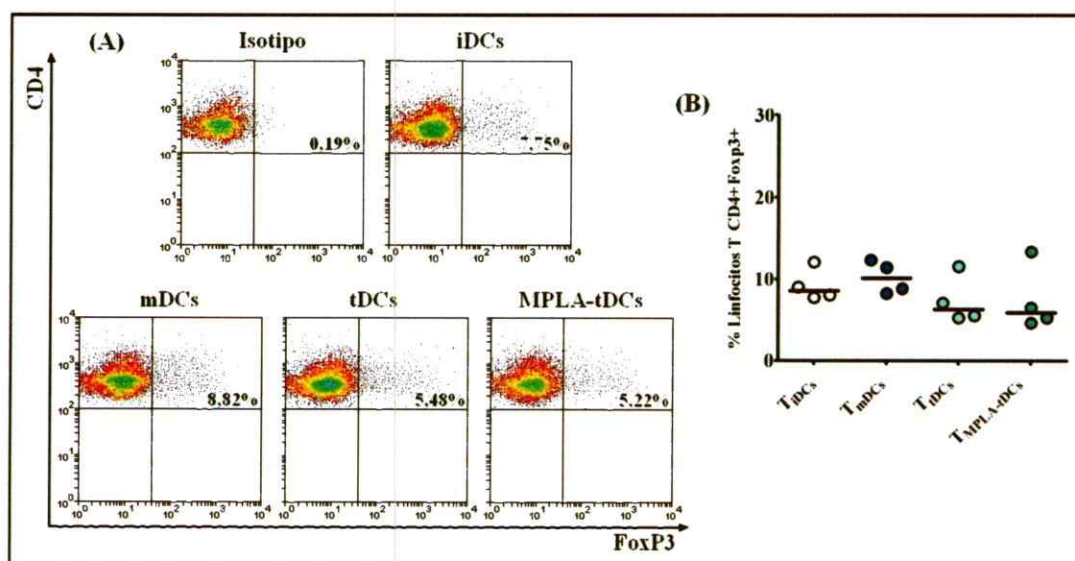


Figura 21. Evaluación de la presencia de células T reguladoras en co-cultivos autólogos de mDCs y linfocitos T CD4⁺ de memoria inicialmente estimulados con diferentes tipos de células dendríticas (DCs). (A) *Density plots* representativos de las poblaciones CD4⁺FoxP3⁺ presentes en co-cultivos de linfocitos T CD4⁺ de memoria previamente co-cultivados con los distintos subtipos de DCs en estudio, pulsadas con PPD y re-estimulados con mDCs. Como se observa en la figura, el cuadrante se definió en base al control de isotipo para FoxP3 (B) Porcentaje de linfocitos T CD4⁺FoxP3⁺ en cultivo (n=4).

En el caso de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes, al cuarto día de co-cultivo secundario (linfocitos T vírgenes inicialmente estimulados con los distintos tipos de DCs en estudio, y re-estimulados con mDCs pulsadas con PPD), se realizó la tinción extracelular con anti-CD4 FITC e intracelular con anti-FoxP3 PE, sin observar diferencias significativas en la presencia de poblaciones CD4⁺FoxP3⁺ en cultivo.

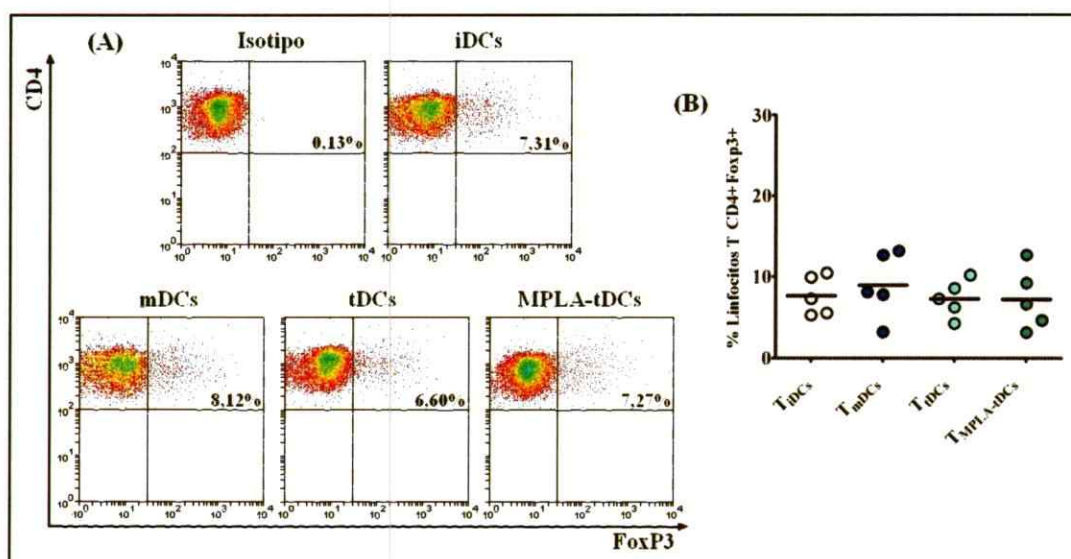


Figura 22. Evaluación de la presencia de células T reguladoras en co-cultivos autólogos de mDCs y linfocitos T CD4⁺ vírgenes inicialmente estimulados con diferentes tipos de células dendríticas (DCs). (A) *Density plots* representativos de las poblaciones CD4⁺FoxP3⁺ presentes en co-cultivos de linfocitos T CD4⁺ vírgenes previamente co-cultivados con los distintos subtipos de DCs en estudio pulsadas con PPD, y re-estimulados con mDCs. Como se observa en la figura, el cuadrante se definió en base al control de isotipo para FoxP3 (B) Porcentaje de linfocitos T CD4⁺ FoxP3⁺ en cultivo (n=5).

