

UCH-FC  
Biología  
P(57)  
C-1



UNIVERSIDAD DE CHILE  
Facultad de Ciencias

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE CÉLULAS  
DENDRÍTICAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requerimientos

Para optar al título de



**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

POR

**KARINA DE LAS MERCEDES PINO LAGOS**

Abril 2005

Santiago-Chile

Directora de Tesis: DRA. MARÍA ROSA BONO M.



**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE CÉLULAS  
DENDRÍTICAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los  
requerimientos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**KARINA DE LAS MERCEDES PINO LAGOS**

**Directora De Memoria de Título**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'María Rosa Bono M.', written over a horizontal line.

Dra. María Rosa Bono M.

**Comisión Evaluadora de la Memoria de Título**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Miguel Allende', written over a horizontal line.

Dr. Miguel Allende (Pdte. Comisión)

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Christian González-Billault', written over a horizontal line.

Dr. Christian González-Billault



Santiago de Chile, 29 de abril 2005.

*La ciencia apenas sirve más  
que para darnos una idea de  
la extensión de nuestra ignorancia*  
Lamennais

## AGRADECIMIENTOS

Difícil no se quede alguien en el tintero porque son demasiadas a las personas que debo agradecer, considerando a todos aquellos que hicieron posible que terminara esta etapa...

Para comenzar quiero agradecer al lab de inmuno, todos sus integrantes actuales: la profe (María Rosa), el profe (Mario), Dr. Alberto Fierro, Dr. Jorge Morales, Leo, Vale, Eva, Dany, Carola, Raúl, Fernando, Pablo, Gonzalo, Jenny, Fabiola, Paula, Ale. A todos ellos, gracias por hacer del lab mi hogar, por las discusiones de todo tipo en la sala de seminarios, por la agradable estadía en el lugar de trabajo, por demostrarme el valor de las relaciones humanas. Además quiero agradecer a los que ya no están en el lab, como son Claudio Cortés y Lily.

A todos ellos, y especialmente a María Rosa, gracias por el apoyo no tan solo en lo académico, sino también en lo personal.

Paralelamente debo mencionar mi gratitud a mis compañeros de carrera con los que compartimos más que momentos de estudios, gracias a Pabla, Carola, Paula, Claudia, Karen, Mario, Loreto, Pato, Óscar, Jaime, a todos ellos gracias por el apoyo en los momentos más complicados.

Gracias a mi familia por el apoyo en el transcurso de la carrera. Especialmente a los "Lagos" por el soporte, la paciencia y por el cariño siempre expresado.

Gracias a mis amigas del colegio, a ese parcito que conocí hace más de 10 años... gracias Francis y Ani por ser mis compañeras de vida, por la paciencia y por entender el camino que elegí.

Gracias a mis papás por darme la vida. A mi mamá que, aunque nos dejó temprano, siempre permanece entre nosotras.

Final y especialmente, gracias a mi hermana, Cecilia, por ser mi almita gemela, por ser mi soporte incondicional, por la paciencia y darme fuerzas para seguir adelante.

## ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>9</b>
2.1 Obtención de Células Dendríticas de médula ósea .....	9
2.2 Análisis Fenotípico por Citometría de Flujo .....	10
2.3 Ensayo de Endocitosis.....	10
2.4 Reacción Linfocitaria Mixta.....	11
2.5 Cultivos Bacterianos .....	12
2.6 Activación de Células Dendríticas .....	12
2.7 Cinética de Activación y Lisados Celulares.....	13
2.8 Cuantificación de Proteínas.....	13
2.9 ELISA.....	14
2.10 Inmunoprecipitación.....	15
2.11 Western Blot.....	15
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>17</b>
3.1 Generación y Cultivo de Células Dendríticas .....	17
3.2 Capacidad Endocítica de las Células Dendríticas .....	21
3.3 Proliferación de Linfocitos T en respuesta a Células Dendríticas .....	23
3.4 Maduración de Células Dendríticas activadas con distintos estímulos microbianos .....	25
3.5 Análisis del Sobrenadante de la línea celular J558L.....	27
3.6 Células Dendríticas en respuesta pro-inflamatoria: secreción de IL-12 .....	29

3.7	Secreción de IL-2 por Células Dendríticas activadas con distintos estímulos microbianos.....	31
3.8	Células Dendríticas en respuesta anti-inflamatoria: secreción de IL-10.....	33
3.9	Cinética de Fosforilación de la vía ERK en Células Dendríticas.....	35
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>49</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Enriquecimiento de DC a partir de precursores de médula ósea después de 12 días de cultivo .....	19
<b>Figura 2.</b> La población de DC adherentes presenta un fenotipo inmaduro con respecto las DC en suspensión .....	20
<b>Figura 3.</b> DC adherentes presentan mayor capacidad endocítica que las DC en suspensión.....	22
<b>Figura 4.</b> DC en suspensión (fenotípicamente más maduras) son mejores estimuladoras de LT alogénicos en una MLR que las DC adherentes.....	24
<b>Figura 5.</b> El sobrenadante de las células J558L contiene IL-10.....	28
<b>Figura 6.</b> DC en suspensión secretan mayores niveles de IL-12 que DC adherentes. La vía ERK está involucrada en la secreción de esta citoquina.....	30
<b>Figura 7.</b> DC en suspensión y DC adherentes estimuladas con bacterias secretan altos niveles de IL-10. La vía ERK está involucrada en la secreción de esta citoquina.....	34
<b>Figura 8.</b> Cinética de fosforilación de la vía ERK en DC en suspensión y en DC adherentes .....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> DC diferenciadas con el sobrenadante de las células J558L no maduran en respuesta a bacterias o sus componentes puros .....	26
<b>Tabla 2.</b> DC en suspensión y DC adherentes secretan IL-2. La vía ERK es fundamental en la secreción de esta citoquina .....	32



## ABREVIATURAS

Ag:	Antígeno
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
BSA:	Seroalbúmina de Bovino
CpG:	dinucleótidos de Citosina-fosfato-Guanina
CFSE:	<i>Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
DC :	Células dendríticas
DMEM :	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
EDTA:	<i>Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic acid</i>
EGTA:	<i>Ethylene glycol-bis tetraacetic acid</i>
ELISA :	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ERK :	Quinasa regulada por señal extracelular
FCS:	Suero fetal bovino
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF:	Factor estimulador de colonia granulocito-macrófago
IFN- $\gamma$ :	Interferón gamma
I $\kappa$ B :	Inhibidor de $\kappa$ B
IKK :	Quinasa de I $\kappa$ B
IL-12:	Interleuquina 12
IL-1R:	Receptor de IL-1
IRAK :	Quinasa asociada al receptor de IL-1
JNK:	Quinasa c-Jun N-terminal
LPS:	Lipopolisacárido
LT:	Linfocito T
LTA:	Ácido lipoteicoico
MAPK:	Proteína quinasa activada por mitógeno
M-CSF:	Factor estimulador de colonia de macrófagos
MHC-II:	Moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad
MKK:	Quinasa de MAPK

MLR:	Reacción linfocitaria mixta
Moi:	Multiplicidad de infección
NF $\kappa$ B:	Factor nuclear $\kappa$ B
NK:	<i>Natural killer</i>
PBS:	Tampón fosfato salino
PE:	Ficoeritrina
rpm:	Revoluciones por minuto
RPMI:	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
TCR:	Receptor de células T
Th1:	<i>T helper 1</i>
TIR:	Dominio Toll/IL-1R
TLR:	Receptores tipo Toll
TMB:	tetrametilbenzidina
TNF:	Factor de necrosis tumoral
TRAF6:	Factor 6 asociado al receptor de TNF
Zym:	Zymosan

## RESUMEN

Las células dendríticas (DC) son potentes células presentadoras de antígeno que juegan un rol clave durante la inducción de la respuesta inmune específica contra patógenos. Las DC inmaduras, localizadas en tejidos periféricos, son los “sensores inmunológicos” que monitorean a los patógenos, y entregan información a los linfocitos T (LT) en los órganos linfoides secundarios, iniciando la respuesta inmune. Para este propósito, las DC expresan en su membrana un amplio repertorio de receptores de reconocimiento de patógenos (PRR), los que incluyen a los receptores tipo Toll (Toll-like receptors, TLR), que reconocen componentes específicos del patógeno, tales como lipoproteínas (TLR2), lipopolisacáridos (TLR4) o ADN bacteriano (TLR9), entre otros. Los TLR entregan información a las DC a través de cascadas de señalización intracelulares, dentro de las cuales se han descrito 3 familias fundamentales de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK): ERK, JNK y MAPK p38.

