



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 Cinthia Soledad Silva Vilches

“EFECTO DEL TRATAMIENTO CON FAGOSOMAS PLGA ALOGÉNICOS EN LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR *IN VIVO*”

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

Dra. María Rosa Bono Merino
Directora Seminario de Título

Dr. Juan Alberto Fierro Correa
Co-Director

Comisión de Evaluación

Dr. Álvaro Glavic
Presidente Comisión

Dra. María Inés Becker
Evaluador

Santiago de Chile, Junio 2011

UCH-FC
Biotecnología

5586

C.A.



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

**“EFECTO DEL TRATAMIENTO CON FAGOSOMAS PLGA
ALOGÉNICOS EN LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y
CELULAR *IN VIVO*”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento
parcial de los requerimientos para optar al título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

POR

CINTHIA SOLEDAD SILVA VILCHES

Director de Seminario de Título: Dra. María Rosa Bono Merino

Co-Director de Seminario de Título: Dr. Juan Alberto Fierro Correa



Nací en Santiago justo para un solsticio de verano. Hija de Patricia y Bernabé, sólo tengo una hermana menor, Tamara.

Fui una niña tranquila que gustaba crear e inventar cosas nuevas para entretenerme con mi hermana. En la casa y colegio siempre fui risueña, y hasta el día de hoy mi risa contagia a todo el mundo.

Siempre me ha gustado la biología, aprender sobre cómo funcionan las cosas “por dentro” es algo que me fascina. Así, el bichito de la ciencia me picó como en tercero medio cuando asistí a unas charlas sobre carreras en la Universidad de Chile. Ahí recién conocí la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular y me quedó dando vueltas en la cabeza... de hecho, en ese entonces cuando vi la malla curricular de inmediato pensé que Inmunología iba a ser mi ramo favorito... y así fue.

Hoy me encuentro cerrando una de las etapas más importantes de mi vida, fueron años de bastante esfuerzo y tiempo dedicado a ello. Crecí... crecí en conocimiento y en lo personal y sé que esto no termina aquí...

"La ciencia sólo nos da una idea de nuestra gran ignorancia"
(Hugues-Félicité Robert de Lamennais)



A mi Papá

A mi Mamá

A Tammy

A Sole



AGRADECIMIENTOS

Sin duda este ha sido un camino difícil de recorrer, y jamás lo hubiese logrado sin el apoyo de todas aquellas personas que han estado a mi lado cuidándome, apoyándome y preocupándose incondicionalmente de mí. Infinitas gracias por siempre “estar ahí”...

Agradezco a Ma. Rosa, Alberto y Mario por darme la oportunidad de estar aquí haciendo lo que me gusta, por entregarme bases sólidas que me han permitido desarrollarme como científico y como persona. En verdad creo que he crecido y aprendido mucho durante estos tres años y si tuviera que elegir nuevamente dónde hacer mi tesis, sin dudarlo volvería a escoger InmunoLab. Gracias Ma. Rosa por tus consejos, no sólo en lo que a experimentos se refiere, eres una excelente guía. Alberto, admiro tu paciencia y capacidad de dedicarte a lo que te apasiona. Mario, gracias por tu paciencia y apoyo.

Por supuesto no estaría aquí sin contar con “el gentil auspicio” de mis amados padres, les debo todo lo que soy. Muchas gracias por aguantarme tal como soy (no les queda otra, jeje) y por su apoyo incondicional. A toda mi familia, gracias por siempre darme las fuerzas necesarias para seguir adelante, en especial mis Lelas y mis Tatas. Hermanita querida, gracias por acompañarme y siempre estar a mi lado, me enorgullecen tus logros. Y por supuesto agradezco a aquellas personas que realmente han pasado a formar parte de mi familia: Sole, tu sabes que sin ti, imposible!, infinitas gracias por todo!; Loreley, Mauro y Leíto, gracias por creer en mí, ustedes saben que tienen un lugar en mi corazón y siempre serán bienvenidos en mi casa. Fabián y Nicole,

gracias por alegrarme los días con sus historias y soportar mis pseudo-clases de ciencias!.

Gracias a mis queridas amigas de la U: Fran, Yu, Giss y Fefi, niñas mías, muchas veces nos trasnochamos estudiando o haciendo trabajos, pero pucha que valió la pena esta “tortura” que permitió al final de cuentas llegar a formar esta linda amistad. Aún me deben un viaje a la playa!!!.

A mis amigas del cole: Feña, Coté, Fran, Sil y Kelly, gracias por su apoyo y por sacarme de vez en cuando del absorbente mundo científico.

Por último, y no por eso menos importante, InmunoGente, más que mal, paso con ustedes más tiempo que en mi propia casa!. Dani y Caco, gracias por creer en mí, por su apoyo y por su paciencia para contestar todas mis preguntas. Pazturri y Ale, agradezco su alegría y buena onda, gracias brujitas por escucharme, aconsejarme y “dejarme ser”. Pauli (“agrandá”), Gaby, Yessia, Sarah (“gringuita”), Paula y Camila, gracias por su buen humor y su paciencia para aguantar mis bromas, se alivia bastante el trabajo con ustedes dando vueltas (y a veces dando un poco de jugo) por ahí!. Un abrazo fuerte a todos aquellos que ya no están aquí, pero se les sigue recordando siempre: Joce, Valerie (“amarela”), Jaime, Jenny, Pao, Paulita Michea y Andrés. Un saludo a las nuevas contrataciones del 2011: Coté, Juan José, Natty y Vale, suerte chicos!. Por supuesto también agradezco a Evita, Pame y Oscar, sin ustedes nuestro trabajo sería más difícil.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
Células Dendríticas e Inmunidad	2
Células Dendríticas y Tolerancia	4
La respuesta inmune en trasplantes	5
Métodos usados para inducir tolerancia en trasplantes	7
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Animales	14
Anticuerpos	14
Reactivos	15
Citometría de Flujo	17
Generación de células dendríticas de médula ósea	17
Obtención de fagosomas PLGA	18
Preparación de muestras para microscopía electrónica	19



Determinación de la presencia de moléculas MHC-II en fagosomas PLGA	20
Marcaje de fagosomas PLGA con PKH26	21
Inyección de fagosomas PLGA alogénicos y obtención de células de órganos linfoides	22
Purificación de células CD11c ⁺ de bazo	23
Inyección de fagosomas PLGA alogénicos e inmunización de ratones	24
Medición de los niveles de anticuerpos en sueros	25
ELISPOT	25
Análisis estadístico	27
RESULTADOS	28
Células dendríticas generadas en presencia del sobrenadante de la línea celular J558L fagocitan eficientemente microesferas de PLGA	28
Los fagosomas PLGA de BALB/c poseen moléculas MHC-II	31
Los fagosomas PLGA alogénicos son fagocitados <i>in vivo</i> por células CD11c ⁺ de bazo de ratones receptores	33
La incorporación de fagosomas PLGA alogénicos <i>in vivo</i> no induce la activación de las células CD11c ⁺ que los fagocitan	36
La incorporación de fagosomas PLGA alogénicos <i>in vivo</i> disminuye la respuesta inmune humoral y celular	42
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Células dendríticas generadas en presencia del sobrenadante de la línea J558L fagocitan eficientemente microesferas de PLGA	30
Figura 2.	Fagosomas PLGA contienen moléculas MHC-II	32
Figura 3.	Distribución de fagosomas PLGA alogénicos en ratones receptores	34
Figura 4.	Fagosomas PLGA alogénicos son fagocitados por células CD11c ⁺ de bazo	35
Figura 5.	La incorporación de fagosomas PLGA alogénicos <i>in vivo</i> no induce la activación de las células dendríticas de bazo	38
Figura 6.	La incorporación de fagosomas PLGA alogénicos <i>in vivo</i> no induce la activación de macrófagos de bazo	40
Figura 7.	Los fagosomas PLGA alogénicos disminuyen los niveles de aloanticuerpos en sueros <i>in vivo</i>	44
Figura 8.	Los fagosomas PLGA alogénicos disminuyen el número de linfocitos T alorreactivos <i>in vivo</i>	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Efecto de la incorporación de fagosomas PLGA alogénicos <i>in vivo</i> en la activación de las células dendríticas de bazo	39
Tabla 2.	Efecto de la incorporación de fagosomas PLGA alogénicos <i>in vivo</i> en la activación de macrófagos de bazo	41

ABREVIATURAS

2-ME:	2-mercaptoetanol
APC:	Aloficocianina
APS:	Persulfato de amonio
BSA:	Albúmina sérica de bovina.
CTLA-4:	Antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico
DC:	Células dendríticas
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISPOT:	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Spot</i>
FBS:	Suero fetal bovino
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF:	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
HRP:	Peroxidasa de rábano
IDO:	Indoleamina 2,3-deoxigenasa
IFN- γ :	Interferón gamma
Igs:	Inmunoglobulinas
<i>i.p.</i> :	Vía intraperitoneal
<i>i.v.</i> :	Vía intravenosa
IMDM:	Medio Dulbecco modificado por Iscove
IMF:	Intensidad Media de Fluorescencia
LB:	Linfocito B
LPS:	Lipopolisacárido

LT:	Linfocito T
LTreg:	Linfocito T regulador
MACS:	<i>Magnetic Activated Cell Sorter</i>
MHC-I:	Complejo mayor de Histocompatibilidad de clase I
MHC-II:	Complejo mayor de Histocompatibilidad de clase II
MLN:	Ganglio mesentérico
PBS:	Tampón fosfato salino
PE:	Ficoeritrina
PE-Cy 5:	Ficoeritrina-Cianina 5
PE-Cy 7:	Ficoeritrina-Cianina 7
PI:	Yoduro de propidio
PKH26:	Fluoróforo lipofílico que se une a membranas celulares
PLGA:	Ácido poliláctico-co-glicólico
PLN:	Ganglios periféricos
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RPMI 1640:	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SEM:	Error estándar de la media
TGF- β :	Factor de crecimiento transformante- β

RESUMEN

Las Células Dendríticas (DC) son células especializadas en la captura, transporte, procesamiento y presentación de antígenos (Ag), y se les considera las células presentadoras de antígenos profesionales dado que son las únicas células capaces de estimular eficientemente a linfocitos T (LT) $CD4^+$ y $CD8^+$ vírgenes. Las DC tienen la capacidad de transportar Ag desde tejidos periféricos a áreas de LT en órganos linfoides secundarios y presentar Ag de manera cruzada. Las DC son los mediadores esenciales en el desarrollo de inmunidad o de tolerancia. Se ha comprobado que el inicio de inmunidad ocurre en un contexto de señales asociadas con infección e inflamación, mientras que la inducción de tolerancia ocurre en un ambiente no inflamatorio, en donde las DC se mantienen en un estado inmaduro, con baja expresión de moléculas estimuladoras y con secreción principalmente de citoquinas inhibitorias.

Es sabido que en individuos trasplantados, la respuesta inmune llevada a cabo por los linfocitos T del receptor en contra de aloantígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) del donante, constituye el mecanismo principal por el cual se produce el rechazo de órganos o tejidos alogénicos trasplantados. La terapia utilizada actualmente para evitar el rechazo consiste en la administración de medicamentos inmunosupresores, sin embargo, estos son de acción inespecífica, por lo que están asociadas a toxicidad órgano-específica además de incrementar los riesgos de infección y desarrollo de cáncer. Finalmente, luego de algunos años, el receptor termina rechazando el injerto. Es por esto que la obtención de tolerancia antígeno específica es uno de los mayores desafíos que enfrenta la inmunología de trasplantes.

Dado el rol de las DC en la inducción de tolerancia, este Seminario de Título se centró en la utilización de fagosomas como vehículo de administración de aloantígenos en un ambiente no inflamatorio, de forma tal de mantener el estado inmaduro de las células dendríticas del receptor y por lo tanto sus propiedades tolerogénicas. Para la producción de fagosomas alogénicos, se usaron DC inmaduras derivadas de médula ósea a las cuales se les dio a fagocitar microesferas de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) lo que permite obtener microesferas recubiertas con membrana plasmática que contiene péptidos MHC, en este caso derivados de H-2^d. Evaluamos la fagocitosis de las microesferas de PLGA por las DC inmaduras mediante microscopía electrónica de transmisión. Por otra parte, demostramos que los fagosomas poseen moléculas MHC-II usando Western blot.

Los fagosomas de PLGA H-2^d administrados vía intravenosa en ratones de haplotipo MHC H-2^b se localizan en DC y macrófagos del bazo, sin producir la activación de estas células, mostrando en distintos marcadores de activación niveles de expresión similares a ratones no tratados.

Por otra parte, la administración de fagosomas de PLGA H-2^d en ratones H-2^b previa a dos inmunizaciones con esplenocitos H-2^d, disminuye de manera significativa los niveles de aloanticuerpos circulantes y el número de LT alorreactivos, lo que implica que el tratamiento con fagosomas alogénicos tiene un efecto regulador sobre la respuesta inmune humoral y celular.

Estos resultados indican que los fagosomas constituyen una estrategia adecuada para la administración de antígenos del donante a células presentadoras de antígenos del

receptor en un contexto no inflamatorio, por lo tanto, representan una herramienta potencial para la generación de tolerancia en trasplantes.