Discusión

Las DCs son actores fundamentales tanto en el inicio como en el control de una respuesta inmune. El desarrollo de estas funciones está relacionado con su estado de maduración, de manera que mientras las DCs inmaduras son consideradas tolerogénicas, las maduras son, por el contrario, inmunogénicas.

En la actualidad ha incrementado el interés por explorar las DCs tolerogénicas (tDCs) con fines biomédicos, desarrollándose diferentes protocolos para su generación y estudio, ya sea por modulación farmacológica, modificación genética o tratamientos con citoquinas anti-inflamatorias. A su vez, se ha incluido la “activación alternativa” como nueva aproximación, en la cual DCs tratadas inicialmente con agentes inmunosupresores son sometidas a un estímulo de maduración, a fin de mejorar su capacidad presentadora de antígenos e inducir la expresión de receptores de quimioquinas asociados a la migración hacia los órganos linfoides secundarios (García-González y col., 2013).

Ahora bien, considerando que el objetivo final de la investigación en torno a la generación de las tDCs es encontrar procedimientos aplicables para su uso clínico, es importante la utilización de reactivos que cumplan con las “buenas prácticas de manufactura” (del inglés GMP, *good manufacturing practices*).

De esta manera, este trabajo de tesis describe los efectos de la activación de tDCs sobre la respuesta de linfocitos T CD4+, utilizando dexametasona como agente inmunomodulador, un glucocorticoide anti-inflamatorio e inmuno-supresor ampliamente utilizado en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y en la prevención del rechazo a trasplantes, y extensamente estudiado como agente inmuno-modulador de las DCs

(Van Kooten y col., 2009); y monofosforil lípido A (MPLA) como estímulo de maduración, un ligando del TLR-4 (Mata-Haro y col., 2007), análogo no tóxico del LPS que mantiene su actividad biológica y se utiliza actualmente como adyuvante en varios tipos de vacunas por ser efectivo, seguro y bien tolerado (Ismaili y col., 1996).

En vista de que la concentración de DCs en la sangre es baja, actualmente se utilizan protocolos de diferenciación *in vitro* de monocitos en DCs (Sallusto y Lanzavecchia, 1994). Para efectos de este estudio, la generación de DCs se realizó a partir de monocitos purificados de sangre periférica de donantes sanos, cultivados en presencia de GM-CSF e IL-4 durante 5 días (García-González y col., 2013). Se trabajó con 4 grupos celulares: DCs inmaduras (iDCs), sin tratar; DCs tolerogénicas (tDCs), tratadas con dexametasona como agente inmuno-modulador al día 3 de cultivo; DCs maduras (mDCs), tratadas con MPLA, como estímulo de activación al día 4 de cultivo; y DCs tolerogénicas activadas (MPLA-tDCs), tratadas con dexametasona y MPLA.

Al cosechar las células al quinto día de cultivo, se pudo apreciar que tanto las iDCs como las tDCs se encontraban más adheridas a la superficie de la placa, al contrario de las mDCs y las MPLA-tDCs. Pese a esto, el rendimiento de recuperación celular no varió significativamente entre las distintas condiciones en estudio (Fig. 8A). Tras la cosecha de las células, por citometría de flujo se determinó que independiente del tratamiento al que fueran sometidas las DCs no se ve afectada significativamente su tasa de sobrevivencia (Fig. 8B), de manera que el porcentaje de células muertas en cada caso responde a las condiciones experimentales y no a la presencia de los agentes externos (dexametasona y MPLA) en el medio de cultivo. Estos resultados difieren con lo reportado en la literatura, donde se muestra que el tratamiento con dexametasona afecta

el rendimiento y la viabilidad celular (Naranjo-Gómez y col., 2011). Sin embargo, estas diferencias pueden ser explicadas por las variaciones dadas entre los protocolos utilizados, tales como, la concentración de los reactivos o el período de incubación con los mismos.

La diferenciación celular fue confirmada por análisis fenotípicos por citometría de flujo, evaluando la expresión de los marcadores de superficie CD14, característico de células de linaje mielomonocítico (Haziot y col., 1988); CD1a, un marcador de DCs mieloides (Masten y col., 2006); y CD11c, una integrina altamente expresada en DCs, monocitos, macrófagos y neutrófilos (Larson y Springer, 1990); entre la población celular al inicio del cultivo y la obtenida al final de éste. Como se observa en la figura 10A, tras 5 días de cultivo, independiente del tratamiento al cual fuera sometida la población celular, ésta adquiere el fenotipo característico de las DCs, definido por un aumento de tamaño y complejidad, una baja expresión de CD14 y una alta expresión de CD1a, al contrario de lo observado en la población de monocitos inicial. A su vez, se observa una alta expresión de CD11c, tanto al inicio como al final del cultivo. Considerando todo esto, se puede establecer que el protocolo de diferenciación utilizado resultó ser efectivo. Ahora bien, cabe destacar que cuando las células son tratadas con dexametasona (tDCs y MPLA-tDCs) el porcentaje de expresión de CD1a tiende a ser más bajo que las otras condiciones y el de CD14 levemente más alto, lo cual estaría relacionado con que la dexametasona afecta la diferenciación de los monocitos en DCs (Piemonti y col., 1999a). Sin embargo, estos efectos no son absolutos, considerando que las diferencias de expresión de ambos marcadores entre las distintas condiciones de DCs en estudio no son significativas (Fig. 10B) y el perfil fenotípico obtenido es similar.

Utilizando un microscopio óptico fue posible apreciar diferencias morfológicas entre los distintos subtipos de DCs, de manera que mientras las iDCs y tDCs exhibieron un fenotipo redondeado, las MPLA-tDCs y mDCs presentaron una morfología más alargada, con prolongaciones más definidas en el segundo caso (Fig. 9), conforme al fenotipo de una DC madura (Banchereau y Steinmann, 1998). En relación a lo reportado en la literatura, estas diferencias estarían asociadas al uso de MPLA como agente de activación (Raich-Regué y col., 2011).