El reconocimiento del patógeno por unión a algunos de estos receptores produce la activación y maduración de las DC y la migración desde los tejidos periféricos a los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, placas de Peyer, amígdalas, etc). Como resultado del proceso de maduración, las DC aumentan la expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras, como CD86, en su superficie. Además, disminuyen su capacidad endocítica y, dependiendo de la naturaleza del estímulo y del microambiente donde estas maduran, secretan diferentes citoquinas reguladoras de la respuesta inmune.

Debido a que las DC son poblaciones muy escasas en todos los órganos, la generación de ellas en cantidades suficientes para ser estudiadas, a partir de precursores hematopoyéticos

es un tema de investigación actual. Se han explorado diversos factores con el objeto de incrementar la producción o regular la maduración de las DC.

Basándose en lo anterior, el objetivo de esta tesis fue establecer las condiciones de cultivo celular que permitan obtener un gran número de células dendríticas a partir de precursores de médula ósea, y caracterizar fenotípica y funcionalmente las DC obtenidas. Los resultados indican que, luego de 12 días de cultivo de precursores de médula ósea de ratón en presencia del sobrenadante de las células J558L (fuente de GM-CSF), es posible identificar dos poblaciones celulares (DC en suspensión y DC adherentes) con características de DC por su expresión del marcador CD11c. Fenotípicamente las DC en suspensión presentan mayor expresión de moléculas MHC-II que las DC adherentes. Adicionalmente, las DC en suspensión expresan el marcador de maduración CD86, a diferencia de las DC adherentes que son negativas para esta molécula.

Al analizar la funcionalidad de ambos tipos de DC se observó que la población adherente tiene mayor capacidad endocítica que las DC en suspensión, mientras que en una reacción linfocitaria mixta no se observó diferencias entre ambos tipos de DC. El conjunto de estos resultados muestra que las DC adherentes tienen un fenotipo de DC inmaduras comparadas a las DC en suspensión.

Se estudió la respuesta de estas dos poblaciones de DC a estímulos bacterianos analizando el fenotipo y la secreción de citoquinas post-activación. No se observaron cambios en la expresión de superficie de moléculas MHC-II y CD86 en respuesta a estímulos con moléculas derivadas de microorganismos, como son LPS, LTA y Zymosan, ni a bacterias Gram positivas o Gram negativas. Cuando se analizó la producción de IL-2, IL-12 e IL-10 en respuesta a estos estímulos, se observó que el patrón de secreción fue similar en ambos tipos celulares, donde las DC adherentes sólo se diferenciaron de las DC en suspensión por

la menor cantidad de IL-12 secretada, citoquina pro-inflamatoria característica de una respuesta Th1.

También se estudió el rol de la vía ERK en las DC activadas con los estímulos microbianos mencionados. Los resultados indican que esta vía no está involucrada en los cambios fenotípicos (aumento en la expresión de moléculas MHC-II y CD86) post-activación de las DC, pero sí en la secreción de IL-2, IL-12 e IL-10. A partir de las cinéticas de activación se observó que ERK es fosforilada (pERK) tempranamente cuando ambos tipos de DC se activan con los estímulos purificados o con bacterias. Una excepción a esta regla la constituyen las DC adherentes en las cuales no se observó la fosforilación de ERK cuando se estimularon con *S.typhimurium*. Por otra parte, la vía ERK sólo pudo ser bloqueada cuando las DC se activaron con los agonistas de TLR.

En resumen, los resultados de esta tesis demuestran que el cultivo de precursores de médula ósea de ratón, en presencia del sobrenadante de la línea celular J558L, permite obtener un gran número de células dendríticas compuestas por dos tipos de células diferenciables por sus propiedades de adherencia y por su fenotipo. Ambas poblaciones de DC responden a estímulos microbianos secretando cantidades similares de citoquinas tales como IL-2, IL-12 e IL-10.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que en este tipo de cultivo es posible separar una subpoblación de DC inmaduras, las cuales podrían ser relevantes en el contexto de trasplantes y de su capacidad de inducir tolerancia.

## ABSTRACT

Dendritic cells (DC) are potent antigen presenting cells that play a key role in the induction of specific immune response against pathogens. Immature DC, localized in peripheral tissues, are the “immunologic sentinels” that monitor pathogens and give the information to T lymphocytes in secondary lymphoid organs to induce an effective immune response. To this purpose, DC express Pattern Recognition Receptors (PRR), including Toll-like Receptors (TLR), that recognize specific pathogenic components, such as lipoprotein (TLR2), lipopolysaccharide (TLR4) or bacterial DNA (TLR9), among others. TLR's gives information to DC through signaling pathways among which three fundamental mitogen activated protein kinases (MAPK) have been described: ERK, JNK and p38 MAPK.

Pathogen recognition through these receptors produce DC activation, maturation and migration from peripheral tissues to secondary lymphoid organs (lymph nodes, Peyer's patch, tonsils, etc). Moreover, DC down regulates their endocytic capacity and, depending on the nature of stimulus and the microenvironment where DC matures, they will secrete different cytokines capable of modulating the immune response.

Because DC populations are very scarce in peripheral organs, a number of studies have been directed at the producing them from hematopoietic precursors in high scale. Several factors involved in increase production or in the regulation of DC maturity have been explored.

Based on this information, the objective of this thesis was to establish culture conditions that would permit the production of a high numbers of dendritic cells from bone marrow precursors and to characterize them phenotypic and functionally.

Our results indicate that after 12 days of culture in the presence of the supernatant from the J558L cell line (a source of GM-CSF), murine bone marrow precursors generate two different cell populations (in suspension and adherent) with DC characteristics, as identified by their expression of CD11c. Phenotypic characterization showed that the non adherent population of DC present a higher expression of MHC-II molecules than adherent DC as well as the maturation marker CD86 for which adherent DC's are negative.

Functionally, it was possible to observe that the adherent population has a more potent endocytic capacity than the non-adherent population while in a MLR both DC's type behaved identically. These results indicate that the adherent DC have a more immature phenotype in comparison with the non-adherent DC.

In addition, we studied the response of these two DC populations to microbial stimuli, analyzing their phenotype and cytokine secretion post-activation. We analyzed changes in expression of surface molecules like MHC-II and CD86 and cytokine secretion in response to microorganism derived molecules (LPS, LTA or Zymosan) or whole Gram (-) and (+) bacteria. When the IL-2, IL-12 and IL-10 production was analyzed in response to these stimuli we observed that the secretion pattern was very similar in both cell types, although adherent DC secreted less IL-12 than non adherent DC, a characteristic pro-inflammatory cytokine of Th1 response.

The role of ERK pathway was also studied in DC activated with the microbial stimuli mentioned before. The results indicate that this pathway is not involved in the observed phenotypic changes (up regulation of MHC-II and CD86), but that it is involved in IL-2, IL-12 and IL-10 secretion. From the activation kinetics we observed an early phosphorylation of ERK (pERK) in both DC types with either purified or whole bacteria, with exception that adherent DC were not activated with *S.thiphimorium*. Moreover, the

ERK pathway could be blocked with a specific inhibitor when DC were activated in the presence of TLR agonists.

In summary, the observations demonstrate that the culture of murine bone marrow precursors in the presence of J558L cell line supernatant produces large amounts of two, clearly distinguishable sub-populations of dendritic cells. These can be differentiated by their phenotype and adherence properties. Both DC populations responds to microbial stimuli secreting similar quantities of cytokines such as IL-2, IL-12 and IL-10.

The results exposed in this thesis show that is possible prepare an immature DC subtype which could be important in the context of transplantation and in their capacity to induce tolerance.



## 1. INTRODUCCIÓN

Las células dendríticas (DC) son un grupo de células migratorias derivadas de precursores hematopoyéticos de médula ósea, especializadas en la captación, procesamiento, transporte, y presentación de antígenos (Ag) a linfocitos T (LT) (Steinman RM, 1991). En un estado inmaduro las DC actúan como centinelas en los tejidos periféricos, donde continuamente sensan el ambiente antigénico. Cualquier encuentro con productos bacterianos o tejido dañado, inicia la maduración y migración de las DC a los ganglios linfáticos, donde finalizará el proceso de maduración. En este proceso las DC disminuyen su capacidad endocítica, al tiempo que procesan el Ag (incluyendo productos bacterianos) para luego exhibirlo en la superficie como péptidos en combinación con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Banchereau, J et al. 2000). La maduración de las DC además aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras (CD86, CD40) que son requeridas para una efectiva activación del LT. En los órganos linfáticos secundarios, las DC maduras gatillarán una respuesta inmune al interactuar con los LT que poseen en su superficie un receptor específico (TCR) para el complejo péptido foráneo/MHC (Shortman et al., 2002).