ABSTRACT

Dendritic cells (DC) are cells specialized in the capture, processing and presentation of antigens (Ag). For this reason, DC are considered professional antigen-presenting cells, since they are the unique cells capable of efficiently stimulating naïve CD4⁺ and CD8⁺ T-cells (LT). DC are capable of transporting Ag from peripheral tissues to T cells areas in secondary lymphoid organs and of Ag cross-presentation. DC are the essential mediators in the development of immunity or tolerance. It has been proved that the beginning of immunity takes place in a context of infection- and inflammation-associated signals, while tolerance induction takes place in a non-inflammatory environment, where DC keep an immature state with low expression of stimulatory molecules and secretion of inhibitory cytokines.

It is well known that in transplanted patients the immune response carried out by recipient LT against donor Major Histocompatibility Complex (MHC) antigens is the principal mechanism by which an transplanted allogeneic organ or tissue is rejected. Current methods to prevent transplant rejection are based on administration of immunosuppressive drugs, however, their action is unspecific, so they are associated with organ toxicity and increased risks of infection and malignancy. Finally, after a few years, the recipient rejects the graft. For all these reasons, the achievement of antigen specific tolerance is one of the greatest challenges for transplant immunology.

Since the role of DC in tolerance induction, the aim of this Degree Seminar was to use phagosomes as vehicles to deliver alloantigens in a non-inflammatory context, hence, maintaining the immature state of recipient DC and their tolerogenic properties.

For allogeneic phagosomes production, polylactic-co-glycolic acid (PLGA) beads were given to bone-marrow derived immature DC for phagocytosis, which allow to generate microspheres covered with plasmatic membrane bearing MHC molecules peptides, in this case H-2^d haplotype.

The phagocytosis of PLGA beads by immature DC was evaluated by transmission electronic microscopy. On the other hand, phagosomes bear MHC-II molecules, as confirmed by Western blot.

H-2^d phagosomes administered intravenously into H-2^b mice were found in DCs and macrophages in the spleen and these cells were not activated by phagosomes, showing low expression of activation markers, similar as non treated mice levels.

On the other hand, administration of H-2^d PLGA phagosomes into H-2^b mice previous to two immunizations with H-2^d splenocytes diminished significantly the level of circulating alloantibodies and the number of alloreactive T cells, which implies that the treatment with allogeneic phagosomes has a regulatory effect over the humoral and cellular immune reponse.

These results suggest that phagosomes represent a suitable strategy to deliver donor-derived antigens to recipient antigen presenting cells in a non-inflammatory context; hence, they represent a potential tool to generate tolerance in transplants.

1. INTRODUCCIÓN

Las Células Dendríticas (DC) son células de origen hematopoyético que están ampliamente distribuidas en el organismo y están especializadas en la captura, transporte, procesamiento y presentación de antígenos (Ag), por lo que se les considera, junto con macrófagos y linfocitos B (LB), células presentadoras de antígenos. Pero las DC exhiben otras características que las hacen recibir el título de células presentadoras de antígenos profesionales puesto que son las únicas células capaces de estimular eficientemente a linfocitos T (LT) $CD4^+$ y $CD8^+$ vírgenes. Las DC tienen la capacidad de transportar Ag desde los tejidos periféricos a áreas de LT en órganos linfoides secundarios (OLS) y presentar Ag de manera cruzada. Además, se ha demostrado que las DC son dos órdenes de magnitud más eficientes que otras células en cuanto a captura y procesamiento antigénico (Liu, 2001; Shortman y Liu, 2002; Liu y Nussenzweig, 2010). Así, las DC son consideradas verdaderas centinelas del sistema inmune, censando el ambiente adquieren la información integrada que inicia y regula la magnitud y calidad de la respuesta inmune adaptativa (Ueno y col., 2007).

Las DC se dividen en varios subtipos y aunque todos son capaces de capturar, procesar y presentar antígenos a LT vírgenes, éstas difieren en su origen, localización, migración, funciones inmunes y dependencia de estímulos inflamatorios o infecciosos para su generación (Shortman y Naik, 2007). Las razones para la existencia de subtipos de DC, están dadas por los requerimientos para establecer protección contra infecciones virales, eliminar bacterias, hongos ó parásitos. De igual forma, los requerimientos para

activar LT son diferentes a los necesarios para activar LB y los requisitos para inducir inmunidad deben ser distintos de aquéllos necesarios para inducir tolerancia (Ueno y col., 2007).

Durante las últimas tres décadas ha quedado demostrado que las DC son los mediadores esenciales tanto en el desarrollo de inmunidad como en el desarrollo de tolerancia. Este balance depende del subtipo de DC involucrada y de su estado de maduración (Liu, 2001; Morelli y Thomson, 2007; Young y col., 2007). Se ha comprobado que el inicio de inmunidad ocurre en un contexto de señales asociadas con infección e inflamación, mientras que la inducción de tolerancia ocurre en un ambiente no inflamatorio, en donde las DC mantienen su estado inmaduro (no activado), con baja expresión de moléculas coestimuladoras y con secreción principalmente de citoquinas inhibitorias (Steinman y col., 2003; Ureta y col., 2007). Además, las DC son capaces de inducir la generación de LT reguladores (LTreg), capaces de suprimir la respuesta efectora de LT (Sakaguchi y col., 2008; Yamazaki y Steinman, 2009; Moore y col., 2010).

Células dendríticas e inmunidad

En estado quiescente, las DC residen tanto en tejidos periféricos como en órganos linfoides, además existen subtipos de DC que circulan también por la sangre. Las DC pueden ser activadas por numerosos factores derivados de microbios, células apoptóticas y células tanto de la respuesta inmune innata como de la respuesta adaptativa.

Para iniciar una respuesta inmune, las DC sufren un complejo proceso de maduración. Este proceso incluye: (i) cambios en la morfología de las células, como la pérdida de estructuras de adhesión, reorganización del citoesqueleto y la adquisición de una alta motilidad; (ii) pérdida de receptores endocíticos/fagocíticos; (iii) secreción de quimioquinas en oleadas coordinadas dependiendo del tipo de células que necesitan ser atraídas, así como aumento en la expresión de receptores de quimioquinas que conducen la migración de las DC hacia la linfa y luego hacia órganos y ganglios linfoides; (iv) aumento de la expresión de moléculas estimuladoras, como CD40, CD80, CD86; (v) translocación de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y II a la superficie celular; y (vi) secreción de citoquinas pro-inflamatorias que diferencian y polarizan a las células efectoras atraídas, como IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23. Finalmente, una vez que las DC están activadas y cargadas con algún Ag, migran a los órganos linfoides drenantes y presentan los péptidos de las proteínas procesadas a células T CD4⁺ y CD8⁺, glicolípidos propios y microbianos a células NKT y antígenos nativos a LB (Trombetta y Mellman, 2005; Piqueras y col., 2006; Ueno y col., 2007; Blanco y col., 2008).

Las células dendríticas representan una vitrina de péptidos para el reconocimiento de billones de linfocitos T diferentes, cada cual con un distintivo pero azaroso receptor de antígeno (Steinman y Banchereau, 2007).

Células dendríticas y tolerancia

La tolerancia inmune se define como un estado en el que el sistema inmune no responde de manera específica a un antígeno determinado. Anatómicamente, la tolerancia puede ser dividida en compartimientos central y periféricos. La tolerancia central involucra la deleción de LT autorreactivos durante su desarrollo en el timo y la generación de LTreg CD4⁺CD25⁺. Sin embargo, muchos auto-antígenos no están representados en el timo, mientras que otros son expresados tardíamente en la adultez. Los LT que escaparon al control tímico y que por lo tanto son autorreactivos, una vez en la periferia, pueden ser activados y conducir a autoinmunidad, de ahí la necesidad de tolerancia periférica. Este control en la periferia se lleva a cabo principalmente por mecanismos de deleción, anergia y supresión. Las DC juegan un papel esencial en el control de ambos tipos de tolerancia (Banchereau y col., 2003).

La tolerancia no es específica de un subtipo de DC ni está restringida a un estado inmaduro de las células presentadoras de antígenos. Las DC tolerogénicas presentan antígenos a los LT, pero fallan en entregar las señales de estimulación adecuadas necesarias para la activación y proliferación de LT efectores, o entregan señales inhibitorias. Esto se traduce en anergia, muerte por apoptosis de LT o generación y/o expansión de LTreg (Schwartz, 2003; Morelli y Thomson, 2007).

Los mecanismos que utilizan las DC en la inducción de tolerancia periférica incluyen la producción de factores supresores como IL-10, factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) e IDO (indoleamina 2,3-deoxigenasa), la inducción de LTreg

y la delección clonal de LT autorreactivos. La inducción de otras moléculas, como PD-1 y CTLA-4 (Antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico), parecen ser cruciales en la tolerancia periférica de LT CD8⁺, mientras que la unión de P-selectina a las DC a través de su ligando PSGL-1 ó CD162, induce la expresión de genes paraIDO, IL-10 y TGF- β y aumenta su capacidad de generar LTreg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Yamazaki y col., 2008; Thomson, 2010).

Las DC además juegan un rol determinante en la prevención de autoinmunidad, lo que quedó demostrado cuando ratones desprovistos de DC (convencionales, plasmacitoides y células de Langerhans), desarrollaron autoinmunidad espontánea, caracterizada por reducción del peso corporal, esplenomegalia, formación de autoanticuerpos, alto número de LTh1 y LTh17 además de desarrollar enfermedad inflamatoria intestinal (Ohnmacht y col., 2009).

La respuesta inmune en trasplantes

En trasplante, la tolerancia debe apuntar a un estado de falta de respuesta inmune del receptor hacia antígenos presentes en el órgano o tejido trasplantado, siendo capaz de responder de manera normal frente a otros antígenos (Griesemer y col., 2010). La habilidad de responder normalmente contra otros antígenos contrasta fuertemente con el efecto de agentes inmunosupresores que son usados clínicamente para prevenir el rechazo, y aunque los resultados obtenidos con estas terapias han mejorado con los años, estas drogas siguen siendo inespecíficas por lo que están asociadas a toxicidad órgano-

específica además de incrementar los riesgos de infección y desarrollo de cáncer. Finalmente, luego de algunos años, gran parte de los receptores terminan rechazando el injerto (Dantal y Souillou, 2005; Taylor y col., 2005; Sykes, 2007).

Es así como la obtención de tolerancia a nivel de trasplante clínico sin la administración de inmunosupresores ha sido por años uno de los objetivos fundamentales que se pretende conseguir, específicamente el logro de tolerancia antígeno-específica contra antígenos derivados de moléculas MHC del donante o aloantígenos.

Es conocido que luego de un trasplante, las DC presentan aloantígenos a LT a través de las vías de alo-reconocimiento directa, indirecta o semi-directa. En la presentación directa, las DC del donante que migran desde el injerto presentan moléculas MHC del donante intactas a LT aloespecíficos del receptor, mientras que en la presentación indirecta, las DC del receptor procesan aloantígenos del donante y presentan alopéptidos a los LT alogénicos en moléculas MHC propias. A través de la vía semi-directa, los LT del receptor reconocen moléculas MHC del donante que han sido transferidas intactas desde células del donante hacia la superficie de las DC del receptor, mediante un proceso conocido como “cell nibbling” (Harshyne y col., 2001; Herrera y col., 2004; Morelli y Thomson, 2007). La alo-respuesta directa domina el período temprano post-trasplante y es el mecanismo responsable del rechazo agudo, mientras que el rechazo crónico es producido por la alo-respuesta indirecta (Bedi y col., 2010; Tanriver y col., 2010).

La frecuencia de células T alorreactivas en el repertorio de LT, la presencia de reactividad cruzada a otros antígenos nominales y la participación de LT de memoria, hacen que la inducción de tolerancia específica de trasplantes sea una tarea muy compleja. Para cumplir esta meta, todas las células T que son potencialmente reactivas a los antígenos trasplantados necesitan ser “apagadas”, lo que implica delección, anergia o supresión mediada por LTreg (Sykes, 2007; Zhao y Li, 2010).

Métodos usados para inducir tolerancia en trasplantes

Actualmente, hay un considerable interés en desarrollar estrategias de tolerancia periférica para inducir tolerancia a trasplantes. Finkelman y col. (Finkelman y col., 1996) introdujeron el concepto de focalizarse en las DC *in vivo*, lo que podría llevar a tolerancia en lugar de inmunidad activa. Los métodos clásicos basados en DC tolerogénicas para regular la respuesta anti-donante y prolongar la sobrevida del injerto están basados en la administración de DC tolerogénicas generadas *in vitro* a partir de precursores de médula ósea en roedores, o a partir de monocitos en humanos y primates no humanos, derivadas del donante o del receptor (Thomson, 2010). Estas células expresan moléculas MHC pero tienen una baja proporción de señales de co-estimulación versus co-inhibición y sintetizan bajas cantidades de citoquinas que conducen a una respuesta de tipo Th1, como IL-12p70.

Dado que las DC inmaduras son muy eficientes en la captura de Ag pero son ineficientes en presentar esos Ag en moléculas MHC-II, son ineficaces en estimular LT

(Wilson y col., 2003). En modelo murino, DC inmaduras derivadas de médula ósea inducen anergia de LT de manera antígeno específica *in vitro* y conducen a la diferenciación *de novo* de LTreg naturales (Wakkach y col., 2003; Yamazaki y Steinman, 2009; Thomson y col., 2009).