Por citometría de flujo, se realizó la caracterización fenotípica de los distintos grupos de DCs en estudio, en base a la expresión de ciertos marcadores de superficie: CD80, CD86, CD40, CD83 y MHC-II. CD80 y CD86 son moléculas de co-estimulación presentes en las CPA que contribuyen a la activación del linfocito T, donde actúan como ligando para CD28 y CTLA-4 (Van Gool y col., 1996). La molécula CD40 es una proteína activadora funcional presente en las CPA, que se une a su ligando CD40L en los linfocitos T para su activación. La interacción CD40-CD40L a su vez potencia la capacidad de las moléculas co-estimuladoras sobre las CPA para actuar en la diferenciación de las células T (Banchereau y col., 2000). CD83 se expresa selectivamente en DCs maduras y es importante en la activación de los linfocitos T y en el control de la respuesta inmune mediada por las DCs (Scholler y col., 2001). Por otro lado, la molécula de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-II) se expresa en las CPA y une péptidos que son presentados a los linfocitos T CD4+ (Chervonsky y col. 1998).

Los resultados obtenidos muestran que si bien las MPLA-tDCs presentan niveles de expresión de las moléculas co-estimuladoras, de activación funcional y del marcador

de maduración CD83 más altos que las iDCs y las tDCs, estas diferencias no son significativas. Sin embargo, en comparación a las mDCs los niveles de expresión de dichas moléculas son ampliamente más bajos ($p < 0,05$ para CD80 y CD40; y $p < 0,001$ para CD86 y CD83), dando cuenta de un fenotipo semi-maduro. Por otro lado, se observó que la activación con MPLA de las DCs tratadas con dexametasona (MPLA-tDCs), implicó un aumento significativo en la expresión del MHC de tipo II en relación a las células no activadas (tDCs) ($p < 0,05$), a un nivel similar al presentado por las mDCs (Fig. 11). Esta información sugiere que el tratamiento con dexametasona impide la maduración de las MPLA-tDCs, concordante con un estado de transición entre un estadio inmaduro y maduro. A su vez, el estímulo con MPLA favorece la expresión de MHC-II y con esto les confiere una mayor capacidad presentadora de antígenos. De esta manera, las MPLA-tDCs deberían ser capaces de presentar antígenos a los linfocitos T, pero con una capacidad co-estimuladora deficiente. De acuerdo a lo reportado en la literatura, el reconocimiento de la señal 1 (interacción complejo MHC-péptido y TCR) en ausencia de la señal 2 (co-estimulación) por el linfocito T (Fig. 2), conduce a tolerancia o anergia específica para el antígeno presentado (Moser, 2003), por lo cual, de acuerdo a su fenotipo, las MPLA-tDCs serían capaces de modular respuestas T en una dirección pro-tolerogénica.

Siguiendo con la caracterización de los subtipos de DCs en estudio, se evaluó su capacidad endocítica usando el péptido sintético dextran conjugado a FITC. Como se observa en la figura 12 tanto las iDCs como las tDCs tienen una elevada capacidad endocítica, que se acentúa al incrementar el tiempo de incubación con el antígeno. Se observa además, que cuando las células son moduladas con dexametasona su capacidad

endocítica tiende a mejorar, en concordancia a lo descrito en trabajos anteriores que dan cuenta que la dexametasona aumenta la eficacia de captura de antígenos por las DCs (Piemonti y col., 1999b). Ahora bien, cuando las células son activadas con MPLA (mDCs y MPLA-tDCs) esta capacidad disminuye significativamente.

Una vez caracterizadas las células, se procedió a hacer los estudios funcionales. Previamente se había establecido con ensayos de alo-proliferación, que las MPLA-tDCs poseen una capacidad reducida para inducir la proliferación de linfocitos T CD4+, en comparación a las mDCs; lo cual se replicó de manera antígeno-específica en cocultivos autólogos de MPLA-tDCs pulsadas con PPD y linfocitos T CD4+ totales (García-González y col., 2013). Estos resultados sustentan en gran parte el potencial inmuno-terapéutico de las MPLA-tDCs, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T CD4+, como es el caso de la artritis reumatoide, modulando la presentación de auto-antígenos en un contexto de tolerancia y con esto las respuestas aberrantes de linfocitos T. Ahora bien, para la inclusión de las MPLA-tDCs como herramienta terapéutica inmuno-moduladora es trascendental validar que son capaces de actuar en los distintos niveles de una respuesta inmune, vale decir, instruyendo la diferenciación de los linfocitos T vírgenes hacia un perfil regulador; atenuando respuestas efectoras; o bien inhibiendo la activación de los linfocitos T de memoria y su función efectora. A su vez, como los linfocitos T vírgenes y de memoria poseen diferentes susceptibilidades a las señales tolerogénicas, es importante entender los efectos moduladores de las MPLA-tDCs sobre estos subtipos celulares.

Se ha visto que existen distintos mecanismos para inducir tolerancia: Deleción de células T, inducción de anergia, desviación en el perfil de producción de citoquinas y/o inducción de linfocitos T reguladores (Steinman y col., 2003).

Considerando todo esto, a fin de evaluar de qué manera la activación de las tDCs afecta su capacidad de estimular linfocitos T CD4+ vírgenes y de memoria; y bajo qué mecanismos son capaces de promover un estado de tolerancia, se realizaron co-cultivos autólogos de MPLA-tDCs pulsadas con PPD y las poblaciones linfocitarias de interés teñidas con CFSE, utilizando iDCs, tDCs y mDCs como controles.

Tomando en consideración los resultados obtenidos en los experimentos de endocitosis, donde al madurar las DCs disminuyen su capacidad endocítica, y que ésta fue superior a mayores lapsos de tiempo de incubación con el antígeno, las células fueron pulsadas con PPD cuatro horas antes de recibir el estímulo de maduración.