Las DC detectan señales de peligro, provenientes de microbios o daño tisular mediante receptores que incluyen entre otros, a los receptores Scavenger y a los receptores tipo Toll (TLR), (Brightbill et al., 2000). Los TLR fueron identificados originalmente en *Drosophila* como receptor esencial para el establecimiento del patrón dorso-ventral en embriones en desarrollo (Hashimoto et al., 1988). En 1996 se demostró que moscas mutantes para Toll eran susceptibles a infecciones por hongos (Lemaitre et al., 1996).

Posteriormente, homólogos de receptores Toll fueron identificados, uno tras otro, en mamíferos.

Actualmente, la familia TLR se compone de diez miembros en humano (TLR1-TLR10) y de nueve en ratón (TLR1-TLR9). La porción citoplásmica de los TLR muestra alta similitud a la familia del receptor de interleuquina 1 (IL-1R), por lo que se denomina dominio Toll/receptor IL-1 (TIR). Aparte de esta similitud, las porciones extracelulares de ambos tipos de receptores no están relacionadas (Takeda et al., 2003).

Las aproximaciones genéticas enfocadas a analizar la función fisiológica de los TLR han revelado papeles esenciales de estos receptores en el reconocimiento de patógenos. Es así como cada uno de los TLR reconoce componentes microbianos específicos, demostrando que el sistema inmune de mamíferos de esta manera discrimina el tipo de agresión en curso. (Takeda et al., 2004). Por ejemplo, TLR4, el más estudiado de estos receptores, reconoce lipopolisacárido (LPS) bacteriano, mientras que TLR2 reconoce lipoproteína. Interesantemente, los TLR no sólo reconocen componentes de membranas, sino también ácidos nucleicos como es el caso de TLR3 y TLR9, que reconocen ARN de doble hebra y ADN no metilado (CpG), respectivamente.

Sin embargo, en el evento de una infección, varios TLR son estimulados simultáneamente en reconocimiento al ligando, activando complejas vías de transducción de señales. Para el caso de TLR4 se ha descrito la señalización a través del reclutamiento de la quinasa asociada al receptor de IL-1, IRAK, y el factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral, TRAF6. Este último interactúa con un complejo multiproteico que activa a la quinasa del inhibidor  $\kappa$ B, IKK, y a p38, una proteína de la familia de las MAPK. Cuando IKK es activada, esta fosforila al inhibidor del factor

nuclear  $\kappa$ B, I $\kappa$ B, permitiendo así su degradación vía proteasoma y la liberación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), el cual se transloca al núcleo e induce la transcripción de numerosos genes involucrados en la respuesta inflamatoria (Ozato et al., 2002). Por otra parte, las MAPK juegan un rol esencial en la señalización intracelular. Estas proteínas son activadas por la unión de ligandos a receptores de superficie así como por estrés ambiental, de esta manera median tanto respuestas mitogénicas como apoptóticas. Se han descrito 3 familias de MAPK: quinasa regulada por señal extracelular (ERK), quinasa c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal (JNK) y MAPK p38, las que a su vez son activadas por quinasas MAPK (MKK). Luego de la activación, estas proteínas pueden migrar al núcleo donde fosforilan y activan factores de transcripción (Resigno et al., 1998).

Se ha demostrado que la señalización producida como consecuencia de la unión de un ligando al TLR, produce numerosos efectos, como un aumento en la expresión de moléculas presentadoras de Ag (MHC-II), aumento de moléculas coestimuladoras (CD40, CD86), secreción de citoquinas, quimioquinas, producción de enzimas proteolíticas, entre otros (Takeda et al., 2003).

A partir de estudios genómicos utilizando *microarrays*, se ha demostrado que la señalización a través de TLR induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-12, por ejemplo, además de citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10, (Granucci et al., 2001). La producción de estas citoquinas es importante para el desarrollo de una respuesta inmune adaptable, aunque IL-12 e IL-10 no tienen actividad antimicrobiana por sí mismas. (Moore et al., 2001).

La IL-12 es producida por los macrófagos y las DC, y es el mediador de la respuesta inmune innata contra parásitos intracelulares. Activa células NK, las que producen IFN- $\gamma$  y

aumentan su capacidad citotóxica. IL-12 es una citoquina esencial para el desarrollo de una respuesta de tipo Th1. En este tipo de respuesta los LT producen IFN- $\gamma$  conduciendo a la activación de los macrófagos y de LT citotóxicos. Debido a su rol central en “conectar” la respuesta inmune innata y adaptable, la producción de IL-12 ha sido ampliamente estudiada (Trinchieri, G. 2003). La secreción de IL-12 es inducida en macrófagos por LPS e IFN- $\gamma$ , fenómenos que requiere nueva síntesis proteica (Grohmann, U et al., 2001), además se ha reportado que el modo de inducción de IL-12 en las DC difiere de la de los macrófagos, ya que las DC no requieren síntesis proteica y es independiente de IFN- $\gamma$  (Trinchieri, G. 2003). Interesantemente, la inducción de IL-12 a través de LPS es dependiente de MAPK p38 en macrófagos (Lu et al., 1999), mientras que, en DC humanas se ha descrito que la activación de ERK regula negativamente la secreción de esta citoquina (Agrawal et al., 2003).

Por otra parte, en un análisis reciente de la cinética de activación de expresión génica en DC de ratón estimuladas con bacterias Gram (-) vivas, se observó la expresión diferencial durante la maduración de numerosos genes relacionados con moléculas de transducción de señales, factores de transcripción, proteínas involucradas en rearrreglos del citoesqueleto y de moléculas que participan en la activación y control de la respuesta inmune. En este análisis se observó por primera vez que las DC, después del encuentro con las bacterias, inducen tempranamente el ARN mensajero de la IL-2. Estos mismos autores demostraron que las DC producen además la proteína. Debido a que la IL-2 es un factor esencial para la proliferación de los LT, estudiaron si la IL-2 proveniente de las DC tenía efecto sobre la proliferación de los LT. Para ello, utilizaron DC de ratones *knock out* para IL-2 (IL-2<sup>-/-</sup>) y ensayaron en una reacción mixta linfocitaria (MLR), si los LT eran capaces de dividirse en esta condición. Los resultados indicaron que DC IL-2<sup>-/-</sup> son incapaces de inducir la

proliferación de LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup>, lo que sugiere que la IL-2 producida por las DC es una citoquina clave para la estimulación de los LT (Granucci et al., 2001). Con el propósito de indagar más en el rol de la IL-2 producida por las DC, estudios del grupo antes mencionado, analizó tanto la naturaleza del estímulo como el origen de las DC en la secreción de IL-2. Se encontró que sólo estímulos reconocidos a través de TLR son capaces de inducir la secreción de IL-2, mientras que citoquinas inflamatorias no tienen ningún efecto. Además se demostró que la secreción de IL-2 es independiente del origen de las DC. En un estudio posterior describieron que cuando DC activadas interactuaban tempranamente con los LT, la IL-2 producida por las DC se concentraba en el sitio del contacto célula-célula, confirmando la importancia de IL-2 derivada de DC en la activación de los LT (Granucci et al., 2003).

El conjunto de los antecedentes mencionados demuestra que las DC presentan gran plasticidad. Debido al papel fundamental que desempeñan en la respuesta inmune, es necesario contar con protocolos diseñados cuidadosamente para la preparación de DC, de modo de conocer exactamente sus características funcionales.