Además, DC propagadas *in vitro* han sido manipuladas mediante exposición a varios agentes antiinflamatorios e inmunosupresores. Estos agentes ejercen su acción en la diferenciación y función de las DC mediante varios mecanismos e incluyen IL-10 y TGF- β 1, inductores de AMP cíclico (prostaglandina E₂, histamina, agonistas β ₂, neuropéptidos, metabolitos de la vitamina D₃ y sus análogos, entre otros). Además, drogas inmunosupresoras clínicamente aprobadas o experimentales también han sido usadas para detener la diferenciación y funcionalidad de las DC. Todas estas moléculas previenen la maduración y/o activación o la capacidad de las DC de producir IL-12p70. Algunos de estos agentes impiden la traslocación nuclear de los miembros de la familia de factores nucleares NF- κ B, requeridos para la diferenciación de las DC (Hackstein y Thomson, 2004; Morelli y Thomson, 2007; Pothoven y col., 2010).

Avances en tecnología de transferencia de genes han resultado en el aumento del potencial tolerogénico de las DC. Estas células pueden ser genéticamente manipuladas para expresar moléculas inmunosupresoras, las que pueden inhibir o bloquear la expresión de moléculas co-estimuladoras de superficie, prevenir la proliferación de LT alogénicos, inducir y mantener la anergia de LT (Bonham y col., 2002; Hill y col., 2003; Tiao y col., 2005; Suzuki y col., 2008; Arruda y col., 2009).

Aunque estas aproximaciones han sido relativamente exitosas en modelos animales, tienen varias limitaciones para el uso clínico: (i) el tiempo requerido para la generación de las DC resulta un obstáculo cuando deben ser preparadas a partir de donantes cadavéricos; (ii) las DC inyectadas podrían madurar *in vivo* y sensibilizar al receptor; (iii) las DC inyectadas pueden ser procesadas por las células presentadoras de antígenos del receptor; (iv) las DC derivadas del donante son un blanco para las células NK del receptor; y (v) las DC inyectadas deberían migrar a los órganos linfoides secundarios y sólo un pequeño porcentaje de las DC inyectadas llegan al órgano adecuado (Morelli y Thomson, 2007; Wang y col., 2009).

Un método alternativo es explotar la habilidad intrínseca de las DC presentes en los órganos linfoides secundarios para inducir y/o mantener tolerancia a antígenos propios o extraños. Esta “segunda generación” de técnicas basadas en el uso de las DC, se centra en la liberación *in situ* de alo-antígenos del donante en los órganos linfoides secundarios del receptor, sin producir un estado inflamatorio o bien realizar esta misma operación ayudada por drogas antiinflamatorias de tal modo que los aloantígenos sean procesados en un ambiente tolerogénico. Esta aproximación evita la activación de las DC, manteniendo o incluso exacerbando su habilidad para inducir tolerancia.

Varios grupos de investigadores han mostrado que la administración de linfocitos o DC en estadio de apoptosis temprana constituye un método eficiente para entregar antígenos foráneos a las DC *in vivo*, sin inducir la activación de ellas. De hecho, la eliminación por DC de células apoptóticas resultantes de muerte fisiológica en tejidos periféricos juega un rol clave en la tolerancia periférica de LT. La superficie de células

apoptóticas contiene una serie de ligandos, conocidos como patrones moleculares asociados a células apoptóticas, que son reconocidos por receptores expresados por DC. Como consecuencia de esta interacción, la célula apoptótica es reconocida e internalizada por la DC, lo que hace que ésta no madure en respuesta a señales de peligro y permanezca tolerogénica. La habilidad de células apoptóticas de entregar tanto antígenos del donante como señales inhibitorias simultáneamente a DC del receptor ha sido usada para suprimir el rechazo a trasplantes en modelos experimentales. Sin embargo, los mecanismos de acción de estas estrategias *in vivo*, su efecto sobre los distintos subtipos de DC, y su potencial terapéutico en el rechazo crónico no han sido dilucidados. Una de las dificultades de esta estrategia es que los métodos de inducción de apoptosis tienen distintos efectos dependiendo de la etapas del ciclo celular en que se encuentre la célula, esto implica efectos variables cuando las células no están sincronizadas en su ciclo celular, lo que podría provocar complicaciones si se originan células en apoptosis tardía o células necróticas que inducirían más bien inmunidad en vez de tolerancia (Steinman y col., 2000; Gleisner, 2009; Kushwah y col., 2009; Wang y col., 2009).

Otra estrategia para la entrega de alo-antígenos a DC del receptor *in situ* es la administración de exosomas derivados de células presentadoras de antígenos. Los exosomas son nano vesículas formadas a partir de invaginaciones de la membrana de endosomas tardíos, formando cuerpos multivesiculares que se liberan al medio extracelular al fusionarse la membrana endosomal con la membrana plasmática. Exosomas producidos a partir de células presentadoras de antígenos son ricos en

moléculas de MHC y una vez inyectados en ratones por vía intravenosa, son rápidamente internalizados y procesados por las DC sin gatillar su maduración. No se sabe con exactitud si estos exosomas pueden también funcionar como vesículas presentadoras de antígenos y disminuir la respuesta alogénica de LT por interacción directa con ellos (Morelli y col., 2004; Pêche y col., 2006). Por otro lado, hay trabajos que muestran el efecto inmune inductor de exosomas, por lo que faltan estudios que estandaricen la dosis y la fuente de estas partículas como para trasladarlos al uso clínico (Théry y col., 2002; De La Peña y col., 2009).

Este Seminario de Título se centró en el estudio, en un modelo murino, de un vehículo de administración de aloantígenos de manera no inmunogénica, obtenido a partir de células dendríticas tratadas con microesferas de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), denominado fagosomas. El PLGA es un polímero que por sus propiedades de ser biocompatible y biodegradable ya es utilizado en humanos con otros fines. De este modo, los fagosomas PLGA podrían constituir un nuevo mecanismo para inducir tolerancia a trasplantes sin la necesidad del uso de inmunosupresores. El uso de DC para producir los fagosomas PLGA tiene como racional que las DC serán células inmaduras al momento de fagocitar las micropartículas y esperamos que los fagosomas PLGA producidos sean un reflejo de este estado de inmadurez.

HIPÓTESIS

El pre-condicionamiento de ratones con fagosomas PLGA portadores de aloantígenos disminuye la respuesta inmune humoral y celular *in vivo*.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del tratamiento con fagosomas PLGA alogénicos en la respuesta inmune humoral y celular *in vivo*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener fagosomas PLGA portadores de moléculas MHC-II, generados a partir de células dendríticas inmaduras derivadas de células precursoras de médula ósea de ratones BALB/c.
- Determinar la distribución de fagosomas PLGA de BALB/c inyectados en ratones C57BL/6.
- Evaluar las características fenotípicas de las células que incorporan fagosomas PLGA alogénicos *in vivo*.
- Evaluar el efecto de la administración de aloantígenos en forma de fagosomas PLGA en la respuesta inmune humoral y celular *in vivo*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Animales

Se usaron ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 de entre 2 y 4 meses de edad, los cuales poseen haplotipos H-2^d y H-2^b respectivamente. Ambas cepas se adquirieron en Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Los animales usados en este trabajo fueron mantenidos en un bioterio convencional.

2.1.2 Anticuerpos

Para citometría de flujo se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales de Pharmingen (BD Biosciences):

Conjugados a FITC: anti-IA^b (clon 25-9-17); anti-IA^d (clon AMS-32.1); anti-CD86 (clon GL1); anti-CD80 (clon 16-10A1); anti-CD11c (clon HL3). Conjugados a PE-Cy5: anti-CD3 (clon 145-2C11). Conjugados a PE-Cy7: anti-CD45R (clon RA3-6B2). Conjugados a APC: anti-CD83 (clon Michel-19); anti-CD11c (clon HL3). Los siguientes anticuerpos fueron adquiridos en e-Bioscience: anti-CD40 (clon 1C10); anti-CD16/32 (clon 93). Además se usaron el anticuerpo monoclonal anti-F4/80

conjugado a APC-Cy7 (clon BM8) (Biolegend) y el anticuerpo policlonal anti-Igs de ratón conjugado a FITC (Dako).

Para western blot se usaron los anticuerpos policlonales: anti-MHC clase II de ratón (gentileza Dra. A.M. Lennon-Duménil, Institut Curie, Paris, Francia), anti-Igs de conejo conjugado a peroxidasa de rábano y anti-Igs de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (Dako). Además se utilizó el anticuerpo monoclonal anti- α tubulina de ratón (clon B-5-1-2) (Sigma).

Para la purificación de DC se usó el anticuerpo monoclonal anti-CD11c de ratón acoplado a microesferas magnéticas (clon N418, Miltenyi Biotec).

2.1.3 Reactivos

Cultivo Celular: Medio de cultivo RPMI-1640; medio de cultivo IMDM; tripsina-EDTA; L-glutamina; penicilina/estreptomicina; FBS; PBS; 2-ME (Gibco); gentamicina (Laboratorio Sanderson).

Biología Molecular: Acrilamida; N-N'-Metilenbisacrilamida; SDS; TRIS; TEMED (Bio-Rad); 2-Mercaptoetanol; PMSF; APS; Ponceau S; inhibidores de proteasas: aprotinina, leupeptina y pepstatina (Sigma); Tween 20 (Sigma-Aldrich); ortovanadato de sodio (Fisher Scientific); BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen); leche descremada en polvo Svelty (Nestlé); SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific); Revelador D-76; Fijador U-3 (Jamarca).

Generales: DNAsa-I, Colagenasa D (Roche); PKH26 (Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Labeling) (Sigma-Aldrich); BD ELISPOT Mouse IFN- γ Set (BD Biosciences); etanol 95%, metanol (Lab-Tec); agua bidestilada (Sanderson); BSA (Sigma); microesferas de PLGA (colaboración Dr. S. Little, University of Pittsburgh, PA, USA); LPS (Sigma).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Citometría de flujo

Para la detección de moléculas de superficie, las células se incubaron con las correspondientes combinaciones de los anticuerpos diluidos en PBS + FBS 2% durante 20 min a 4°C. Posteriormente, se lavaron con PBS + FBS 2% y se centrifugaron a 4°C. Las células se resuspendieron en PBS + FBS 2% a una concentración 2×10^6 células/mL para luego ser analizadas en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences). En algunos casos, los receptores Fc de las células fueron previamente bloqueados con el anticuerpo CD16/32 (Fc Block) por 15 min a 4°C previo a el marcaje de superficie. Las células muertas fueron descartadas utilizando yoduro de propidio.

Los análisis de los datos se hicieron utilizando el software FACSDiva (BD Biosciences) o el software FlowJo (Tree Star, Inc.)

2.2.2 Generación de células dendríticas de médula ósea

Las DC se generaron a partir de células precursoras de médula ósea de ratones BALB/c extraídas de tibias y fémures. Los huesos se lavaron con etanol 70% por 1 min y se perfundieron con medio RPMI, disgregando las médulas por agitación vigorosa. Se lisaron los glóbulos rojos incubando las células durante 5 min a temperatura ambiente en 1 mL de una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH_4Cl 0,15 M; KHCO_3 10 mM

y Na₂EDTA 0,1 mM, pH 7,2-7,4) luego de lo cual se lavaron con medio RPMI completo (RPMI suplementado con FBS 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL). Posteriormente, las células se centrifugaron a 400 × g por 5 min a 4°C y se cultivaron por 12 días en placas de Petri bacteriológicas de 140 mm a una densidad de 10⁷ células totales en 20 mL de medio RPMI completo + 2-ME 50 µM. Además, se agregó 3% v/v del sobrenadante de la línea celular J558L como fuente de GM-CSF murino para lograr la diferenciación de los precursores de médula a DC. Las células se incubaron a 37°C, 5% CO₂. A los días 4 y 8 de cultivo se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco completo. Para esto, se recuperaron las células no adherentes y las células adherentes se lavaron con PBS 1× y se tripsinizaron durante 6 minutos a 37°C, luego se lavaron con medio RPMI completo, se centrifugaron a 400 × g por 5 min a 4°C y ambas fracciones de células se juntaron y se sembraron a 10⁷ células por placa en medio completo + 2-ME 50µM.

Finalmente al día 12 de cultivo se recuperaron ambas fracciones de células de las placas y se usaron 3×10⁶ células para analizar sus características fenotípicas mediante citometría de flujo con los marcadores de superficie CD11c, IA^d, CD80, CD86, CD83 y CD40. El resto de las células se utilizó para la obtención de fagosomas PLGA.

2.2.3 Obtención de fagosomas PLGA

Los fagosomas PLGA se prepararon a partir de DC provenientes de precursores de médula ósea de ratones BALB/c preparadas como se describió anteriormente. Luego

de 12 días de cultivo, 50×10^6 de DC adherentes y no adherentes se incubaron por 20 min a 37°C en un tubo de 50 mL con 250×10^6 de microesferas de PLGA en 2,6 mL de medio RPMI completo. Posteriormente se agregaron 4 mL de medio RPMI completo tibio y se centrifugó 2 min a $400 \times g$ y, sin retirar el sobrenadante ni resuspender las células, se incubó 70 min más a 37°C . Se detuvo la fagocitosis lavando 3 veces con 50 mL de PBS frío y centrifugación a $400 \times g$ por 5 min a 4°C . Finalmente las células se resuspendieron en 500 μL de PBS frío y se traspasaron a un tubo de 1,5 mL.