Como se observa en la figura 13B, cuando los linfocitos T CD4+ de memoria son co-cultivados con tDCs o MPLA-tDCs pulsadas con PPD, su respuesta proliferativa se ve significativamente reducida en comparación a lo que ocurre con las mDCs ($p < 0,001$). Con ensayos de viabilidad (Fig. 13D) se confirmó que esta baja en la proliferación no está relacionada con la muerte celular de los linfocitos en cultivo, sino que efectivamente las tDCs tendrían una capacidad reducida para inducir la proliferación de linfocitos T CD4+ de memoria de manera antígeno-específica, situación que se mantiene cuando reciben un estímulo de activación.

La producción de citoquinas pro-inflamatorias (IFN γ e IL-17) por los linfocitos T CD4+ de memoria se analizó por tinción intracelular, observándose que cuando son co-cultivados con tDCs o MPLA-tDCs pulsadas con el antígeno, el porcentaje de linfocitos

T activamente proliferantes productores de IFN γ o de IL-17 es significativamente menor en comparación a lo que ocurre con las mDCs ($p < 0.01$) (Fig. 16A y 16B respectivamente).

Cabe mencionar, que las respuestas de linfocitos T CD4 $^{+}$ de memoria co-cultivados con iDCs, en cuanto a proliferación y producción de citoquinas pro-inflamatorias, sigue un patrón similar al presentado por los linfocitos T co-cultivados con mDCs. Esta situación da cuenta de que durante el procedimiento experimental las iDCs se maduraron, ya sea por las condiciones de cultivo o en respuesta al antígeno, simulando lo que ocurre *in vivo* una vez que capturan el material antigénico y se inicia el proceso coordinado de maduración (Murphy y col., 2007). Tomando en cuenta que esto no ocurre con las tDCs ni las MPLA-tDCs se valida que son más estables que las iDCs, y por ende serían más seguras en el desarrollo de una eventual inmuno-terapia.

A fin de evaluar si las MPLA-tDCs afectan funcionalmente a los linfocitos T CD4 $^{+}$ de memoria, se realizaron ensayos de re-estimulación con mDCs del mismo donante pulsadas con PPD. Tal como se visualiza en la figura 18, linfocitos T de memoria previamente co-cultivados con tDCs, se vuelven hipo-respondedores frente a un re-estímulo con mDCs, en términos de proliferación y producción de citoquinas pro-inflamatorias, situación que se mantiene cuando son inicialmente estimulados con tDCs activadas con MPLA (MPLA-tDCs). Estos resultados avalan que en un primer encuentro con DCs con un perfil tolerogénico, los linfocitos T CD4 $^{+}$ de memoria serían afectados funcionalmente y conducidos a un estado de anergia, lo cual se correlaciona con lo descrito en la literatura en un modelo alogénico (Anderson y col., 2008).

Ahora bien, en vista de que no fue posible detectar la producción de IL-10 por tinción intracelular, se estudió la presencia de esta citoquina anti-inflamatoria en los sobrenadantes de los co-cultivos por ELISA, evidenciándose niveles más altos en los co-cultivos primarios de linfocitos T con MPLA-tDCs en comparación a lo ocurrido con tDCs o iDCs ($p < 0.05$) (Fig. 16C). Sin embargo, en vista de que con esta estrategia no es posible asegurar que los niveles de citoquinas detectados en los sobrenadantes de los co-cultivos provienen exclusivamente de los linfocitos, es probable que representen en conjunto el porcentaje de producción de ellos y de las DCs. De esta manera, considerando que las DCs tratadas con dexametasona secretan altos niveles de IL-10, que se ven incluso aumentados en presencia de CD40L (García-González y col., 2013), la alta concentración de esta citoquina detectada en co-cultivos de linfocitos T de memoria y MPLA-tDCs, no necesariamente indica que el estímulo con estas tDCs promueva un incremento en la secreción de esta citoquina por los linfocitos T de memoria. Una buena aproximación para dilucidar esto, es por medio de ensayos de re-estimulación de los linfocitos en cuestión, con un estímulo uniforme; pues de esta manera variaciones en la cantidad de IL-10 detectada responderían a una “instrucción” previamente recibida por los linfocitos T en un encuentro inicial con cierto tipo de DCs. Tomando en cuenta esta estrategia, al realizar los co-cultivos entre mDCs pulsadas con PPD y los linfocitos T CD4+ de memoria inicialmente estimulados con DCs sometidas a distintos tratamientos y realizar el ensayo de ELISA correspondiente sobre los sobrenadantes, se puede apreciar que los niveles de IL-10 detectados son mayores en los sobrenadantes de co-cultivos de mDCs y linfocitos T CD4+ de memoria inicialmente estimulados con iDCs y mDCs, en comparación a aquéllos que reciben un primer

estímulo con DCs tolerogénicas (Fig. 18C). Esta situación podría explicarse como una forma de alcanzar el equilibrio por parte de los linfocitos T, de manera que para contrarrestar la alta producción de IFN γ , secretan también altos niveles de IL-10.

Estos resultados, en conjunto, avalan lo predicho al realizar la caracterización fenotípica de las MPLA-tDCs, de que en ausencia de co-estimulación se induce tolerancia, en vista de que el proceso de activación celular no puede completarse y la célula T alcanza un estado de anergia o falta de respuesta, y sugieren que las MPLA-tDCs serían capaces de modular respuestas antígeno-específicas de linfocitos T CD4+ de memoria, induciendo un estado de hipo-respuesta en términos de proliferación y producción de citoquinas.