Ya que las DC son poblaciones extremadamente escasas en todos los órganos, se han explorado varios factores capaces de incrementar en primer lugar la producción (cantidad) de DC y en segundo lugar de regular el estado de maduración, variables relevantes en áreas terapéuticas, como por ejemplo la tolerancia a trasplante, terapia antitumoral, etc. En la actualidad existen diversos protocolos para la generación de las DC, los que varían en la fuente de GM-CSF (citoquina esencial para la generación de este tipo celular), concentración de esta citoquina, densidad y prolongación de los cultivos, entre otras variables. El método más utilizado es el de Inaba et al., el cual permite obtener  $5 \times 10^6$  DC por ratón a partir de precursores de médula ósea diferenciados con GM-CSF recombinante

(Inaba et al., 1992). Modificaciones de este protocolo como el uso de M-CSF recombinante en conjunto con el sobrenadante de la línea celular NIH/3T3, y el uso de placas de petri microbiológicas han permitido la generación de una línea celular de DC que mantiene su fenotipo inmaduro por más de 12 meses de cultivo (Winzler et al., 1997). Por otra parte, se ha descrito un método que comparte parámetros de los protocolos antes mencionados pero que incluye otros nuevos como el inicio del cultivo a baja densidad celular del cual se obtienen resultados similares (Zal et al., 1994). Algunos autores reportan que el número de DC supera los  $1 \times 10^8$  células (por ratón), con una pureza del 80-90% (Lutz et al., 1999). Las DC obtenidas por los diversos métodos, presentan las típicas características morfológicas de este tipo celular, las que incluyen presencia de antígenos en vacuolas, alta capacidad para endocitar y procesar antígenos (Schuler et al., 1985), expresión de moléculas de presentación antigénica (MHC II) y moléculas coestimuladoras (CD80/86, CD40) (Inaba et al., 1994), gran capacidad estimuladora en MLR (Ahman et al., 1979) y secreción de citoquinas frente a estímulos bacterianos, entre otras.

La generación de DC mediante los diferentes protocolos ha permitido estudios recientes sobre los mecanismos moleculares y las vías de señalización intracelular, principalmente MAPK frente a estímulos de diferente naturaleza (Agrawal et al., 2003). Algunas de estas vías estarían relacionadas con la secreción de citoquinas, así como con la maduración y sobrevivencia de las DC (Resigno et al., 1998).

Nuestro laboratorio está interesado en el estudio de la biología de la DC entre otros aspectos, con fines terapéuticos tales como la inducción de tolerancia a trasplante. Para ello es necesario la generación de un protocolo de expansión de DC las cuales estén bien caracterizadas fenotípica y funcionalmente, y en el cual el número de células no sea un factor limitante. Ya que poseemos la línea celular J558L que secreta GM-CSF, en este

trabajo nos propusimos desarrollar un método que permita la expansión de DC a partir de progenitores de médula ósea y llevar a cabo la caracterización fenotípica y funcional de las DC obtenidas.

## **HIPÓTESIS**

Precusores de médula ósea diferenciados en presencia del sobrenadante de la línea celular J558L generarían una población heterogénea de DC con características fenotípicas y funcionales diferentes.

## **OBJETIVO GENERAL**

- ✓ Estudiar el fenotipo y funcionalidad de células dendríticas generadas a partir de precusores de médula ósea de ratón cultivados con el sobrenadante de la línea celular J558L productora de GM-CSF

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Estandarizar un protocolo de generación y cultivo de DC utilizando el sobrenadante de la línea celular J558L
- ✓ Estudiar las características fenotípicas de las células dendríticas activadas con distintos ligandos de TLR (bacterias y componentes purificados de éstos)
- ✓ Estudiar las características funcionales de las DC generadas mediante ensayos de endocitosis, capacidad estimuladora alogénica y secreción de citoquinas

- ✓ Analizar las vías de señalización activadas en las células dendríticas estimuladas con distintos estímulos
- ✓ Evaluar el rol de las vías de señalización identificadas anteriormente en el fenotipo y secreción de citoquinas



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### *2.1 Obtención de Células Dendrítica de Médula Ósea*

Las células dendríticas se obtuvieron a partir de precursores de médula ósea de ratones C57BL/6 de entre 2-3 meses de edad. Para esto, los ratones se sacrificaron por sobredosis con éter y disectaron para obtener fémur y tibias. Los precursores se obtuvieron al perfundir estos huesos con RPMI suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL. La médula ósea se disgregó por agitación fuerte hasta obtener una suspensión celular homogénea y la suspensión celular se centrifugó a 300 x g por 5 min a temperatura ambiente. Para lisar los glóbulos rojos, las células se resuspendieron en 1 mL de una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl 0.15M, KHCO<sub>3</sub> 10mM, Na<sub>2</sub>EDTA 0.1 mM, pH 7.2-7.4) y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente. Los precursores de médula ósea obtenidos se cultivaron en placas de petri microbiológicas (140mm x 20mm, Sterilin) a una densidad de 10x10<sup>6</sup> células totales en 20 mL de RPMI suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomycinina 100 µg/mL, 10% v/v de FCS (medio completo), más el sobrenadante de las células J558L (3% vol/vol) secretoras de GM-CSF (proporcionadas por la Dra. Ana María Lennon-Duménil).

Las células se mantuvieron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y a los días 4 y 8 de cultivo se recuperaron las células en suspensión y las células adherentes se obtuvieron luego de tratar la placa con 4 mL de tripsina, durante 6 min a 37°C. Posteriormente, las células en suspensión y adherentes se replaquearon bajo las mismas condiciones iniciales, es decir, 10x10<sup>6</sup> células por placa en 20 mL de medio más el 3% vol/vol del sobrenadante de las células

J558L. Al día 12 de cultivo se recuperaron las células en suspensión y adherentes por separado para análisis.

### ***2.2 Análisis Fenotípico por Citometría de Flujo***

Las células dendríticas obtenidas después de 12 días de cultivo fueron analizadas estudiando la expresión varios de marcadores de superficie. Este análisis también se llevó a cabo después activar las células con los distintos estímulos bacterianos, en presencia o no del inhibidor de la vía MAPK en estudio. Los marcadores de superficie utilizados fueron CD11c (anti-CD11c-PE, clon HL3, BD Pharmingen, EEUU), marcador específico de células dendríticas; MHC-II (anti-I-A/I-E-FITC, clon 2G9, BD Pharmingen, EEUU) y CD86 (anti-CD86-FITC, clon GL1, BD Pharmingen, EEUU), correspondientes a moléculas presentadoras de Ag y de coestimulación, respectivamente. Para esto, las células dendríticas se resuspendieron en medio DMEM + 10% v/v de FCS y se incubaron por 20 min a 4°C con las diferentes combinaciones de anticuerpos. Luego de esta incubación, las células se lavaron y resuspendieron en PBS + 2% v/v de FCS y se analizaron por citometría de flujo utilizando un FACScan (BD Biosciences, Mountain View, CA) y el software CELLQuest.

### ***2.3 Ensayo de Endocitosis***

La capacidad endocítica de las células dendríticas se analizó midiendo la incorporación celular de dextran-FITC. Inicialmente,  $0,5 \times 10^6$  células en suspensión y adherentes (activadas con LPS 100 ng/mL por 4 horas a 37°C, cuando corresponda) fueron resuspendidas en 500µL de medio completo más 3% vol/vol del sobrenadante de las células J558L y plaqueadas en placas de 24 pozos (Nunc, EEUU) durante 15 min a 37°C.

Luego las células se recuperaron y centrifugaron a 2400 rpm por 5 min a 4°C y se resuspendieron en una solución que contenía 0,2mg/mL de dextran-FITC (Sigma, EEUU) en RPMI + 10% v/v FCS y se incubaron por 30 min a 37°C o a 4°C (para determinar la unión inespecífica de dextran-FITC a la superficie celular). La reacción se detuvo mediante 3 lavados en PBS + 5% v/v FCS + 0,1% azida de sodio a 4°C, para finalmente resuspender las células en 300µL de PBS + 10% v/v de FCS. El análisis por citometría de flujo se realizó inmediatamente después de detenida la reacción.