Para aislar los fagosomas PLGA se lisaron las células mecánicamente por jeringueo (60 veces) con aguja 21G y a continuación se centrifugó el lisado celular a $400 \times g$ por 5 min a 4°C , recuperando el sobrenadante donde se encuentran los fagosomas PLGA; éstos se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

Se estimó la cantidad de fagosomas PLGA obtenidos midiendo la cantidad de proteína total en la muestra mediante fluorometría, utilizando la plataforma de cuantificación Qubit® siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.4 Preparación de muestras para microscopía electrónica

La fagocitosis de microesferas de PLGA por DC generadas en presencia del sobrenadante J558L como se describió anteriormente, fue visualizada por microscopía electrónica de transmisión. Para ello, 5×10^6 DC incubadas por 90 min con microesferas de PLGA se centrifugaron a $400 \times g$ durante 5 min a 4°C , y al pellet se agregó 1 mL de glutaraldehído 3% en tampón cacodilato de sodio 0,138 M, pH 7,2.

Las muestras fueron llevadas al Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, donde fueron procesadas para su posterior análisis.

2.2.5 Determinación de la presencia de moléculas MHC-II en fagosomas PLGA

La presencia de moléculas MHC-II en los fagosomas PLGA de BALB/c se determinó mediante Western Blot en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones denaturantes (SDS-PAGE). Se cargaron 20 μ g de proteína total de fagosomas PLGA en tampón de carga con una mezcla de inhibidores de proteasas (leupeptina, pepstatina y aprotinina 1 μ g/mL; PMSF 1 mM; Na_3VO_4 1 mM) previamente incubados 5 min a 100°C. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, la cual se bloqueó por 16 hrs a 4°C en una solución de PBS + Tween 20 0,1% más 3% de BSA. Las moléculas MHC-II se detectaron con el anticuerpo policlonal anti-IA β^d diluido 1:2.000 en PBS-Tween + BSA 1%. La reacción se llevó a cabo durante 1 hr a temperatura ambiente. Luego, se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-Igs de conejo conjugado a HRP diluido 1:5.000 en PBS-Tween.

Como control positivo de la presencia de moléculas MHC-II se usó un lisado de una línea celular derivada de un linfoma B de ratones BALB/c y como control negativo se utilizó un lisado de células RAG que provienen de un adenocarcinoma renal de ratones BALB/c y carecen de moléculas MHC-II. Ambos extractos proteicos se

obtuvieron de 10^7 células lisadas por 5 min a 100°C en $100\ \mu\text{L}$ de tampón de lisis (SDS 7,5%; Tris-Cl 75 mM pH 7,4; PMSF 7,5 mM; Na_3VO_4 7,5 mM; leupeptina, pepstatina y aprotinina 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Finalmente, el lisado se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 15 min a 4°C , se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta su utilización. Como control de carga se evaluó α -tubulina utilizando un anticuerpo anti- α -tubulina diluido 1:7.000 en PBS-Tween + BSA 1%, el cual se reveló con un anticuerpo secundario anti-Igs de ratón conjugado a HRP diluido 1:10.000 en PBS-Tween.

Para la estimación del peso molecular de las proteínas se ocupó el estándar BenchMark Pre-stained Protein Ladder. Las membranas de nitrocelulosa fueron reveladas en oscuridad utilizando el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, según las instrucciones del fabricante.

2.2.6 Marcaje de fagosomas PLGA con PKH26

Los fagosomas PLGA se marcaron con el fluorocromo PKH26, el cual se excita a una longitud de onda de 551 nm y su espectro de emisión presenta un pico a 567 nm, características que lo hacen compatible para ser analizado mediante citometría de flujo.

El protocolo seguido para el marcaje fue adaptado del protocolo sugerido por el fabricante: 1 mg de proteína total de fagosomas PLGA se centrifugó a $16.000 \times g$ durante 10 min a 4°C , y el pellet se resuspendió en $100\ \mu\text{L}$ del diluyente provisto en el kit. El colorante se agregó a una concentración de 12 μM en $100\ \mu\text{L}$ de diluyente. Se incubó 5 min a temperatura ambiente con agitación rotatoria y se detuvo la reacción

incubando 1 min a temperatura ambiente con 200 μ L de BSA 1% en PBS. Posteriormente, se lavó 3 veces con 1 mL de PBS + FBS 2%, centrifugando a $16.000 \times g$ durante 10 min a 4°C. Los fagosomas PLGA marcados se almacenaron a 4°C por no más de 24 hrs, evitando la exposición a la luz.

Posterior al marcaje, se cuantificó la cantidad de proteína total de fagosomas PLGA marcados utilizando la plataforma de cuantificación Qubit®.

2.2.7 Inyección de fagosomas PLGA alogénicos y obtención de células de órganos linfoides

Para determinar la distribución de fagosomas PLGA alogénicos en distintos órganos linfoides, ratones C57BL/6 fueron inyectados de manera intravenosa (*i.v.*) con 300 μ g de proteína total de fagosomas PLGA de BALB/c marcados con PKH26 en un volumen de 200 μ L de PBS + FBS 2%. Como control se inyectaron ratones C57BL/6 con 200 μ L de PBS + FBS 2%.

Luego de 48 hrs, tiempo al cual se consiguió la mejor señal de PKH26, se obtuvieron las células de bazo, ganglio mesentérico (MLN) y ganglios periféricos (PLNs). Para ello, cada órgano se disgregó mecánicamente y los tejidos se digirieron 45 min a 37°C con agitación rotatoria en presencia de colagenasa D (1 mg/mL) y DNasa I (0,05 mg/mL) en PBS + FBS 2%. Posteriormente, las suspensiones celulares se pasaron por un tamiz metálico de 90 μ m de abertura, llevando a 10 mL con medio RPMI completo para el caso del bazo y a 8 mL con medio IMDM + FBS 10% para MLN y

PLNs. Las células se lavaron centrifugando a $500 \times g$ por 7 min a 4°C y se lisaron los glóbulos rojos del bazo incubando durante 5 min a temperatura ambiente con 1 mL de una solución hipotónica de cloruro de amonio, luego de lo cual se lavó con medio RPMI completo, centrifugando en las mismas condiciones anteriores.

Finalmente, se analizó mediante citometría de flujo la presencia de PKH26 en los distintos órganos linfoides.

2.2.8 Purificación de células CD11c^+ de bazo

Para evaluar las características fenotípicas de las DC y macrófagos de bazo que incorporaron fagosomas PLGA alogénicos, ratones C57BL/6 fueron inyectados *i.v.* con 150 μg de proteína total de fagosomas PLGA de BALB/c marcados con PKH26 en 200 μL de PBS + FBS 2%. Como control negativo, se inyectaron *i.v.* ratones C57BL/6 con 200 μL de PBS + FBS 2%. Como control de activación se inyectaron *i.v.* ratones C57BL/6 con 30 μg de LPS en 200 μL de PBS + FBS 2%.

Luego de 6 h (*i.v.* LPS) ó 48 h (*i.v.* fagosomas PLGA alogénicos) se obtuvieron las células del bazo tal como se describió en la sección anterior. Con el propósito de enriquecer la población celular en células CD11c^+ , 100×10^6 de esplenocitos se centrifugaron a $500 \times g$ por 7 min a 4°C , se resuspendieron en 300 μL de tampón MACS (PBS + EDTA 2mM + FBS 5%) y se incubaron con 30 μL de microesferas magnéticas conjugadas con un anticuerpo anti-CD11c de ratón durante 20 min a 4°C con agitación rotatoria. En seguida, las células se lavaron con 10 mL de tampón MACS, se

centrifugaron a $500 \times g$ por 7 min a 4°C , se resuspendieron en 1 mL de tampón MACS y se hizo una selección positiva con un imán (VarioMACS) y columna magnética (Columnas LS, Miltenyi) según las instrucciones del fabricante. La pureza fue superior al 60% determinado mediante citometría de flujo.

Se analizó el fenotipo de las células purificadas a través de la expresión de los marcadores de superficie IA^b (MHC-II), CD86, CD80, CD83 y CD40 mediante citometría de flujo.

2.2.9 Inyección de fagosomas PLGA alogénicos e inmunización de ratones

Ratones C57BL/6 fueron inyectados *i.v.* con 150 μg de proteína total de fagosomas PLGA de BALB/c en 200 μL de PBS ó con 200 μL de PBS solo como control (día 0). Luego de una semana (día 7), los ratones se inmunizaron de manera intraperitoneal (*i.p.*) con 10^7 esplenocitos BALB/c. Estos esplenocitos se obtuvieron perfundiendo el bazo de un animal con 10 mL de medio RPMI completo luego de lo cual se lisaron los glóbulos rojos incubando durante 5 min a temperatura ambiente con 1 mL de una solución hipotónica de cloruro de amonio. A continuación, las células se llevaron a 10 mL con medio RPMI completo y se centrifugaron a $500 \times g$ por 7 min a 4°C . Finalmente, los esplenocitos se resuspendieron y se dejaron a una concentración de 10^7 células/200 μL de PBS.

Una segunda inmunización con esplenocitos de BALB/c fue realizada 7 días después de la primera inmunización (día 14), utilizando la misma dosis de células.

A los días 0 y 21 del experimento, se obtuvo suero de los animales inmunizados para evaluar los niveles de aloanticuerpos circulantes mediante citometría de flujo (ver sección 2.2.10). Los sueros se almacenaron en alícuotas a -20°C hasta su utilización. Al día 21, los animales se sacrificaron y se obtuvieron los esplenocitos para determinar el número de LTs alorreactivos por ELISPOT (ver sección 2.2.11).

2.2.10 Medición de niveles de aloanticuerpos en sueros

Los sueros de los animales inmunizados se incubaron durante 30 min a 4°C (diluidos 1:40) con 5×10^5 esplenocitos BALB/c (ver sección 2.2.9) en un volumen final de 50 μL de PBS + FCS 2%. A continuación, las células se lavaron 3 veces con 1 mL de PBS + FCS 2%, centrifugando a $500 \times g$ por 7 min a 4°C y se incubaron con los anticuerpos anti-CD3 y anti-Igs de ratón durante 20 min a 4°C . Finalmente, las células se lavaron con 1 mL de PBS + FCS 2% y se analizaron los niveles de aloanticuerpos circulantes presentes en los sueros mediante citometría de flujo.

2.2.11 ELISPOT

Se determinó el número de LTs alorreactivos mediante la secreción de IFN- γ por ELISPOT, utilizando el kit BD ELISPOT Mouse IFN- γ Set. Para esto, a los pocillos de una placa de 96 pocillos se les agregó 100 μL /pocillo de anticuerpo de captura diluido 1:200 en PBS y se incubaron a 4°C por 16 hrs sobre papel absorbente húmedo.

Posteriormente, las placas se lavaron y se dejaron bloqueando durante 3 hrs a temperatura ambiente con 300 μ L/pocillo de medio RPMI completo.

Como células respondedoras (RC) se usaron 10^5 esplenocitos de los animales inmunizados, y como células presentadoras de antígeno se utilizaron 10^5 esplenocitos irradiados (30 Gy) de un ratón BALB/c, las cuales se cultivaron por triplicado en 200 μ L de medio RPMI completo. Como controles negativos se cultivaron RC y células presentadoras de antígenos por separado, además se cultivaron RC de los animales inmunizados con células presentadoras de antígenos irradiadas de un ratón C57BL/6 isogénico.

Luego de 20 hrs de incubación a 37°C, CO₂ 5%, las placas se lavaron 2 veces con agua bidestilada y 3 veces con la solución de lavado (PBS + Tween 20 0,05%), luego de lo cual se agregaron 100 μ L/pocillo de anticuerpo de detección anti-IFN- γ biotinilado diluido 1:250 en PBS + FBS 10% y se incubó a 4°C por 16 hrs, sobre papel absorbente húmedo. Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con solución de lavado y se incubaron durante 2 hrs a temperatura ambiente en ausencia de luz con 100 μ L/pocillo de la enzima estreptavidina conjugada a HRP diluida 1:100 en PBS + FBS 10%. Posteriormente, las placas se lavaron 4 veces con la solución de lavado, 2 veces con PBS y se incubaron con 100 μ L/pocillo de la solución con el sustrato final (3-amino-9-etilcarbazol + H₂O₂) en ausencia de luz. Las placas se lavaron con agua bidestilada y se dejaron secar destapadas durante 3 hrs a 37°C. Finalmente, se determinó el número de spots utilizando un lector de ELISPOT y el software Eli.Analyse ELISPOT Analysis Software V6.0.

Los resultados representan el promedio de spots de los triplicados de los cultivos (RC + células presentadoras de antígenos) restando la suma de spots de RC y células presentadoras de antígenos cultivados por separado (<15 spots en cada caso).

2.2.12 Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces. Para las comparaciones entre cada tratamiento se utilizó el análisis de ANOVA de una vía con test de comparación múltiple de Tukey. Los datos son presentados como el promedio \pm error estándar. Las diferencias fueron consideradas significativas si $p < 0,05$. Para el análisis estadístico y la confección de los gráficos se utilizó el software GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc.).