A su vez, por citometría de flujo se evaluó la presencia de FoxP3+ Tregs en co-cultivos de mDCs y linfocitos T de memoria CD4+ inicialmente estimulados con los distintos subtipos de DCs, sin encontrar diferencias significativas en el porcentaje de células CD4+FoxP3+ que evidenciaran la participación de éstas en la actividad reguladora de las MPLA-tDCs. Si bien no se observó una expansión preferencial de esta población celular a partir de linfocitos T CD4+ de memoria inicialmente co-cultivados con tDCs activadas (Fig. 21), cuando fueron co-cultivados con mDCs o iDCs el porcentaje de células CD4+FoxP3+ tendió a aumentar, lo cual estaría relacionado con que FoxP3 no es un marcador exclusivo de Tregs y puede ser inducido en cualquier población de linfocitos T proliferantes activados (Wang y col., 2007; Pillai y col., 2007).

En cuanto a los estudios realizados sobre los linfocitos T CD4+ vírgenes, en primera instancia no se evidenciaron respuestas proliferativas cuando fueron co-cultivados con los distintos subtipos de DCs en estudio por 5, 6, 7 y 8 días (Fig. 14). Por citometría de flujo se evaluó viabilidad y se descartó que la falta de proliferación estuviese relacionada con la muerte celular de los linfocitos en cultivo (Fig. 15).

Seguidamente se realizaron ensayos de re-estimulación de los linfocitos T CD4+ vírgenes con mDCs del mismo donante pulsadas con PPD y con anti-CD3. Tal como se visualiza en la figura 19, linfocitos T vírgenes previamente co-cultivados con tDCs y con MPLA-tDCs, responden con una baja tasa de proliferación y producción de citoquinas pro-inflamatorias frente a un re-estímulo con mDCs pulsadas con PPD; y cuando son re-estimulados con anti-CD3 (Fig. 20) solo se ven afectados en cuanto a la producción de citoquinas. Por otro lado, linfocitos T CD4+ vírgenes previamente co-cultivados con iDCs y mDCs responden con altas tasas de proliferación y producción de IFN γ , tanto al re-estímulo con mDCs como al policlonal. Estos resultados dan cuenta de que en un primer encuentro con las DCs, éstas instruyen a los linfocitos T CD4+ vírgenes, de manera que al ser re-estimulados responden de acuerdo a esa instrucción, lo cual sería concordante con un estudio previamente realizado en un modelo alógeno (Woltman y col., 2006).

Ahora bien, considerando que a su vez se ha reportado que tDCs generadas con dexametasona son capaces de inducir la diferenciación de linfocitos T CD4+ vírgenes en linfocitos T reguladores secretores de IL-10 (Unger y col., 2009; Anderson y col., 2008), se evaluó la expresión de FoxP3 en la población linfocitaria en estudio, por citometría de flujo, y la secreción de IL-10 por ELISA.

Si bien, en los co-cultivos primarios de linfocitos T CD4+ vírgenes y los distintos tipos de DCs en estudio, se evidenciaron diferencias significativas en los niveles de IL-10 presentes en los sobrenadantes respectivos (Fig. 17), estos habrían sido secretados mayoritariamente por las tDCs en cultivo, pues al re-estimular la población linfocitaria tanto con mDCs pulsadas con PPD (Fig. 19C) como con anti-CD3 (Fig. 20C), no se observaron diferencias significativas en la cantidad de citoquina detectada, de manera que no habría una instrucción al respecto asociada al tipo de DCs con el que son co-cultivados inicialmente los linfocitos T CD4+ vírgenes. Con estos resultados se descartaría de cierta manera la diferenciación de estos hacia un fenotipo regulador productor de IL-10 (Tregs TR1) por parte de las DCs tolerogénicas.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de linfocitos T CD4+FoxP3+ presentes en los co-cultivos (Fig. 22) lo cual da cuenta de que las tDCs y MPLA-tDCs en estudio no son capaces de inducir la diferenciación de linfocitos T CD4+ vírgenes hacia un fenotipo regulador con estas características o bien que la cantidad de nTreg en los co-cultivos se mantiene constante.

Las diferencias dadas entre estos resultados y los registrados en la literatura, podrían ser explicadas por las variaciones de los protocolos usados en cada caso, por lo cual sería interesante estudiar ciertas modificaciones, como por ejemplo, realizar re-estimulaciones sucesivas de la población linfocitaria vírgen inicial con MPLA-tDCs, para ver si tal vez con esto se favorece su diferenciación hacia un fenotipo regulador, confirmando por medio del marcaje de moléculas características, y con ensayos de supresión.

En suma, esta información entrega evidencia experimental de que las MPLA-tDCs son capaces de modular respuestas de linfocitos T CD4+ vírgenes y de memoria en una dirección pro-tolerogénica, sustentada en la inducción de un estado hiporrespondedor en ambos casos. Estos resultados son importantes en el contexto de futuras aplicaciones terapéuticas, pues ratifican que las MPLA-tDCs son capaces de controlar *in vitro* los distintos niveles de una respuesta inmune, confiriendo de esta manera una aproximación de lo que pasaría *in vivo* con la modulación de respuestas aberrantes de linfocitos T CD4+ en patologías autoinmunes

Bajo este contexto, algunas proyecciones inmediatas de este trabajo son los ensayos de co-cultivos autólogos entre MPLA-tDCs y linfocitos T CD4+ de pacientes con alguna enfermedad autoinmune mediada por células T, como es el caso de la artritis reumatoide, utilizando como fuente antigénica potenciales auto-antígenos asociados a la patología. Así, podría confirmarse que las MPLA-tDCs son capaces de controlar las respuestas pro-inflamatorias gatilladas por linfocitos T CD4+ autorreactivos, mediante la inducción de anergia autoantígeno-específica. Con esto, podrá evaluarse si en la práctica los resultados obtenidos en donantes sanos son reproducibles con células de pacientes.