#### ***2.4 Reacción Linfocitaria Mixta***

Células dendríticas, tanto en suspensión como adherentes, se co-cultivaron con LT provenientes de timo (timocitos). Los timocitos se obtuvieron de timo de ratones BALB/c de 1 mes de edad, luego de selección negativa con anticuerpos anti-MHC-II (I-E<sup>d</sup>) para eliminar células presentadoras de Ag presentes en el timo. Para esto se maceró un timo y las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-I-E<sup>d</sup> (clon 2G9, BD Pharmingen, EEUU) durante 10 min a 4°C, más agitación. Después se agregó un anticuerpo secundario, anti-Rat-IgG (Miltenyibiotec, EEUU), y se incubó bajo las mismas condiciones que el anticuerpo primario. Finalmente, se purificaron los timocitos con columnas magnéticas de selección negativa y un imán VARIOMACS (Miltenyibiotec, Alemania). 0,2 x 10<sup>6</sup> de timocitos fueron marcados con CFSE 1µM, y puestos en cultivo con las células dendríticas a razones de 0.5:1, 2:1, 4:1 (DC:LT). Los co-cultivos se realizaron en placas de 24 pozos, en 1 mL final de medio completo más 3% vol/vol del sobrenadante de las células J558L, y se mantuvieron a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>. A los días 3, 4, 5, 6 y 7 se recuperaron las células y se analizó la proliferación de los timocitos mediante citometría de flujo.

## 2.5 Cultivos Bacterianos

Se utilizaron las cepas VCS257 de *Escherichia coli* (Gram -), LT2 de *Salmonella typhimurium* (Gram -), y *Bacillus cereus* sp (Gram +). Las bacterias se utilizaron cuando se encontraban en fase de crecimiento exponencial, determinado mediante densidad óptica, y corroborado mediante titulaciones de los cultivos en placas de agar. La multiplicidad de infección (moi) utilizada para cada bacteria fue: 10 moi para *E.coli* y *S.typhimurium* y 5 moi para *B.cereus*.

## 2.6 Activación de Células Dendríticas

Al día 12 de cultivo, tanto las células dendríticas en suspensión como adherentes, se activaron con distintos estímulos. Los componentes puros fueron: LPS 100 ng/mL (*S. typhosa*), LTA 10 µg/mL (*S. sanguis*) y Zymosan 10 µg/mL (*S. cerevisiae*), todos ellos de Sigma, EEUU. Las concentraciones de bacterias fueron: *E.coli* y *S.typhimurium* 10 moi, y *B.cereus* 5 moi.

$1 \times 10^6$  de DC se resuspendieron en 250 µL de medio completo más 3% vol/vol del sobrenadante de las células J558L. Las activaciones se realizaron en placas para cultivo de 24 pozos (Nunc, EEUU), durante 4 horas, a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>, luego de las cuales se recuperó el contenido de cada pozo en tubos eppendorf. El contenido se centrifugó a 2400 rpm por 5 min a 4°C, los sobrenadantes se recuperaron y almacenaron a -80°C para medición de citoquinas y las células se analizaron mediante citometría de flujo, como se describió anteriormente.



## ***2.7 Cinéticas de Activación y Lisados Celulares***

Tanto las células en suspensión como las adherentes,  $1 \times 10^6$  células en 250  $\mu$ L de medio completo más el 3% vol/vol sobrenadante de las células J558L, se activaron en tubos eppendorf con los distintos estímulos durante 10, 30 y 60 min, a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>. Cuando corresponda, las células se pretrataron durante 30 min con el inhibidor de la vía ERK (PD98059 100 $\mu$ M, Sigma, EEUU) y posteriormente se activaron con los distintos estímulos patogénicos.

Al término del tiempo de activación, se agregó 1 mL de Solución "Stop" fría que contenía NaF 0,25M, EDTA 0,5M, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,1M, Pirofosfato de Sodio 0,125M y PBS 1X. Posteriormente, las células se centrifugaron a 8000 rpm durante 2 min a 4°C, luego se eliminó el sobrenadante y los pellets se resuspendieron en 200  $\mu$ L de solución de lisis caliente (100°C) que contenía SDS 10%, Tris-Cl 1M pH 7,4, PMSF 100mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,1M, Pepstatina A 1mg/mL, Leupeptina 1 mg/mL y Aprotinina 1 mg/mL. Después de incubar durante 5 min a 100°C en esta solución, el contenido se disgregó utilizando una jeringa de 1 mL con una aguja 25G. Finalmente, los lisados se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min a 4°C y los sobrenadantes se conservaron a -80°C para posterior cuantificación proteica y continuación con el protocolo de inmunoprecipitación.

## ***2.8 Cuantificación de Proteínas***

Los extractos proteicos fueron cuantificados usando el kit DC protein Assay (Bio-Rad Hercules, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 2.9 ELISA

Las concentraciones de IL-12, IL-2, IL-10, IL-4 e IFN- $\gamma$  se determinaron usando kits de ELISA de captura (BD Pharmingen, EEUU). El ensayo se realizó en placas de 96 pozos Immoplate Maxisorp (Nunc, EEUU) a las cuales se les agregaron 100  $\mu$ L por pozo de una dilución del anticuerpo de captura (1:250 para IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  y 1:125 para IL-2 e IL-10) en "coating buffer" ( $\text{NaHCO}_3$  0.33M,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.66M, pH 9.5) y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Posteriormente las placas se lavaron 3 veces con una solución de lavado PBS 1X + 0.1% Tween 20 (Sigma, EEUU), se agregaron 420  $\mu$ L por pozo de una solución de bloqueo (PBS 1X + 10% v/v FCS) y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con la solución de lavado, luego de lo cual a diferentes pozos se les agregaron 100  $\mu$ L de una dilución estándar de citoquina recombinante o sobrenadantes de células dendríticas activadas bajo diferentes condiciones. Las muestras se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente, las placas se lavaron 5 veces con solución de lavado y luego se incubó con 100  $\mu$ L del anticuerpo de detección biotilado (1:125 para IL-12, 1:250 para IL-2, IL-10, IL-4 e IFN- $\gamma$ ) más avidina-peroxidasa. Al cabo de 1 hora la placa se lavó 7 veces y se agregaron 100  $\mu$ L por pozo de una solución de TMB Substrate reagent Set (BD Pharmingen, EEUU). Luego de 30 min de incubación, la reacción se detuvo agregando 50  $\mu$ L de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1M. La coloración del ensayo se cuantificó a 450 nm en un espectrofotómetro Emax Precision Microplate Reader (Molecular Devices, EEUU).

### ***3.0 Inmunoprecipitación***

Los sobrenadantes obtenidos de la lisis celular se incubaron durante toda la noche a 4°C más agitación, con 5 µL de suero normal de conejo, 25 µL de una suspensión al 50% de proteína G Sepharosa (Amersham Biosciences AB, Suecia), 300 µL de H<sub>2</sub>O y 500 µL de tampón de inmunoprecipitación (2X). Este tampón contenía Tritón X-100 10%, NaCl 5M, Tris-Cl pH 7,4, EGTA 0,05M, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,1M, PMSF 100 mM y NP40 10%. 100 µg de proteínas de cada uno de los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos donde se agregaron 1 µL de anticuerpo anti-ERK, correspondiente a 0,2 µg de anticuerpo (Santa Cruz Biotechnology, EEUU) y se incubó con agitación a 4°C durante toda la noche. Después se agregó 50 µL de una suspensión al 50% de Proteína G Sepharosa (Amersham Biosciences AB, Suecia) e incubó durante 2 horas a 4°C con agitación. Luego, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min a 4°C y se prosiguió con al menos 3 lavados usando buffer de inmunoprecipitación, alternando con centrifugaciones a 8000 rpm durante 2 min a 4°C. Posteriormente, se eliminó los sobrenadantes y se agregó 50 µL de Sample Buffer 2X (100°C) que contenía inhibidores de proteasas. Las muestras se agitaron enérgicamente por algunos segundos y se hirvieron durante 5 min a 100°C. Finalmente se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min a 4°C y se conservaron los sobrenadantes a -80°C para posterior análisis por Western Blot.

### ***3.1 Western Blots***

Los sobrenadantes obtenidos en la inmunoprecipitación se cargaron en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE 10%). Luego de la electroforesis (30min a 50V y 1 hora a 100V) las proteínas se transfirieron desde el gel

de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Hercules, EEUU), durante 2 horas a 100V en buffer de transferencia el que contenía metanol 20%, Tris 25 mM y glicina 0,2M. Posteriormente, se bloquearon los sitios libres en las membranas con PBS 1X + 0,1% Tween 20 + BSA 3% (Sigma, EEUU) a 4°C durante toda la noche. Una vez bloqueadas las membranas, estas se incubaron con los anticuerpos primarios (anti-pERK 1:1000 o anti-ERK 1:1000, según corresponda, Santa Cruz Biotechnology, EEUU) durante 1 hora a temperatura ambiente y luego de eliminar el anticuerpo no unido mediante 3 lavados con PBS 1X + 0.1% Tween 20 durante 10 min cada uno a temperatura ambiente, se incubó con el anticuerpo secundario (para p-ERK, anti-mouse peroxidasa 1:10000, y para anti-ERK, anti-rabbit peroxidasa 1:5000, Amersham Biosciences AB, UK) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron las membranas 3 veces con la solución de lavado y se revelaron en la oscuridad utilizando el kit ECL plus (Amersham Biosciences AB, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante.