3. RESULTADOS

3.1 Células dendríticas generadas en presencia del sobrenadante de la línea celular J558L fagocitan eficientemente microesferas de PLGA

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que células precursoras de médula ósea cultivadas por 12 días en presencia del sobrenadante de la línea celular J558L como fuente de GM-CSF murino, generan 2 poblaciones de células dendríticas, una adherente y otra en suspensión, ambas poblaciones presentan una alta expresión del marcador CD11c pero difieren en la expresión de ciertos marcadores de maduración como MHC-II y CD86, siendo la fracción en suspensión más madura que la fracción adherente. Sin embargo, ambas poblaciones pueden considerarse como células inmaduras, ya que presentan alta capacidad fagocítica y al ser estimuladas con distintos estímulos bacterianos responden secretando cantidades similares de citoquinas tales como IL-2, IL-12 e IL-10 (Pino, 2005).

Dado que mediante este protocolo es posible obtener células dendríticas capaces de fagocitar de manera eficiente, células precursoras de médula ósea de ratones BALB/c (H-2^d) se utilizaron para generar DC a partir de las cuales se obtuvieron fagosomas con microesferas de PLGA. La figura 1A muestra una imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión, donde se observa la morfología de una célula dendrítica obtenida bajo estas condiciones de cultivo con sus típicas prolongaciones tipo dendritas (Steinman y Banchereau, 2007). En 1B se puede advertir los espacios dejados

por las microesferas de PLGA en el citoplasma de una célula dendrítica luego de 90 min de incubación, esto podría deberse a que el PLGA no permite la correcta polimerización de la resina empleada para la fijación de las muestras, o que el PLGA no resiste el tratamiento de fijación empleado. Aún así se puede notar una eficiente fagocitosis de las microesferas, lo que provoca la pérdida de las prolongaciones tipo dendrita en las células.

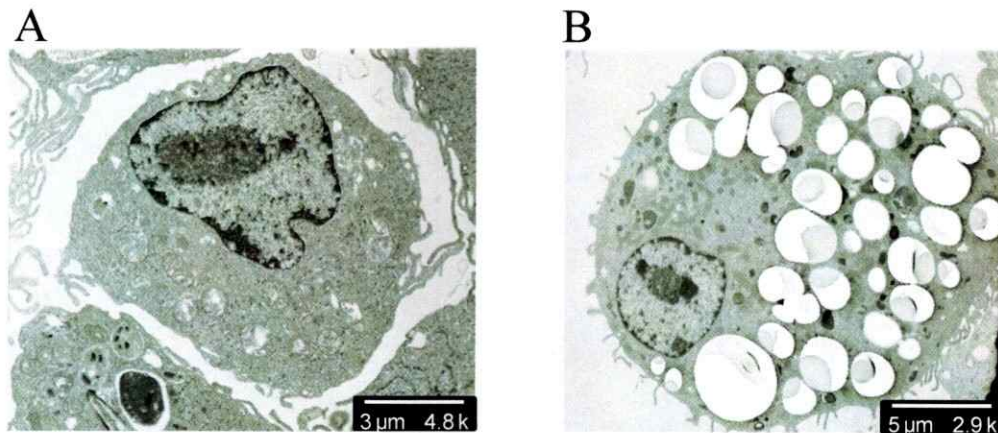


Figura 1. Células dendríticas generadas en presencia del sobrenadante de la línea celular J558L fagocitan eficientemente microesferas de PLGA. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea de ratones BALB/c luego de 12 días de cultivo a 37°C y 5% CO₂ en presencia del sobrenadante de la línea celular J558L. **(A)** DC sin tratar **(B)** Luego de 90 min de incubación con microesferas de PLGA.

3.2 Los fagosomas PLGA de BALB/c poseen moléculas MHC-II

Con el objetivo de determinar la presencia de moléculas MHC-II haplotipo d en la membrana de los fagosomas PLGA, se realizó un Western blot en condiciones denaturantes empleando un anticuerpo que reconoce la cadena β de moléculas MHC clase II. Según lo reportado en la literatura, esta glicoproteína integral de membrana posee un peso molecular aproximado de 25-30 kDa (McMillan y col., 1981; Bhattacharya y col., 1981; Cresswell, 1994).

En la figura 2 se observa una banda de aproximadamente 29 kDa que corresponde a la cadena β del complejo mayor de histocompatibilidad clase II.

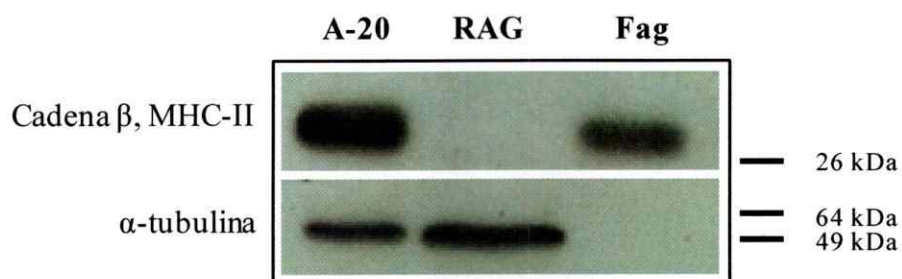


Figura 2. Fagosomas PLGA contienen moléculas MHC-II. Se determinó la presencia de moléculas MHC-II en los fagosomas PLGA mediante Western blot. 20 μ g de proteína total de fagosomas PLGA (Fag), lisado celular de A-20 (A-20, control positivo) y lisado celular de RAG (RAG, control negativo) fueron separadas por SDS-PAGE al 12% y la detección de moléculas MHC-II se realizó utilizando un anticuerpo policlonal anti-IA β haplotipo d. Como control de carga se empleó un anticuerpo anti- α -tubulina. Resultado representativo de tres experimentos independientes.

3.3 Los fagosomas PLGA alogénicos son fagocitados *in vivo* por células CD11c⁺ de bazo de ratones receptores

Se determinó la localización de los fagosomas PLGA de BALB/c al ser inyectados vía intravenosa en ratones C57BL/6. Para ello los fagosomas PLGA fueron previamente marcados con PKH26, un fluoróforo lipofílico que se incorpora de manera estable no covalente a membranas celulares (Horan y Slezak, 1989; Fischer y Andreas, 2003). Al cabo de 4, 24 y 48 hrs después de la inyección, se evaluó mediante citometría de flujo la presencia de este fluoróforo en células de ganglios periféricos, ganglio mesentérico y bazo de los ratones inyectados.

El mayor porcentaje de células PKH26⁺ fue detectado luego de 48 hrs post inyección de los fagosomas PLGA alogénicos, correspondiendo a un 1% del total de células en el bazo, y a todos los tiempos estudiados se observó que las células que los fagocitan migran sólo al bazo (Figura 3).

Además, los fagosomas PLGA alogénicos fueron fagocitados únicamente por células CD11c⁺, dado que sólo estas células presentan fluorescencia de PKH26 (Figura 4A). Dentro de las células positivas para este fluoróforo se observaron células con expresión moderada para CD11c, correspondientes a macrófagos dado que presentaron alta expresión del marcador F4/80 (Figura 4B).

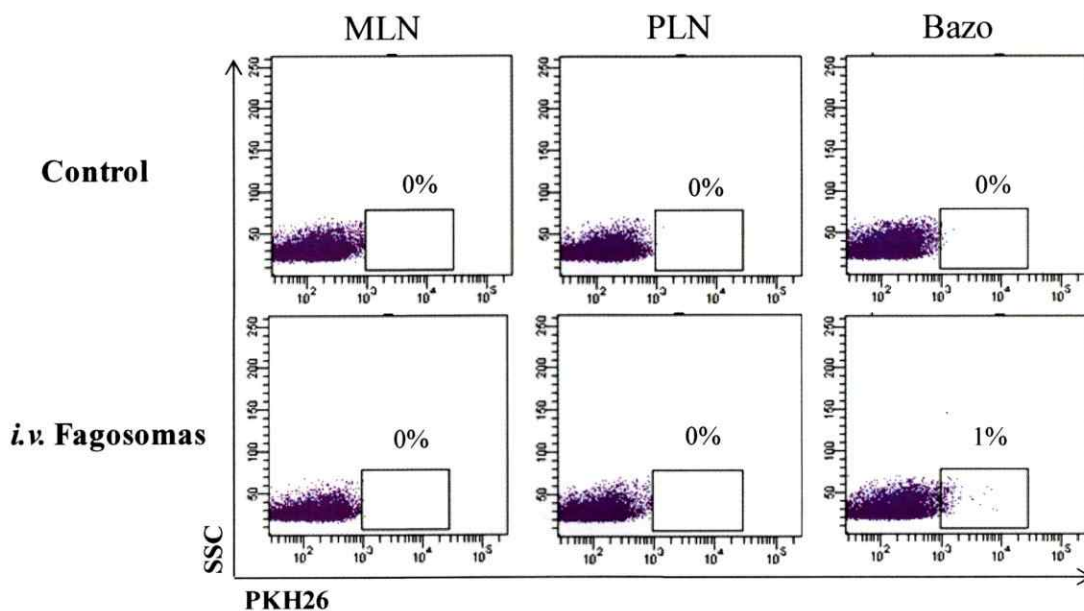


Figura 3. Distribución de fagosomas PLGA alogénicos en ratones receptores.

300 μ g de proteína total de fagosomas PLGA de BALB/c marcados con el fluoróforo PKH26 se inyectaron vía intravenosa en ratones C57BL/6. Luego de 48 hrs se analizó mediante citometría de flujo la presencia de PKH26 en células de ganglio mesentérico (MLN), ganglios periféricos (PLN) y bazo del ratón receptor. Resultados representativos de 5 experimentos independientes.

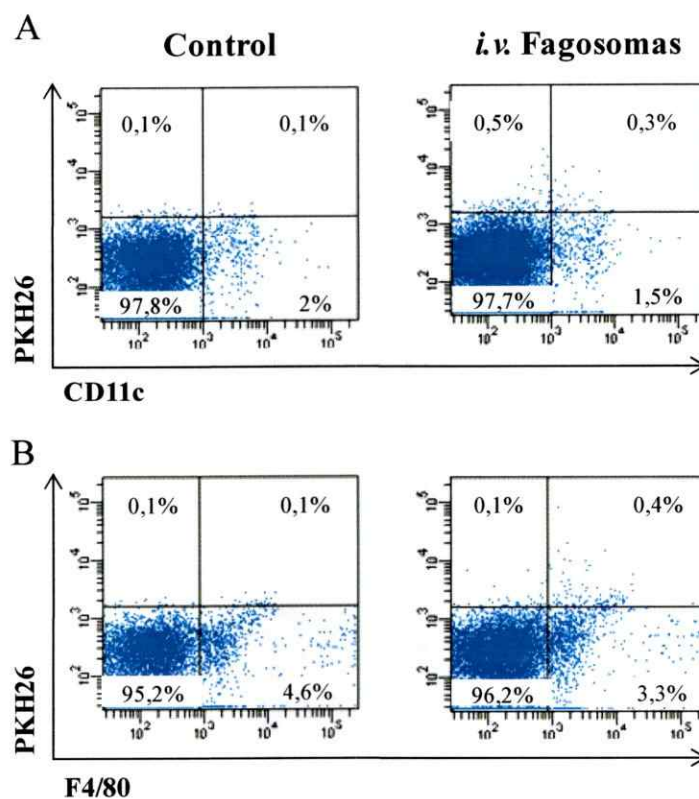


Figura 4. Fagosomas PLGA alogénicos son fagocitados por células $CD11c^+$ de bazo.

300 μ g de proteína total de fagosomas PLGA de BALB/c marcados con el fluoróforo PKH26 se inyectaron vía intravenosa en ratones C57BL/6. Luego de 48 hrs se analizó mediante citometría de flujo la presencia de PKH26 en esplenocitos del ratón receptor. Los esplenocitos fueron incubados con anticuerpos específicos para CD11c y F4/80. Los números al interior de cada gráfico representan el porcentaje de células en cada cuadrante. Resultados representativos de 3 experimentos independientes.

3.4 La incorporación de fagosomas PLGA alogénicos *in vivo* no induce la activación de las células CD11c⁺ que los fagocitan

Dado que sólo las células CD11c⁺ de bazo fagocitaron fagosomas PLGA alogénicos *in vivo*, nos propusimos determinar el fenotipo de estas células para establecer si la incorporación de éstos puede activarlas. Para esto, se inyectaron 150 µg de proteína total de fagosomas PLGA de BALB/c marcados con PKH26 en ratones C57BL/6 y luego de 48 hrs se aislaron las células CD11c⁺ del bazo mediante separación inmunomagnética. Como control de activación, ratones C57BL/6 se inyectaron *i.v.* con 30 µg de LPS.

La figura 5 muestra el fenotipo de las células dendríticas de los animales bajo los distintos tratamientos, para los marcadores de activación MHC-II, CD86, CD80, CD83 y CD40. Se observa que el tratamiento con fagosomas PLGA no induce a un aumento de la intensidad media de fluorescencia (IMF) para ninguno de los marcadores analizados comparado con el control no tratado, mientras que en los ratones tratados con LPS, se observa un aumento de la expresión de los marcadores estudiados (Tabla 1). Por lo tanto el tratamiento de las DC con fagosomas PLGA alogénicos no induce cambios en el estado de activación de las DC, siendo éstas capaces de activarse en presencia de LPS.