A su vez, se hace importante realizar los estudios *in vivo*, recurriendo en este caso al modelo murino de artritis inducida por colágeno (CIA). De esta forma se podrá confirmar el potencial terapéutico de las MPLA-tDCs y así poder desarrollar una estrategia más acabada para su inclusión como terapia celular en humanos, destinada a “educar” las células del sistema inmune del paciente para contener o interrumpir el progreso de la enfermedad.

Conclusiones

Las MPLA-tDCs:

- Exhiben un fenotipo semi-maduro caracterizado por una baja expresión de moléculas de co-estimulación y una alta expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II.
- Presentan una capacidad reducida para estimular de manera antígeno-específica la proliferación de linfocitos T de memoria CD4+ y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias.
- Afectan funcionalmente a los linfocitos T de memoria CD4+, induciendo un estado de anergia en términos de proliferación y producción de citoquinas.
- Instruyen a los linfocitos T vírgenes CD4+ en un primer encuentro, reduciendo su proliferación y secreción de citoquinas pro-inflamatorias frente a la re-estimulación.

Bibliografía

- Abbas A.K.**, y Lichman A.H. 2007. Cellular and molecular immunology. Sexta edición. Philadelphia: Elsevier.
- Adorini L.**, Penna G., Giarratana N., Uskokovic M. (2003). Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. *J Cell Biochem.* **88**:227-233.
- Anderson A.E.**, Sayers B.L., Haniffa M.A., Swan D.J., Diboll J. (2008). Differential regulation of naïve and memory CD4⁺ T cells by alternatively activated dendritic cells. *J Leukoc Biol.* **84**:124-33.
- Anderson A.E.**, Swan D.J., Sayers B.L., Harry R.A., Patterson A.M., Von Delwig A., Robinson J.H., Isaacs J.D., Hilkens C.M.U. (2009). LPS activation is required for migratory activity and antigen presentation by tolerogenic dendritic cells. *J Leukoc Biol.* **85**(2):243-250.
- Bacchetta R.**, Bigler M., Touraine J.L., Parkman R., Tovo P.A., Abrams J., de Waal Malefyt R., de Vries J.E., Roncarolo M.G. (1994). High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* **179**:493-502.
- Banchereau J.**, Steinman R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* **392**(6673):245-52.
- Banchereau J.**, Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu YJ., Pulendran B., Palucka K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* **18**:767-811.
- Berard M.**, Tough D.F. (2002). Qualitative differences between naïve and memory T cells. *Immunology.* **106**(2): 127-138.
- Buckland M.**, Jago C.B., Fazekasova H., Scott K., Tan P.H. (2006). Aspirin-treated human DCs up-regulate ILT-3 and induce hyporesponsiveness and regulatory activity in responder T cells. *American Journal of Transplantation.* **6**:2046-59.
- Chapuis F.**, Rosezwajg M., Yagello M., Ekman M., Biberfeld P., Gluckman J. (1997). Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol.* **27**:432-441.
- Chen Y.**, Kuchroo V.K., Inobe J., Hafler D.A., Weiner H.L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* **265**:1237-1240.

Chervonsky A., Medzhitov R., Denzin L., Barlow A.K., Rudensky A.Y., Janeway C.A. (1998). Subtle conformational changes induced in major histocompatibility complex class II molecules by binding peptides. *PNAS*. **95**:10094-10099.

Chorny A., González-Rey E. (2005). Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*. **102**(38):13562–13566.

Dhodapkar M.V., Steinman R.M., Krasovsky J., Munz C., Bhardwaj N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med*. **193**:233-8.

Emmer P.M., van der Vlag J., Adema G.J., Hilbrands L.B. (2006). Dendritic cells activated by lipopolysaccharide after dexamethasone treatment induce donor-specific allograft hyporesponsiveness. *Transplantation*. **81**:1451–1459.

Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. **4**:330-336.

Fu B.M., He X.S., Yu S., Hu A.B., Ma Y. (2009). Tolerogenic semimature dendritic cells induce effector T-cell hyporesponsiveness by the activation of antigen-specific CD4+ CD25+ T-regulatory cells. *Exp Clin Transplant* **7**:149-56.

Gagliani N., Magnani C., Huber S., Gianolini M., Pala M., Licona-Limon P., Guo B., Herbert D.B., Bulfone A., Trentini F., Serio C., Bacchetta R., Andreani M., Brockmann L., Gregori S., Flavel R., Roncarolo M.G. (2013). Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nature Medicine*. **19**:6.

García-González P., Morales R., Hoyos L., Maggi J., Campos J., Pesce B., Gárate D., Larrondo M., González R., Soto L., Ramos V., Tobar P., Molina M.C., Pino-Lagos K., Catalán D., Aguillón J.C. (2013) A short protocol using dexamethasone and monophosphoryl lipid A generates tolerogenic dendritic cells that display a potent migratory capacity to lymphoid chemokines. *J Transl Med*. **11**:128.

Giannoukakis N., Phillips B., Finegold D. (2011). Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*. **34**:2026–32.

Groux H., O'Garra A., Bigler M. (1997). A CD4+T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. **389**:737-742.

Guermónprez P., Valladeau J., Zitvogel L., Théry C., Amigorena S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Ann Rev Immunol*. **20**:621-627.

Hamann D., Baars P.A., Rep M.H., Hooibrink B., Kerkhof-Garde S.R., Klein M.R.. (1997). Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med.* **186(9)**: 1407-1418.

Haziot A., Chen S., Ferrero E., Low M.G., Silber R., Goyert S.M. (1988) The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol.* **141**:547-552

Healy L.J., Collins H.L. (2008). Systemic administration of tolerogenic dendritic cells ameliorates murine inflammatory arthritis. *Open Rheumatol J.* **2**:71-80.

Hilkens C.M., Isaacs J.D., Thomson A.W. (2010). Development of dendritic cell-based immunotherapy for autoimmunity. *Int Rev Immunol.* **29**:156-83.