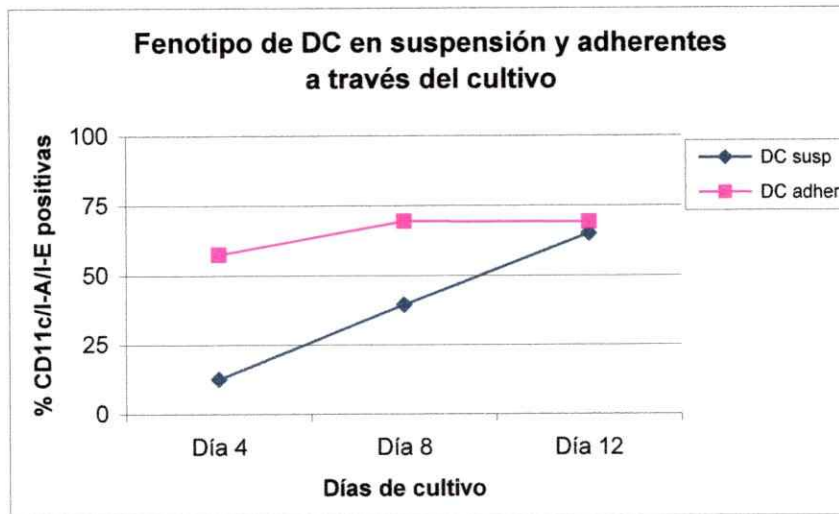
### 3. RESULTADOS

#### *3.1 Generación y Cultivo de Células Dendríticas*

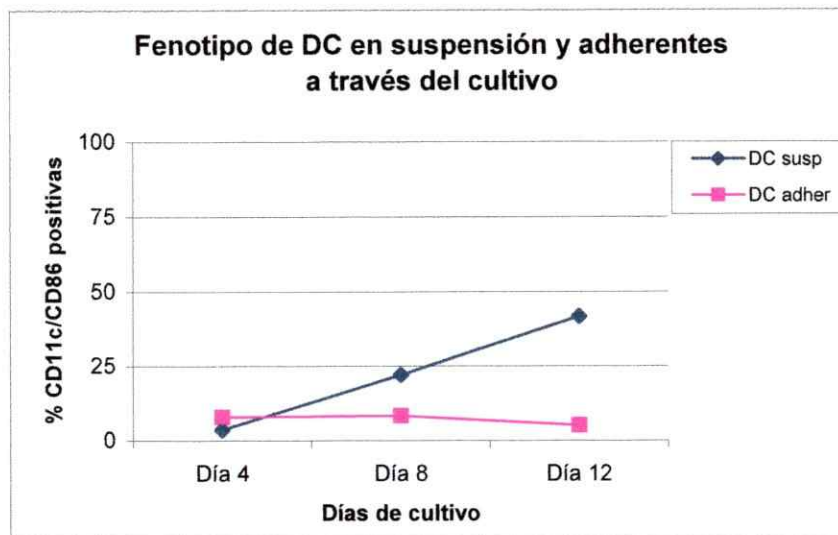
Precusores de médula ósea de ratón se cultivaron con 3% (v/v) del sobrenadante de la línea celular J558L, el que contenía GM-CSF. Se eligió esta concentración después de haber titulado distintos porcentajes del sobrenadante con respecto al medio de cultivo total, resultando con esta concentración un alto porcentaje de DC CD11c<sup>+</sup> (>80%). Ya que en este protocolo las células de la médula ósea van produciendo paulatinamente DC, analizamos la diferenciación de las células a distintos tiempos del cultivo. Al día 4 de cultivo, se recuperó una población de células en suspensión mientras que las células adherentes se recuperaron tratándolas con tripsina. Luego, ambos tipos celulares se marcaron con anticuerpos que reconocen proteínas de superficie características de las células dendríticas y las analizamos mediante citometría de flujo. Este mismo tipo de análisis también se realizó los días 8 y 12. El cultivo desarrollado resulta en una población heterogénea compuesta por células en suspensión y adherentes, ambos tipos celulares incrementan la expresión, tanto de CD11c, marcador específico de DC, como de MHC-II, a medida que transcurre el tiempo de cultivo (figura 1). La fracción de células adherentes se caracterizan por poseer mayor un porcentaje de células positivas para CD11c/MHC-II a los días 4 y 8, pero al día 12 ambas poblaciones tienen el mismo porcentaje de células MHC-II<sup>+</sup>. Cuando se estudió la co-expresión de CD11c y CD86, encontramos que las DC adherentes mantienen un bajo porcentaje de células positivas, mientras que las DC en suspensión aumentan la expresión de estos marcadores. Estos resultados permiten definir ambos tipos celulares, donde las DC en suspensión presentan un fenotipo más maduro que

las DC adherentes, determinado por los mayores niveles de expresión de MHC-II (figura 2). Estos resultados se confirman al analizar los niveles de expresión de CD86 los cuales son mayores en las células en suspensión comparados a los de las células adherentes. La ausencia de CD86 en la superficie de las DC adherentes es independiente del tratamiento con tripsina como se muestra en la figura 2B.

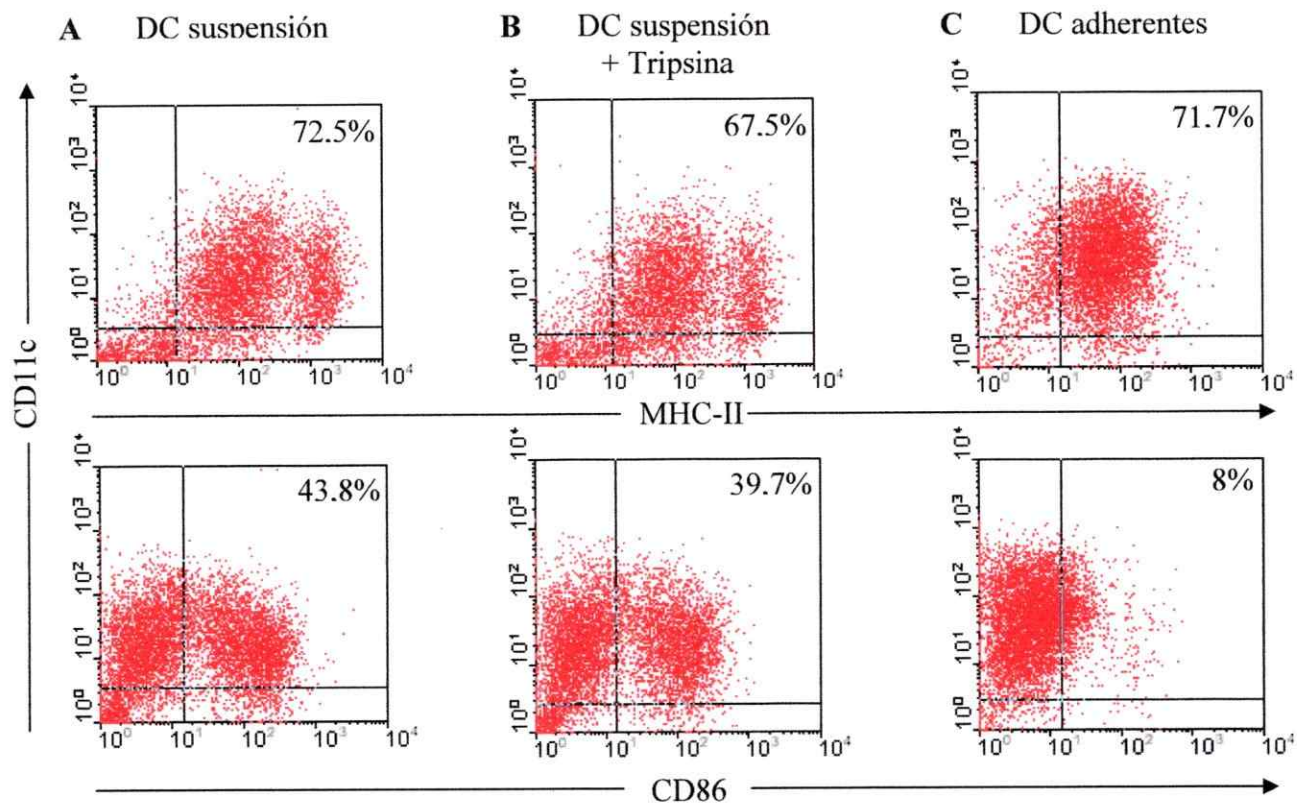
A



B



**Figura 1.** Enriquecimiento de DC a partir de precursores de médula ósea durante 12 días de cultivo. **A.** Estudio de la expresión de CD11c y MHC-II (I-A/I-E) a través del cultivo, en DC en suspensión y adherentes. **B.** Se muestra la cinética de expresión de CD11c y CD86 en ambos tipos celulares. Los análisis fenotípicos se realizaron a través de citometría de flujo.