Del mismo modo, se analizó el fenotipo de los macrófagos de bazo (CD11c^{mid} F4/80^{hi}), los cuales también presentaron fluorescencia del fluoróforo PKH26. La figura 6 muestra que en estas células tampoco cambia la expresión de los marcadores MHC-II, CD86 y CD80 cuando se inyectan fagosomas PLGA alogénicos, en comparación con el

control no tratado, mientras que los macrófagos de los animales inyectados con LPS si sufren un aumento de la expresión de estos marcadores (Tabla 2).

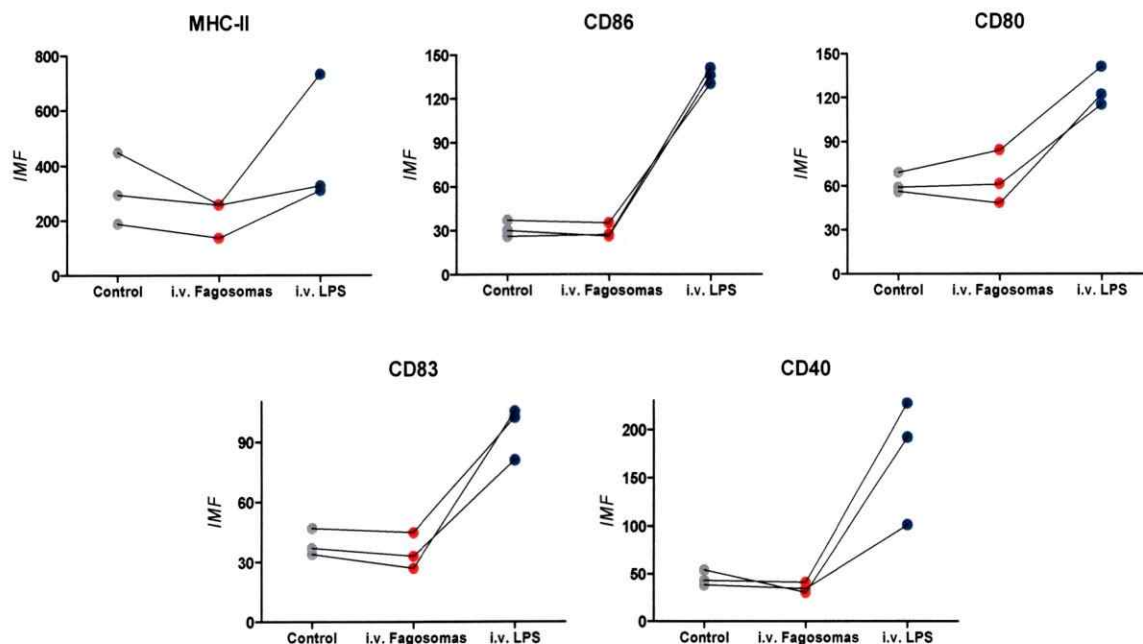


Figura 5. La incorporación de fagosomas PLGA alogénicos *in vivo* no induce la activación de las células dendríticas de bazo. 150 μ g de proteína total de fagosomas PLGA de BALB/c marcados con el fluoróforo PKH26 se inyectaron vía intravenosa en ratones C57BL/6. Luego de 48 hrs se analizó mediante citometría de flujo el fenotipo de las células dendríticas. Como control de activación, ratones C57BL/6 se inyectaron *i.v.* con 30 μ g de LPS. El análisis mostrado se realizó en una ventana para las células CD11c positivas. Los gráficos muestran la intensidad media de fluorescencia de 3 experimentos independientes.

Tabla 1. Efecto de la incorporación de fagosomas PLGA alogénicos en la activación de las células dendríticas de bazo.

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
	<i>Control</i>	<i>Fagosomas</i>	<i>LPS</i>	<i>Control</i>	<i>Fagosomas</i>	<i>LPS</i>	<i>Control</i>	<i>Fagosomas</i>	<i>LPS</i>
MHC-II	448	258	733	294	257	327	188	136	310
CD86	30	26	136	37	35	130	26	27	141
CD80	69	84	141	59	61	115	56	48	122
CD83	34	27	105	47	45	102	37	33	81
CD40	54	30	192	43	41	227	38	34	101

Análisis detallado del experimento mostrado en la figura 5. El análisis se realizó en una ventana de células CD11c positivas. Los datos indican la intensidad media de fluorescencia de 3 experimentos independientes.

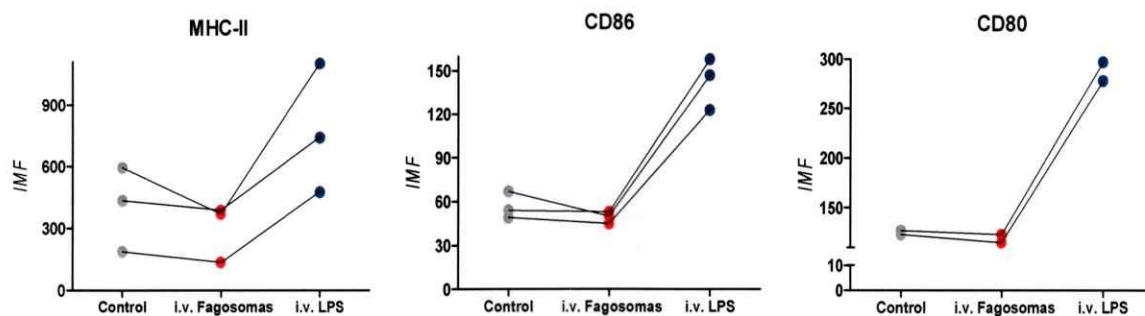


Figura 6. La incorporación de fagosomas PLGA alogénicos *in vivo* no induce la activación de macrófagos de bazo. 150 μ g de proteína total de fagosomas PLGA de BALB/c marcados con el fluoróforo PKH26 se inyectaron vía intravenosa en ratones C57BL/6. Luego de 48 hrs se analizó mediante citometría de flujo el fenotipo de los macrófagos. Como control de activación, ratones C57BL/6 se inyectaron *i.v.* con 30 μ g de LPS. El análisis mostrado se realizó en una ventana para las células F4/80 positivas. Los gráficos muestran la intensidad media de fluorescencia de 3 experimentos independientes.

Tabla 2. Efecto de la incorporación de fagosomas PLGA alogénicos en la activación de macrófagos de bazo.

	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3		
	<i>Control</i>	<i>Fagosomas</i>	<i>LPS</i>	<i>Control</i>	<i>Fagosomas</i>	<i>LPS</i>	<i>Control</i>	<i>Fagosomas</i>	<i>LPS</i>
MHC-II	594	370	1.104	435	389	742	188	136	478
CD86	67	50	147	54	53	158	49	45	123
CD80	127	123	297	123	115	278	---	---	---

Análisis detallado del experimento mostrado en la figura 6. El análisis se realizó en una ventana para las células F4/80 positivas. Los datos indican la intensidad media de fluorescencia de 3 experimentos independientes.

3.5 La incorporación de fagosomas PLGA alogénicos *in vivo* disminuye la respuesta inmune humoral y celular

Los resultados anteriores demuestran que el tratamiento con fagosomas PLGA alogénicos no induce la activación de las células que los fagocitan, por lo que a continuación evaluamos el efecto de este tratamiento sobre la respuesta inmune humoral y celular. Para esto se inyectaron *i.v.* 150 µg de fagosomas PLGA de BALB/c en ratones C57BL/6 (día 0) y a los días 7 y 14 los ratones fueron inmunizados con esplenocitos de ratones BALB/c. Siete días después de la última inmunización se midieron los niveles de aloanticuerpos circulantes en suero por citometría de flujo y el número de linfocitos T alorreactivos, midiendo la secreción de IFN-γ mediante ELISPOT.

Los resultados indican que el tratamiento con fagosomas PLGA alogénicos disminuyó de manera significativa los niveles de aloanticuerpos, donde la IMF alcanzó un valor promedio de 1.675 ± 262 , en comparación con el grupo de ratones inmunizados sin tratamiento previo con fagosomas PLGA, en donde alcanzó un valor promedio de 3.101 ± 289 (ANOVA una vía, $p < 0,0001$; Figura 7). Estos valores se traducen en un 46% de reducción de los niveles de aloanticuerpos circulantes.

De la misma manera, el número de linfocitos T alorreactivos en el grupo de animales tratados con fagosomas PLGA alogénicos disminuyó de manera significativa, observándose un promedio de 63 ± 10 spots, en comparación con el grupo de ratones sólo inmunizados donde se obtuvieron 127 ± 13 spots (ANOVA una vía, $p < 0,0001$; Figura 8). Estos valores representan una reducción de un 50% en el número de células

secretoras de IFN- γ , efecto atribuible al tratamiento con fagosomas PLGA alogénicos previo a dos inmunizaciones.

Estos resultados sugieren que el tratamiento con fagosomas PLGA alogénicos tiene un efecto regulador sobre la respuesta inmune humoral y celular.

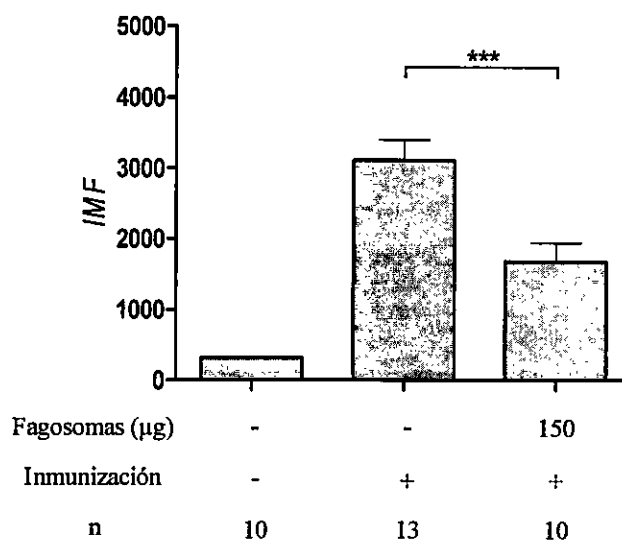


Figura 7. Los fagosomas PLGA alogénicos disminuyen los niveles de aloanticuerpos en sueros *in vivo*. Análisis mediante citometría de flujo de sueros de ratones C57BL/6 tratados con fagosomas PLGA de BALB/c e inmunizados dos veces con esplenocitos de BALB/c. n: número de ratones por grupo. Los resultados representan el promedio de los datos \pm SEM. (ANOVA una vía, Tukey post-test: *** $p < 0,001$).

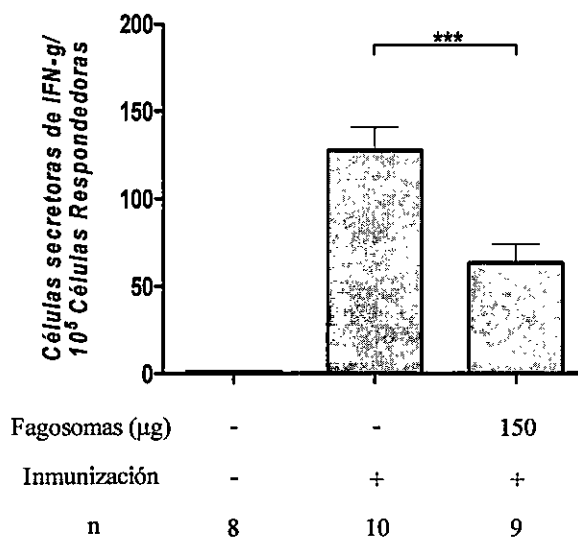


Figura 8. Los fagosomas PLGA alogénicos disminuyen el número de linfocitos T alorreactivos *in vivo*. Cuantificación de células secretoras de IFN- γ mediante ELISPOT en esplenocitos de ratones C57BL/6 tratados con fagosomas PLGA de BALB/c e inmunizados dos veces con esplenocitos de BALB/c. n: número de ratones por grupo. Los resultados representan los valores promedio de spots de pocillos en triplicado \pm SEM luego de la sustracción de la producción espontánea de IFN- γ . (ANOVA una vía, Tukey post-test: ***p<0,001).

4. DISCUSIÓN

Las células dendríticas cumplen un rol dual dentro del sistema inmune ya que bajo condiciones de infección e inflamación llevan al desarrollo de una respuesta efectora, mientras que en un ambiente no inflamatorio, con baja expresión de moléculas estimuladoras y con secreción principalmente de citoquinas inhibitorias, conducen a un estado de tolerancia (Morelli y Thomson, 2007). En este estado, las DC mantienen un fenotipo inmaduro. Cuando una DC inmadura presenta antígenos a linfocitos T se produce anergia, lo que conduce a una inhabilidad del LT para proliferar debido a la falta de una segunda señal de estimulación. También se puede inducir la generación de linfocitos T reguladores, los cuales aumentan la tolerancia pues suprimen la respuesta efectora de LT. Diversos grupos de investigadores han tratado de sacar ventaja de estas características, intentando manipular estos mecanismos para obtener tolerancia a trasplante (Steinman y col., 2003; Ureta y col., 2007; Moore y col., 2010).