Irie-Sasaki J., Sasaki T., Matsumoto W., Opavsky A., Cheng M., Welstead G. (2001). CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature.* **409(6818)**: 349-354.

Ismaili J., Rennesson J., Aksoy E., Vekemans J., Vincart B., Amraoui Z., van Laethem F., Goldman M., Dubois P.M. (2002) Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *J Immunol.* **168**:926-932.

Ivanov I.L., McKenzie B.S., Zhou L. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 T helper cells. *Cell.* **126**:1121-1133.

Kopf M., Le Gros G., Bachmann M., Lamers M.C., Bluethmann H., Kohler G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature.* **362**:245-248.

Lan Y.Y., Wang Z., Raimondi G., Wu W., Colvin B.L., de Creus A., Thomson A.W. (2006). "Alternatively activated" dendritic cells preferentially secrete IL-10, expand Foxp3+CD4+ T cells, and induce long-term organ allograft survival in combination with CTLA4-Ig. *J Immunol.* **177**:5868-5877.

Lanzavecchia A., Sallusto F. (2001). Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell.* **106(3)**:263-266.

Lau A.W., Biester S., Cornall R.J., Forrester J.V. (2008). Lipopolysaccharide-activated IL-10-secreting dendritic cells suppress experimental autoimmune uveoretinitis by MHCII-dependent activation of CD62L-expressing regulatory T cells. *J Immunol.* **180**:3889-99.

Larson R.S., Springer T.A. (1990). Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev.* **114**:181-217.

Lipscomb M.F., Masten B.J. (2002). Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev.* **82(1)**:97-130.

Lutz M.B., Suri R.M., Niimi M., Ogilvie A.L., Kukutsch N.A., Röbbner S., Schuler G., Austyn J.M. (2000). Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur. J. Immunol.* **30**:1813-1822.

Mata-Haro V., Cekic C., Martin M, Chilton P. M., Casella C. R., Mitchell T. C. (2007). The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science.* **316 (5831)**: 1628-1632.

Moser M. (2003). Dendritic Cells in Immunity and Tolerance. Do They Display Opposite Functions? *Immunity.* **19**:5–8.

Murphy K., Travers P., Walport P. (2009). *Inmunobiología de Janeway.* Séptima edición. Ed. Garland.

Naranjo-Gómez M., Raich-Regue D., Onate C., Grau-López L., Ramo-Tello C., Pujol-Borrell R., Martínez-Cáceres E., Borrás F.E. (2011). Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *J Transl Med.* **9**:89.

Paul W.E., Seder R.A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell.* **76**:241-251.

Piemonti L., Monti P., Allavena P., Sironi M., Soldini L., Leone B., Socci C., Di Carlo V. (1999). Glucocorticoids Affect Human Dendritic Cell Differentiation and Maturation. *J Immunol.* **162(11)**:6473-6481.

Piemonti L., Monti P., Allavena P., Leone B., Caputo A., Di Carlo V. (1999). Glucocorticoids increase the endocytic activity of human dendritic cells. *Int Immunol.* **11(9)**:1519-1526.

Pillai V., Ortega S.B., Wang C.K., Karandikar N.J. (2007). Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clin. Immunol.* **123**:18 –29.

Raich-Regué D., Naranjo-Gómez M., Grau-López L., Ramo C., Pujol-Borrell R., Martínez-Cáceres E., Borrás F.E. (2011). Differential effects of monophosphoryl lipid A and cytokine cocktail as maturation stimuli of immunogenic and tolerogenic dendritic cells for immunotherapy. *Vaccine* **30(2)**: 378-387.

Revy P., Sospreda M., Barbour B., Trautmann A. (2001). Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol.* **2**:925-931.

- Sakaguchi S.** (2004). Naturally arising CD4₊ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* **22**:531-562.
- Salazar L.,** Aravena O., Abello P., Escobar A., Contreras-Levicoy J., Rojas-Colonelli N., Catalán D., Aguirre A., Zúñiga R., Pesce B., González C., Cepeda R., Cuchacovich M., Molina M. C., Salazar-Onfray F., Delgado M., Toes R. E., Aguillón J. C. (2008). Modulation of established murine collagen-induced arthritis by a single inoculation of short-term lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells. *Ann Rheum Dis.* **67**: 1235-41.
- Sallusto F.,** Cella M., Daniel C., Lanzavecchia A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med.* **182**:389-400.
- Sallusto F.,** Lenig D., Forster R., Lipp M., Lanzavecchia A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* **401(6754)**: 708-712.
- Sato K.,** Yamashita N., Baba M., Matsuyama T. (2003). Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood* **101**:3581-9.
- Schäkel K.** (2009). Dendritic cells: Why can they help and hurt us. *Experimental Dermatology.* **18**: 264-73
- Scholler N.,** Hayden-Ledbetter M., Hellstrom K.E., Hellstrom I., Ledbetter J.A. (2001). CD83 is a sialic acid-binding Ig-like lectin (Siglec) adhesion receptor that binds monocytes and a subset of activated CD8(+) T cells. *J Immunol.* **166**:3865-3872, 2001.
- Shortman K.,** Yong-Jun L. (2002). Mouse and human dendritic cells subtype. *Nature Rev Immunol.* **2**:151-161.
- Sprent J.,** Surh C.D. (2002). T cell memory, *Annu Rev Immunol.* **20**:551-579.
- Starr T.K.,** Jameson S.C., Hogquist K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol.* **21**:139-176.
- Steinbrink K.,** Graulich E., Kubsch S., Knop J., Enk A.H. (2002). CD4⁺ and CD8⁺ anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood.* **99**:2468-76.
- Steinman R.M.** (1999). Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum Immunol.* **60(7)**:562-567.

Steinman R.M., Hawiger D., Nussenzweig M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* **21**:685-711.

Švajger U., Obermajer N., Jeras M. (2010). Dendritic cells treated with resveratrol during differentiation from monocytes gain substantial tolerogenic properties upon activation. *Immunology.* **129**:525-35.