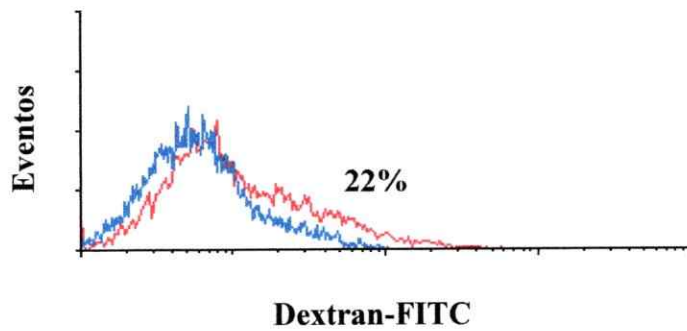
**Figura 2.** La población de DC adherentes presenta un fenotipo inmaduro con respecto a las DC en suspensión. Se determinó el fenotipo de las DC mediante citometría de flujo, estudiando la expresión en la superficie de CD11c, MHC-II y CD86, al día 12 de cultivo. **A.** Fenotipo de DC en suspensión. **B.** Fenotipo de DC en suspensión tratadas con tripsina. **C.** Fenotipo de DC adherentes.

### *3.2 Capacidad endocítica de las Células Dendríticas*

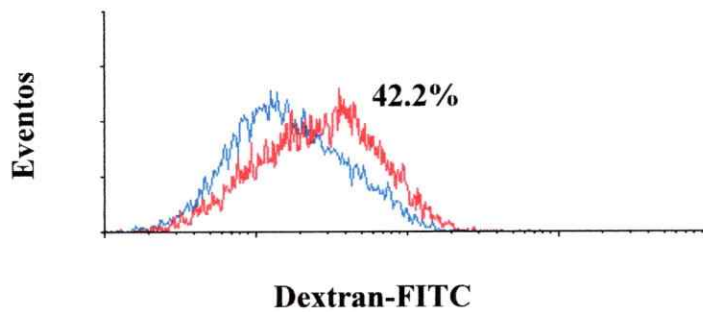
Con el objetivo de confirmar el estado de maduración de las dos poblaciones de DC, estudiamos la capacidad endocítica de estas células, mediante la incorporación de Dextran-FITC. Como muestra la figura 3, las DC en suspensión muestran menor capacidad endocítica (22%) que las DC adherentes (42,2%), lo que concuerda con el hecho que DC maduras pierden su capacidad fagocítica. Por lo tanto, estos datos corroboran los antes descritos, donde las DC en suspensión muestran un fenotipo más maduro que las DC adherentes.

Sorprendentemente, cuando ambos tipos de DC fueron activados con LPS (100 ng/mL), ya sea por 4 o 24 horas a 37°C, y se midió luego la capacidad endocítica con respecto a las células no activadas, ambos tipos celulares no mostraron cambios respecto del estado inicial, lo que es un indicio de que estas células son incapaces de lograr un estado mayor de maduración (datos no mostrados).

**A DC en Suspensión**



**B DC Adherentes**



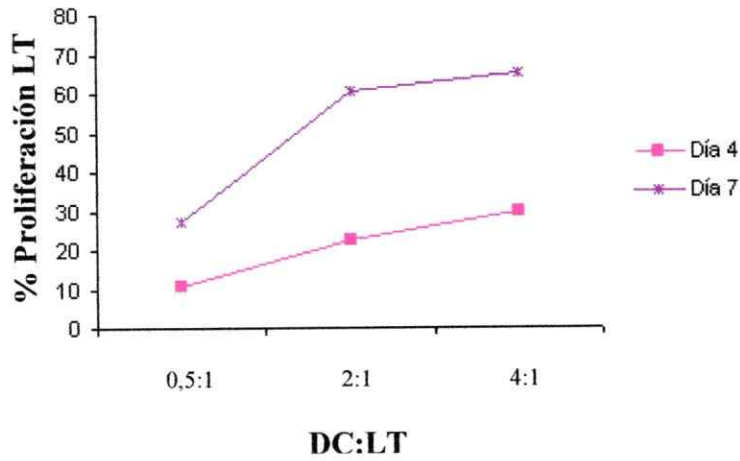
**Figura 3.** DC adherentes presentan mayor capacidad endocítica que las DC en suspensión. El ensayo se realizó midiendo la endocitosis de Dextran FITC en ambas poblaciones de DC, a 37°C (rojo) y a 4°C como control (azul). Los análisis se realizaron mediante citometría de flujo en una *gate* FSC-SSC correspondiente al tamaño de DC. **A.** Capacidad endocítica de DC en suspensión. **B.** Capacidad endocítica de DC adherentes.

### ***3.3 Proliferación de linfocitos T en respuesta a ambos tipos de Células Dendríticas***

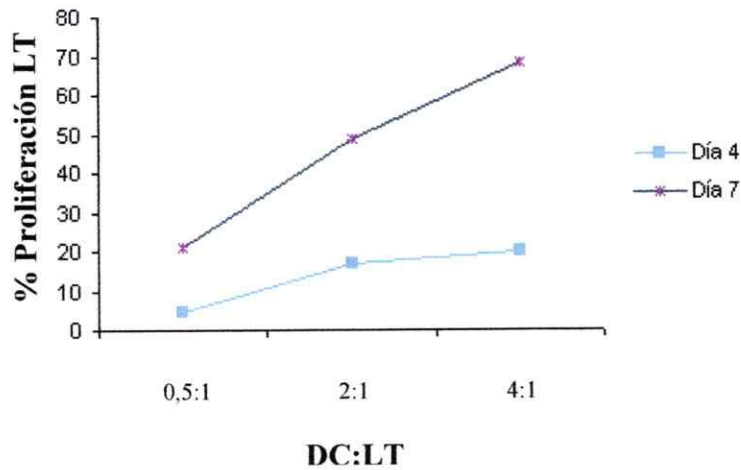
En seguida estudiamos la capacidad de las dos subpoblaciones de DC de estimular LT, mediante una reacción linfocitaria mixta o MLR donde LT aloreactivos de timo (timocitos) fueron enfrentados a DC con MHC-II de distinto haplotipo. Las DC se obtuvieron de ratones C57BL/6, haplotipo H-2<sup>b</sup>, mientras que los timocitos provenían de ratones BALB/c, haplotipo H-2<sup>d</sup>. La figura 4 muestra que a medida que transcurre el tiempo de co-cultivo, aumenta el porcentaje de timocitos en proliferación. Además, es posible observar que a pesar de las diferencias fenotípicas entre ambas subpoblaciones de DC, estas presentan la misma capacidad aloestimuladora.. Sin embargo, se requiere de una alta razón de DC:LT (4:1) para lograr ~70% de proliferación. En la literatura se ha demostrado que las DC poseen una potente capacidad para activar LT (100 veces más que otras células del bazo, por ejemplo) (Steinman R et al., 1978). Así, en los protocolos para MLR utilizados actualmente el número de DC es siempre menor que el de LT (1:10), demostrando la propiedad inmunoestimuladora propia de las DC.

Nuestros resultados sugieren que el estado de maduración de ambos tipos de DC es insuficiente para estimular a los LT, confirmando su estado de inmadurez.

### A DC en Suspensión



### B DC Adherentes



**Figura 4.** La población de DC en suspensión (fenotípicamente más maduras) no es mejor estimuladora de LT alogénicos en una MLR. La proliferación de  $0,2 \times 10^6$  timocitos, previamente marcados con CFSE (1 $\mu$ M), se analizó por citometría de flujo los días 4 y 7 de co-cultivo, realizando una *gate* en tamaño linfocitario. **A.** Proliferación de LT en respuesta a DC en suspensión. **B.** Proliferación de LT estimulados con DC adherentes.