La inducción de tolerancia a trasplante constituye uno de los mayores desafíos que enfrenta la inmunología y para cumplir esta meta, todas las células T que son potencialmente reactivas a los antígenos trasplantados necesitan ser “apagadas”, lo que implica delección, anergia o supresión mediada por LTreg.

En nuestro laboratorio hemos generado un protocolo que permite obtener células dendríticas inmaduras a partir de precursores de médula ósea en presencia del sobrenadante de la línea celular J558L. Estas células presentan alta capacidad fagocítica

y al ser estimuladas con distintos estímulos bacterianos responden secretando citoquinas tales como IL-2, IL-12 e IL-10 (Pino, 2005).

En base a estos antecedentes nos propusimos obtener vesículas fagocíticas llamadas fagosomas entregándole a las DC inmaduras microesferas de PLGA para fagocitar. Este copolímero es biocompatible y biodegradable, y estas propiedades lo convierten en una herramienta muy útil para su utilización con diversos fines en humanos ya que su degradación es inocua y no provoca la activación de una respuesta inmune, característica esencial en el área de trasplantes. Las partículas de PLGA están aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration) y son utilizadas en humanos y animales como método para liberar antibióticos, inmunosupresores o incluso en terapia anti-tumoral (Mader y col., 1997; Jhunjhunwala y col., 2009; Goforth y col., 2009).

En este trabajo demostramos mediante Western Blot que los fagosomas de PLGA obtenidos a partir de ratones BALB/c poseen moléculas MHC-II (Figura 2). Además demostramos por citometría de flujo la presencia de moléculas MHC-I y CD86 (Ramírez, 2011).

Para investigar el efecto *in vivo* de los fagosomas PLGA alogénicos, marcamos estas partículas con el colorante fluorescente PKH26, de esta manera fuimos capaces de seguir *in vivo* el efecto de la fagocitosis de estas partículas. Luego de 48 hrs de inyectar fagosomas PLGA alogénicos marcados con PKH26 vía intravenosa, se observó que estas partículas fueron fagocitadas sólo por células presentes en el bazo (Figura 3). Esto concuerda con las evidencias que demuestran que este órgano es el mayor filtro de la sangre en el cuerpo gracias a la estructura especializada del sistema venoso en la pulpa

roja, lo que le confiere la capacidad de filtrar la sangre y remover eritrocitos viejos (Mebius y Kraal, 2005). El hecho de encontrar los fagosomas PLGA alogénicos solo en el bazo sugiere que estas partículas o bien no ingresan al sistema linfático o que las DC encontradas en los ganglios periféricos tienen una baja capacidad fagocítica como ha sido reportado en la literatura (Wilson y col., 2003). En este sentido, se ha demostrado que aproximadamente el 50% del total de DC encontradas en ganglios periféricos presentan un fenotipo maduro (Wilson y col., 2003) y aunque históricamente se ha asociado baja capacidad fagocítica a las DC maduras (Banchereau y col., 2000), una publicación reciente sugiere lo contrario (Drutman y Trombetta, 2010).

Por otra parte observamos (Figuras 3 y 4) que alrededor de un 1% de los esplenocitos presentaban la fluorescencia de PKH26, lo cual se ajusta a la proporción existente de células dendríticas en estado estacionario en el bazo de un ratón en condiciones estándar (Merad y Manz, 2009). Cabe destacar que se observaron células con expresión moderada para CD11c que también fagocitaron fagosomas PLGA, estas células corresponden probablemente a macrófagos dado que expresaron el marcador F4/80, aunque está reportado que un subtipo de DC en el bazo ($CD4^+CD8^-$) expresan este marcador, por lo que no podemos descartar que estas células correspondan a este subtipo de DC (Leenen y col., 1998; Kamath y col., 2000; Taylor y col., 2005).

El principal interés de este trabajo es la utilización de los fagosomas PLGA alogénicos como un medio para transportar aloantígenos en forma tolerogénica. Por lo tanto, el siguiente paso fue determinar si los fagosomas PLGA alogénicos administrados vía intravenosa podían activar a las células que los fagocitan. La maduración de las DC

tiene asociado varios cambios fenotípicos que resultan en un aumento en la habilidad para procesar antígenos y activar a los LT. Estos cambios fenotípicos incluyen aumento en la producción de complejos péptidos-moléculas MHC, aumento de la expresión de moléculas de co-estimulación y unión a LT y la producción *de novo* de factores de crecimiento como IL-2, IL-12p70, quimioquinas y citoquinas (Steinman y col., 2003). En las figuras 5 y 6 se muestra el fenotipo de activación de las células dendríticas y macrófagos de bazo respectivamente, 48 hrs después de la inyección de fagosomas PLGA. En ambos casos se observa que el tratamiento con fagosomas PLGA alogénicos no indujo la activación de las células, al comparar la intensidad media de fluorescencia de las células para los marcadores de activación MHC-II, CD86, CD80, CD83 y CD40 en DC y macrófagos de ratones control e inyectados con fagosomas PLGA. Es más, para el caso de MHC-II tanto en DC como en macrófagos y CD40 en DC, se observa una ligera tendencia a la disminución de la intensidad media de fluorescencia luego de la inyección de fagosomas PLGA. En DC inmaduras, las moléculas MHC-II son rápidamente internalizadas y tienen una vida media corta, la maduración mediante un estímulo inflamatorio conduce a un aumento explosivo en la síntesis y traslocación de complejos MHC-II/péptidos hacia la superficie celular donde permanecen estables por días disponibles para el reconocimiento de LT CD4⁺ (Banchereau y col., 2000; Steinman y Banchereau, 2007). Por otro lado, está demostrado que la señalización vía CD40 induce cambio en las DC que las convierten en células presentadoras de antígenos más eficientes, como aumento en la expresión de moléculas MHC-II y moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 (Elgueta y col., 2009; Ma y Clark, 2009). Así, dado

que la inducción de la expresión de ambas moléculas es importante para la activación de las DC, una disminución de su expresión podría ser indicativo de un estado tolerogénico. Por otra parte, demostramos que estos mismos tipos celulares en animales tratados con LPS de manera intravenosa son capaces de activarse y aumentar la expresión de estos marcadores de activación. Estos resultados sugieren que las proteínas del donante presentes en los fagosomas PLGA podrían estar siendo procesadas y presentadas en un contexto no inflamatorio, ya que no activan a las células que los fagocitan.

Finalmente, puesto que el objetivo a largo plazo de este proyecto es la utilización de los fagosomas PLGA para la inducción de tolerancia antígeno específica en trasplante, evaluamos si la fagocitosis de los fagosomas PLGA alogénicos tiene algún efecto en la respuesta inmune humoral y celular *in vivo*. Para ello, inyectamos *i.v.* fagosomas PLGA derivados de ratones BALB/c en ratones C57BL/6 como tratamiento previo a la inmunización con esplenocitos de BALB/c. Los resultados muestran una disminución en un 46% de los niveles de aloanticuerpos circulantes (Figura 7) y una reducción en el número de LT alorreactivos de un 50% (Figura 8) al comparar los animales tratados con fagosomas PLGA antes de la inmunización versus aquellos que sólo fueron inmunizados, sugiriendo que el tratamiento con fagosomas PLGA alogénicos tiene un efecto regulador sobre la respuesta inmune humoral y celular. Más aún, en otros experimentos realizados en nuestro laboratorio, se observa que este efecto es antígeno específico, dado que la administración de fagosomas PLGA no afecta la reactividad en contra de una tercera cepa (Ramírez, 2011).

A pesar de lo prometedor de estos resultados, existe un punto débil en la obtención de los fagosomas PLGA. Primero, la preparación de los fagosomas PLGA alogénicos necesita de células dendríticas inmaduras para producir la partícula recubierta de la membrana plasmática de la célula fagocítica. Aunque hemos estudiado con rigurosidad las proteínas presentes en la superficie de estas células, aún pueden quedar muchas proteínas sin ser identificadas. Cada día resulta más compleja la caracterización del estado de madurez e inmadurez de las DC. En segundo lugar, la preparación de las células dendríticas donante de aloantígenos contiene en general un contaminante de alrededor de 20% de células CD11c negativas. Quizás aumentando la pureza de las DC puedan mejorarse los resultados. Por último, la obtención de los fagosomas PLGA se hace por disrupción mecánica de las células y esto introduce una fuente de variabilidad difícil de manejar. Por estas razones en nuestro laboratorio se están diseñando protocolos mejorados para la producción de fagosomas PLGA, que permitan obtener un mayor rendimiento y pureza. Estos protocolos incluyen producir la disrupción de las células mediante shock osmótico y/o aumentar la pureza de los fagosomas PLGA mediante *cell sorting*.

Otro punto que debería ser abordado en el futuro conciernen los mecanismos que están siendo utilizados para producir tolerancia. Lo más probable es que los fagosomas PLGA intervengan a nivel de tolerancia periférica, quizás en la inducción de LT reguladores, aunque esto no ha sido demostrado aún. Otro mecanismo de acción probable es la inducción de anergia en los LT cuando estos interactúan con DC que no presentan moléculas coestimuladoras. En este sentido, Vendetti y col. (Vendetti y col.,

2000) establecieron que LT anérgicos pueden además inhibir la función presentadora de antígeno de las DC, y demostraron mediante ensayos en Transwell que esto ocurre por un mecanismo dependiente de contacto. Nuestros resultados indican que los fagosomas PLGA no inducen la expresión de marcadores de activación en las células que los fagocitan, por lo que estas células podrían estar induciendo anergia en los LT. Según lo propuesto por Vendetti, esto podría llevar a un proceso con retroalimentación positiva, es decir, estos LT anérgicos podrían ejercer un efecto inhibitorio sobre otras DC que estén presentando antígenos. Tampoco se puede descartar que los fagosomas PLGA estén induciendo la generación de LTreg, pero en todo caso ambos mecanismos, anergia y supresión, no son excluyentes y ambos dados simultáneamente potencian de forma poderosa la inducción de tolerancia periférica.

Una de las metodologías actualmente utilizadas para inducir tolerancia consiste en la liberación *in situ* de alo-antígenos del donante en los órganos linfoides secundarios del receptor, sin producir un estado inflamatorio. De esta manera, se evita la activación de las DC, manteniendo o incluso exacerbando su habilidad para inducir tolerancia. En este sentido, se han usado dos sistemas de administración de antígenos que presentan baja inmunogenicidad en trasplantes: células apoptóticas y exosomas derivados de células dendríticas del donante. Se ha demostrado que las células dendríticas fagocitan eficientemente células del donante en estadio de apoptosis temprana, y pueden aumentar la supervivencia de un trasplante heterotópico de corazón en ratones, disminuyendo la respuesta alo-reactiva de linfocitos T vía delección de LT e inducción de LTregs (Wang y col., 2006). Este mismo grupo de investigadores demostró que estas células apoptóticas

disminuyen el alo-reconocimiento vía indirecta y reducen la vasculopatía en trasplantes de válvulas aórticas alogénicas (Wang y col., 2009). Sin embargo, un punto en contra de esta estrategia es que los métodos de inducción de apoptosis tienen distintos efectos dependiendo de la etapas del ciclo celular en que se encuentre la célula, esto implica efectos variables cuando las células no están sincronizadas en su ciclo celular, lo que podría originar complicaciones si se originan células en apoptosis tardía o células necróticas que inducirían más bien inmunidad en vez de tolerancia (Gleisner, 2009).

Por su parte, los exosomas también están siendo usados como vehículos presentadores de alo-antígenos, dado que poseen moléculas MHC en su superficie, así como moléculas co-estimuladoras y de adhesión. Pêche y col. (Pêche y col., 2006) demostraron que los exosomas alogénicos pueden regular la respuesta inmune aumentando la supervivencia de trasplantes de corazón heterotópicos en ratas. Sin embargo, para ello utilizaron un agente bloqueador de la maduración de las células dendríticas del receptor y además, observaron que un exceso de exosomas alogénicos puede conducir a inmunidad, provocando el rechazo del injerto. Además, existen trabajos que muestran el efecto inmune inductor de exosomas, por lo que faltan estudios que estandaricen la dosis y la fuente de estas partículas (Théry y col., 2002; De La Peña y col., 2009). Estas observaciones, sumado al hecho de que su purificación es bastante difícil debido a su tamaño inferior a 100 nm, representan un obstáculo para su traslado al uso clínico.

Por otro lado, el trasplante de médula ósea de donante previo a un trasplante de órgano está tomando bastante relevancia hoy en día. El propósito de esta estrategia es lograr un estado de quimerismo mixto, en donde co-existan células hematopoyéticas del

donante y del receptor. Estos estudios están bastante avanzados, sobretodo en modelo murino, pero aún implican metodologías que no son sustentables para el uso humano, pues para que se establezca la anidación de la nueva médula es necesario someter a los receptores a terapias en que se eliminen las células hematopoyéticas de la médula ósea, a través de radiación (condiciones mieloablativas) o bloqueando las vías de co-estimulación mediadas por CD40 ó CD80/86, o activando vías tolerogénicas como CTLA-4 (condiciones no mieloablativas) en combinación con drogas inmunosupresoras (Kurtz y col., 2004; Gibbons y Sykes, 2008). En este contexto, en nuestro laboratorio se está ensayando si los fagosomas PLGA podrían ayudar a lograr la anidación de médula ósea del donante utilizando bajas dosis de radiación en modelo murino, así, interviniendo mecanismos de tolerancia central se podrían inducir mecanismos de tolerancia periférica que lleven a la aceptación de trasplantes de órganos sin la ayuda de inmunosupresores.