Szabo S.J., Kim S.T., Costa G.L., Zhang X., Fathman C.G., Glimcher L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* **100**:655-669.

Thomas R., Street S., Ramnorch N. (2011). Safety and preliminary evidence of efficacy in a phase I clinical trial of autologous tolerising dendritic cells exposed to citrullinated peptides (Rheumavax) in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* **70** (Suppl 3):169.

Torres-Aguilar H., Aguilar-Ruiz S.R., González-Pérez G., Munguía R., Bajaña S. (2010). Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells. *J Immunol.* **184**:1765-75.

Ueno H., Klechevsky E., Morita R., Asford C., Cao T., Matsui T., Di Pucchio T., Connolly J., Fay J.W., Pascual V., Palucka A.K., Banchereau J. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev.* **219**:118-142.

Unger W.W., Laban S., Kleijwegt F.S., Van der Slik A.R., Roep B.O. (2009). Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1. *Eur J Immunol.* **39**:3147-3159.

Van Gisbergen K., Paessens L., Geijtenbeek T., Van Kooyk Y. (2005). Molecular mechanism that set the stage for DC-T cell engagement. *Immunol Letters.* **97**:199-208.

Van Gool S.W., Vandenberghe P., de Boer M., Ceuppens J.L. (1996). CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunol Rev.* **153**:47-83.

Van Kooten C., Stax A.S., Woltman A.M., Gelderman K.A. (2009). The Use of dexamethasone in the induction of tolerogenic dendritic cells. In Handbook of Experimental Pharmacology "Dendritic Cells". **188**:233-249.

Wang J., Ioan-Facsinay A., van der Voort E.I., Huizinga T.W., Toes R.E. (2007). Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* **37**:129-138.

Warncke M., Dodero A., Dierbach H., Follo M., Veelken H. (2006). Murine dendritic cells generated under serum-free conditions have a mature phenotype and efficiently induce primary immune responses. *J Immunol Met.* **310**:1-10.

Weaver C.T., Harrington L.E., Mangan P.R., Gavrieli M., Murphy K.M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* **24**:677-688.

Werner E.D., Brodsky J.L., McCracken A.A. (1996). Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: An unconventional route to a familiar fate. *Proc Natl Acad Sci.* **93**:13797-13801.

Woltman A.M., van der Kooij S.W., de Fijter J.W., van Kooten C. (2006) Maturation-resistant dendritic cells induce hyporesponsiveness in alloreactive CD45RA+ and CD45RO+ T-cell populations. *Am J Transplant.* **6**:2580-2591.

Wright-Browne V., McClain K.L., Talpaz M., Ordoñez N., Estrov Z. (1997). Physiology and pathophysiology of dendritic cells. *Hum Pathol.* **28**:563-79.

Wallet M., Sen P., Tisch R. (2005). Immunoregulation of Dendritic Cells. *Clinical Medicine & Research.* **3**:166-165.

Zheng X., Suzuki M., Ichim T.E., Zhang X., Sun H. (2010). Treatment of autoimmune arthritis using RNA interference-modulated dendritic cells. *J Immunol.* **184**:6457-64.

Zhou L., Chong M.M., Littman D.R. (2009). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity.* **30**: 646-655.

Zhu J., Guo L., Watson C.J., Hu-Li J., Paul W.E. (2001). Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J Immunol.* **166**:7276-7281.

Figura Suplementaria

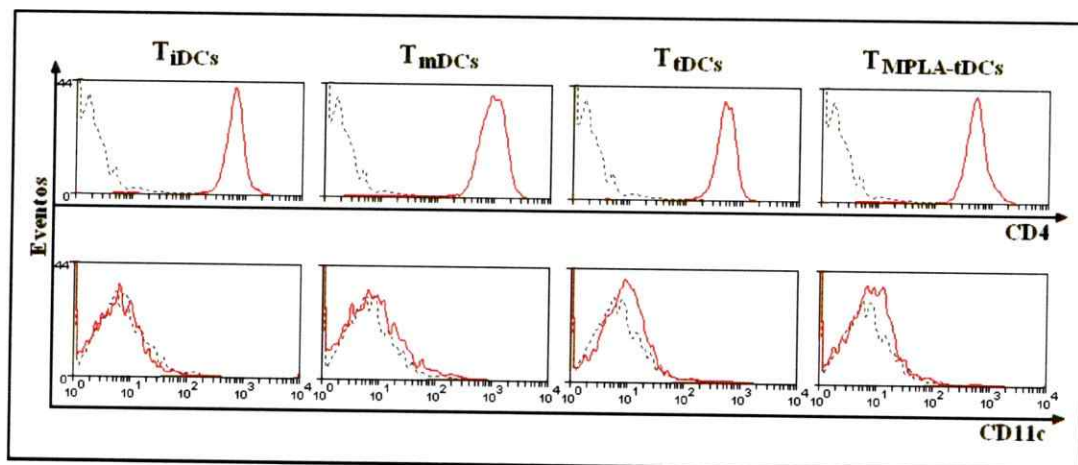


Figura S1. Evaluación de la expresión de CD4 y CD11c en células recuperadas de co-cultivos primarios de linfocitos T CD4⁺ y células dendríticas (DCs) sometidas a distintos tratamientos, para su posterior re-estimulación. En la parte superior de la figura, se muestran histogramas representativos para el marcador de superficie CD4 (característico de linfocitos T *helper* o colaboradores), en células recuperadas de co-cultivos de linfocitos T CD4⁺ con DCs inmaduras (iDCs), maduras (mDCs), tolerogénicas (tDCs) o tolerogénicas activadas (MPLA-tDCs) pulsadas con PPD; mientras que en la parte inferior, se muestran histogramas representativos para el marcador de superficie CD11c (característico de las DCs) evaluado sobre las mismas células.