Por lo tanto, a la luz de los resultados presentados en este trabajo, los fagosomas PLGA se perfilan como un prometedor mecanismo para la inducción de tolerancia, actuando como un vehículo de administración de antígenos de manera no inmunogénica. El hecho de que el PLGA sea un material biodegradable *in vivo*, hace más fácil su traspaso al uso clínico en humanos.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente Seminario de Título indican que:

1. Células dendríticas generadas a partir de precursores de médula ósea en presencia del sobrenadante de la línea J558L fagocitan eficientemente microsferas de PLGA.
2. Los fagosomas obtenidos luego de la fagocitosis de microsferas de PLGA por células dendríticas derivadas de médula ósea son portadores de moléculas MHC-II.
3. La inyección vía intravenosa de fagosomas PLGA alogénicos produce la fagocitosis por células de bazo CD11c⁺ de ratones receptores.
4. La incorporación *in vivo* de fagosomas PLGA alogénicos no induce la activación de las células CD11c⁺.
5. Los fagosomas PLGA alogénicos disminuyen la respuesta inmune humoral y celular *in vivo*.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Arruda V. R., Favaro P. y Finn J. D. (2009). Strategies to modulate immune responses: a new frontier for gene therapy. *Mol Ther.* 17: 1492-1503.
- Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S. y Liu Y. (2000). Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767-811.
- Banchereau J., Paczesny S., Blanco P., Bennett L., Pascual V., Fay J. y Palucka K. (2003). Dendritic Cells: Controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 987: 180-187.
- Bedi D. S., Riella L. V., Tullius S. G. y Chandraker A. (2010). Animal models of chronic allograft injury: Contributions and limitations to understanding the mechanism of long-term graft dysfunction. *Transplantation* 90: 935-944.
- Bhattacharya A., Dorf M. E. y Springer T.A. (1981). A shared alloantigenic determinant on Ia antigens encoded by the I-A and I-E subregions: evidence for I region gene duplication. *J Immunol.* 127: 2488-2495.
- Blanco P., Palucka A.K., Pascual V. y Banchereau J. (2008). Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1: 41-52
- Bonham C. A., Peng L., Liang X., Chen Z., Wang L., Ma L., Hackstein H., Robbins P.D., Thomson A.W., Fung J.J., Qian S. y Lu L. (2002). Marked prolongation of cardiac allograft survival by dendritic cells genetically engineered with NF- κ B oligodeoxyribonucleotide decoys and adenoviral vectors encoding CTLA4-Ig. *J Immunol.* 169: 3382-3391.
- Cresswell P. (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 259-293.
- Dantal J. y Souillou J.P. (2005). Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med.* 352: 1371-1373.
- De La Peña H., Madrigal J. A., Rusakiewicz S., Bencsik M., Cave G. W. V., Selman A., Rees R.C., Travers P.J. y Dodi I.A. (2009). Artificial exosomes as tools for basic and clinical immunology. *J Immunol Methods* 344: 121-132.

- Drutman S. B. y Trombetta E. S. (2010). Dendritic Cells continue to capture and present antigens after maturation in vivo. *J Immunol.* 185: 2140-2146.
- Elgueta R., Benson M.J., de Vries V.C., Wasiuk A., Guo Y. y Noelle R.J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev.* 229:152-72.
- Finkelman F., Lees A., Birnbaum R., Gause W. C. y Morris, S. C. (1996). Dendritic Cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J Immunol.* 157: 1406-1414.
- Fischer K. y Andreas M. (2003). The flow cytometric PKH-26 assay for the determination of T-cell mediated cytotoxic activity. *Methods* 31: 135-142.
- Gibbons C. y Sykes M. (2008). Manipulating the immune system for anti-tumor responses and transplant tolerance via mixed hematopoietic chimerism. *Immunol Rev.* 223: 334-360.
- Gleisner M.A. (2009). Modulación de la respuesta inmune por Vitamina D3 y células apoptóticas. Memoria de título. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Goforth R., Salem A. K., Zhu X., Miles S., Zhang X., Lee J. H. y Sandler A.D. (2009). Immune stimulatory antigen loaded particles combined with depletion of regulatory T-cells induce potent tumor specific immunity in a mouse model of melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 58: 517-530.
- Griesemer A. D., Sorenson E. C. y Hardy M.A. (2010). The role of the thymus in tolerance. *Transplantation* 90: 465-474.
- Hackstein H. y Thomson A.W. (2004). Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol.* 4: 24-34.
- Harshyne L. A., Watkins S. C., Gambotto A. y Barratt-Boyes S. M. (2001). Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol.* 166: 3717-3723.
- Herrera O. B., Golshayan D., Tibbott R., Salcido F., James M. J., Marelli-Berg F. M. y Lechler R. I. (2004). A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol.* 173: 4828-4837.

Hill J. A., Ichim T. E., Kusznierek K. P., Li M., Huang X., Yan X., Zhong R., Cairns E., Bell D.A. y Min W. (2003). Immune modulation by silencing IL-12 production in dendritic cells using small interfering RNA. *J Immunol.* 171: 691-696.

Horan P. K. y Slezak, S. E. (1989). Stable cell membrane labelling. *Nature* 340: 167-168.

Jhunjhunwala S., Raimondi G., Thomson A. W. y Little S. R. (2009). Delivery of rapamycin to dendritic cells using degradable microparticles. *J Control Release* 133: 191-197.

Kamath A. T., Pooley J., O'Keeffe M. A., Vremec D., Zhan Y., Lew A. M., D'Amico A., Wu L., Tough D.F. y Shortman K. (2000). The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J Immunol.* 165: 6762-6770.

Kurtz J., Wekerle T. y Sykes M. (2004). Tolerance in mixed chimerism - a role for regulatory cells?. *Trends Immunol.* 25: 518-523.

Kushwah R., Oliver J. R., Zhang J., Siminovitch K. A. y Hu, J. (2009). Apoptotic dendritic cells induce tolerance in mice through suppression of dendritic cell maturation and induction of antigen-specific regulatory T cells. *J Immunol.* 183: 7104-7118.

Leenen P. J. M., Radosević K., Voerman J. S. A., Salomon B., Rooijen N., Klatzmann D. y van Ewijk W. (1998). Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J Immunol.* 160: 2166-2173.

Liu K. y Nussenzweig M. C. (2010). Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev.* 234: 45-54.

Liu Y. J. (2001). Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106: 259-262.

Ma D.Y. y Clark E.A. (2009). The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin Immunol.* 21:265-272.

Mader J. T., Calhoun J. y Cobos, J. (1997). In vitro evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated biodegradable beads and polymethylmethacrylate beads. *Antimicrob Agents Chemother.* 41: 415-418.

McMillan M., Frelinger J. A., Jones P. P., Murphy D. B., McDevitt H. O. y Hood L. (1981). Structure of murine Ia antigens. Two-dimensional electrophoretic analyses and

high pressure liquid chromatography tryptic peptide maps of products of the I-A and I-E subregions and of an associated invariant polypeptide. *J Exp Med.* 153: 936-950.

Mebius R. E. y Kraal G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat Rev. Immunol.* 5: 606-616.

Merad M. y Manz M. G. (2009). Dendritic cell homeostasis. *Blood* 113: 3418-3427.

Moore C., Sauma D., Reyes P. A., Morales J., Roseblatt M., Bono M. R. y Fierro J.A. (2010). Dendritic cells and B cells cooperate in the generation of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ allogeneic T cells. *Transplant Proc.* 42: 371-375.

Morelli A.E., Larregina A.T., Shufesky W.J., Sullivan M. L. G., Stolz, D. B., Papworth G. D., Zahorchak A. F., Logar A. J., Wang Z., Watkins S. C., Falo L. D. Jr y Thomson A. W. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104: 3257-3266.

Morelli A. E. y Thomson A. W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol.* 7: 610-621.

Ohnmacht C., Pullner A., King S. B. S., Drexler I., Meier S., Brocker T. y Voehringer D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med.* 206: 549-559.

Pino K. (2005). Caracterización fenotípica y funcional de células dendríticas de médula ósea. Memoria de título. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Piqueras B., Connolly J., Freitas H., Palucka A. K. y Banchereau J. (2006). Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. *Blood* 107: 2613-2618.

Pothoven K. L., Kheradmand T., Yang Q., Houlihan J. L., Zhang H., DeGutes M., Miller S. D. y Luo X. (2010). Rapamycin-conditioned donor dendritic cells differentiate CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells in vitro with TGF-β1 for islet transplantation. *Am J Transplant.* 10: 1774-1784.

Pêche H., Renaudin K., Beriou G., Merieau E., Amigorena S. y Cuturi M. C. (2006). Induction of tolerance by exosomes and short-term immunosuppression in a fully MHC-mismatched rat cardiac allograft model. *Am J Transplant.* 6: 1541-1550.

Ramírez V. (2011). Intervención de los mecanismos de tolerancia periférica para la modulación de la respuesta inmune alogénica. Tesis de Magister. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T. y Ono M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133: 775-787.

Schwartz R. H. (2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol.* 21: 305-334.

Shortman K. y Liu Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2: 151-161.

Shortman K. y Naik S. H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol.* 7: 19-30.

Steinman R. M., Turley S., Mellman I. y Inaba K. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med.* 191: 411-416.

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

Steinman R. M. y Banchereau J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449: 419-426.

Suzuki M., Zheng X., Zhang X., Li M., Vladau C., Ichim T. E., Sun H., Min L. R., Garcia B. y Min W. (2008). Novel vaccination for allergy through gene silencing of CD40 using small interfering RNA. *J Immunol.* 180: 8461-8469.

Sykes M. (2007). Immune tolerance: mechanisms and application in clinical transplantation. *J Inter Med.* 262: 288-310.

Tanriver Y., Ratnasothy K., Bucy R. P., Lombardi G. y Lechler R. (2010). Targeting MHC class I monomers to dendritic cells inhibits the indirect pathway of allorecognition and the production of IgG alloantibodies leading to long-term allograft survival. *J Immunol.* 184: 1757-1764.

Taylor A. L., Watson C. J. y Bradley J. A. (2005). Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hemat.* 56: 23-46.

Taylor P. R., Martinez-Pomares L., Stacey M., Lin H-H., Brown G. D. y Gordon, S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Ann Rev Immunol* 23: 901-944.

Thomson A. W., Turnquist H. R., Zahorchak, A. F. y Raimondi G. (2009). Tolerogenic dendritic cell-regulatory T cell interaction and the promotion of transplant tolerance. *Transplantation* 87: S86-90

Thomson A. W. (2010). Tolerogenic dendritic cells: all present and correct?. *Am J Transplant.* 10: 214-219.

Théry C., Duban L., Segura E., Véron P., Lantz O. y Amigorena S. (2002). Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol.* 3: 1156-1162.

Tiao M-M., Lu L., Tao R., Wang L., Fung J. J. y Qian S. (2005). Prolongation of cardiac allograft survival by systemic administration of immature recipient dendritic cells deficient in NF- κ B activity. *Ann Surg.* 241: 497-505.

Trombetta E. S. y Mellman I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23: 975-1028.

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

Ureta G., Osorio F., Morales J., Roseblatt M., Bono M. R. y Fierro J. A. (2007). Generation of dendritic cells with regulatory properties. *Transplant Proc.* 39: 633-637.

Vendetti S., Chai J. G., Dyson J., Simpson E., Lombardi G. y Lechler R. (2000). Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol.* 165: 1175-1181.

Wakkach A., Fournier N., Brun V., Breitmayer J-P., Cottrez F. y Groux H. (2003). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18: 605-617.

Wang Z., Larregina A. T., Shufesky W. J, Perone M.J., Montecalvo A., Zahorchak A.F., Thomson A.W. y Morelli A. E. (2006). Use of the inhibitory effect of apoptotic cells on dendritic cells for graft survival via T-cell deletion and regulatory T cells. *Am J Transplant.* 6: 1297-1311.

Wang Z., Shufesky W. J, Montecalvo A., Divito S. J., Larregina A. T. y Morelli A. E. (2009). In situ-targeting of dendritic cells with donor-derived apoptotic cells restrains indirect allorecognition and ameliorates allograft vasculopathy. *PloS One*, 4: e4940.

Wilson N. S., El-Sukkari D., Belz G. T., Smith C. M., Steptoe R. J., Heath W. R., Shortman K. y Villadangos J. (2003). Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* 102: 2187-2194.

Yamazaki S., Dudziak D., Heidkamp G. F., Fiorese C., Bonito A. J., Inaba K., Nussenzweig M. C. y Steinman R. M. (2008). CD8⁺CD205⁺ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol.* 181: 6923-6933.

Yamazaki S. y Steinman R. M. (2009). Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Dermatol Sci.* 54: 69-75.

Young J. W., Merad M. y Hart D. N. J. (2007). Dendritic cells in transplantation and immune-based therapies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 13: 23-32.

Zhao Y. y Li X. (2010). Cross-immune tolerance: conception and its potential significance on transplantation tolerance. *Cell Mol Immunol.* 7: 20-25.