### ***3.4 Maduración de Células Dendríticas activadas con distintos estímulos patogénicos***

Ya que se ha descrito que las DC maduras frente a distintos agentes, ya sea bacterianos, virales o citoquinas, aumentan la expresión de MHC-II y CD86 (Inaba et al., 1994), nos propusimos estudiar el cambio fenotípico de ambos tipos de DC en respuesta a estímulos microbianos. Para ello, DC en suspensión y DC adherentes fueron activadas durante 4 horas con moléculas de origen microbiano, como son LPS, LTA y Zymosan (Zym), o en presencia de bacterias Gram (-) (*E.coli* y *S.typhimurium*) y bacterias Gram (+) (*B.cereus*).

Como muestra la tabla 1, las DC en suspensión y las DC adherentes no cambian su fenotipo frente a los distintos estímulos, como se observa en los % tanto para células positivas para CD11c/MHC-II o CD11c/CD86. Al analizar las medias de fluorescencias, tampoco se observó variaciones (datos no mostrados). Estas observaciones sugieren el estudio de la composición del sobrenadante de la línea celular J558L, el que proporciona GM-CSF.

Debido a que la maduración de las DC estimuladas con agentes microbianos involucra vías de señalización iniciadas por el reconocimiento de estos agentes por los TLR, y que posteriormente esta señalización activa tanto a NF $\kappa$ B como a MAPK (Takeda et al., 2003), nos interesamos en analizar si la vía ERK (una de familias MAPK) tenía un rol en el cambio fenotípico de las DC. Para ello, las DC en suspensión y las DC adherentes fueron pretratadas durante 30 min con el inhibidor específico de la vía ERK (PD98059), y posteriormente activadas con los distintos estímulos. Como se indica en la tabla 1, la vía ERK no está involucrada en el cambio de las moléculas de superficie como resultado de la maduración de las DC.

**TABLA 1.** DC diferenciadas con el sobrenadante de las células J558L no se maduran en respuesta a bacterias y sus componentes puros, lo que es independiente de la vía ERK.

**A.**

Condición	CD11c/I-A/I-E	CD11c/CD86
	% células (+)	% células (+)
Sin activar	61,3	36,6
LPS	63,1	46,8
LTA	57,4	47,3
Zym	57,2	47,5
<i>E.coli</i>	70,9	51,1
<i>B.cereus</i>	70,4	42,9
<i>Salmonella</i>	68,6	44,9
PD/Sin activar	57,5	34
PD/LPS	56,8	40,3
PD/LTA	52,8	38,5
PD/Zym	53,5	35,5
PD/ <i>E.coli</i>	62,2	39,7
PD/ <i>B.cereus</i>	67,8	42,4
PD/ <i>Salmonella</i>	62,8	45,9

**B.**

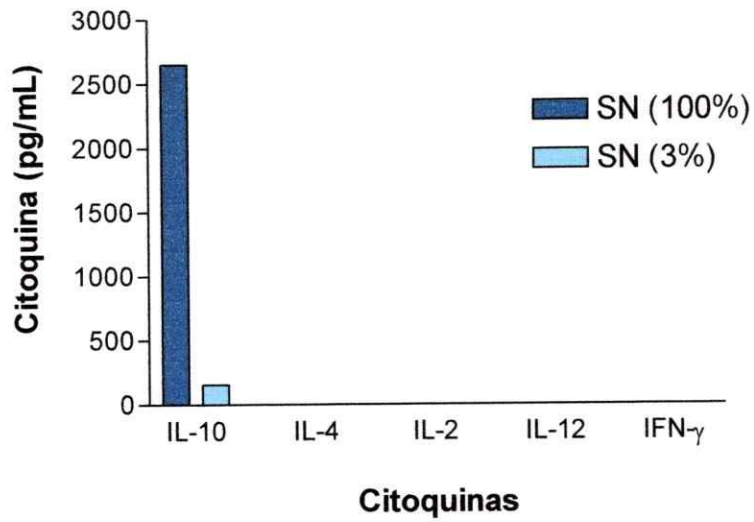
Condición	CD11c/I-A/I-E	CD11c/CD86
	% células (+)	% células (+)
Sin activar	65,4	5,5
LPS	71,6	6,8
LTA	73,7	5,5
Zym	60,3	5,9
<i>E.coli</i>	67,3	6,5
<i>B.cereus</i>	67,5	7
<i>Salmonella</i>	73	6,3
PD/Sin activar	64,9	3,2
PD/LPS	65,2	4,7
PD/LTA	65,2	4,2
PD/Zym	62,1	4,4
PD/ <i>E.coli</i>	60	4,2
PD/ <i>B.cereus</i>	53,6	4,3
PD/ <i>Salmonella</i>	66	5,2

\*DC en suspensión (A) y adherentes (B) fueron activadas con estímulos patogénicos puros y bacterias enteras, al día 12 de cultivo, en presencia o no del inhibidor de la vía ERK (PD98059). El cambio fenotípico se estudió a través de citometría de flujo, analizando la expresión de CD11c/MHC-II y CD11c/CD86. A. DC en suspensión activadas en presencia o no del inhibidor PD98059. B. DC adherentes con el mismo tratamiento.

### ***3.5 Análisis del sobrenadante de la línea celular J558L***

Debido a que tanto las DC en suspensión como las DC adherentes, generadas en presencia del sobrenadante de la línea celular J558L (fuente de GM-CSF), no presentan cambio en la capacidad endocítica después de ser activadas con LPS, poseen baja capacidad aloestimuladora de LT y no presentan cambios en el fenotipo luego de ser activadas con los distintos estímulos microbianos, decidimos estudiar qué citoquinas estaban presentes en el sobrenadante de la línea celular J558L.

Para ello se analizó la presencia de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-12, e IL-10 en el sobrenadante (100%) y en el medio de cultivo de las DC (3%). Como muestra la figura 5, sólo se observó IL-10, citoquina anti inflamatoria que ha demostrado suprimir múltiples actividades de la respuesta inmune (Paul et al., 2003), además de estar involucrada en la generación de tolerancia.



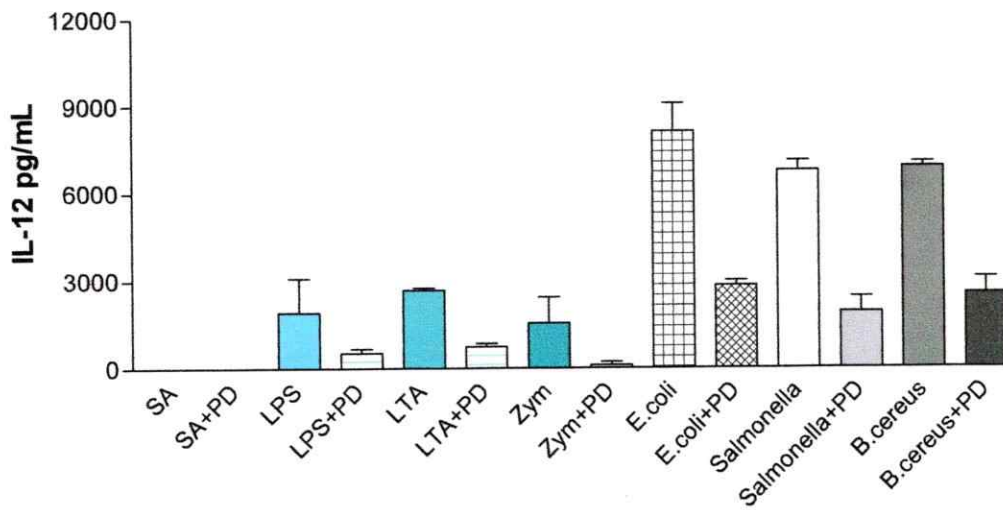
**Figura 5.** El sobrenadante de las células J558L contiene IL-10. Se analizó la presencia de las citoquinas IL-12, IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-10 en el sobrenadante (SN) de las células J558L (100%) o en el medio de cultivo de las DC (3%). Las mediciones se realizaron a el ensayo de ELISA.

### ***3.6 Células Dendríticas en respuesta inflamatoria: secreción de IL-12***

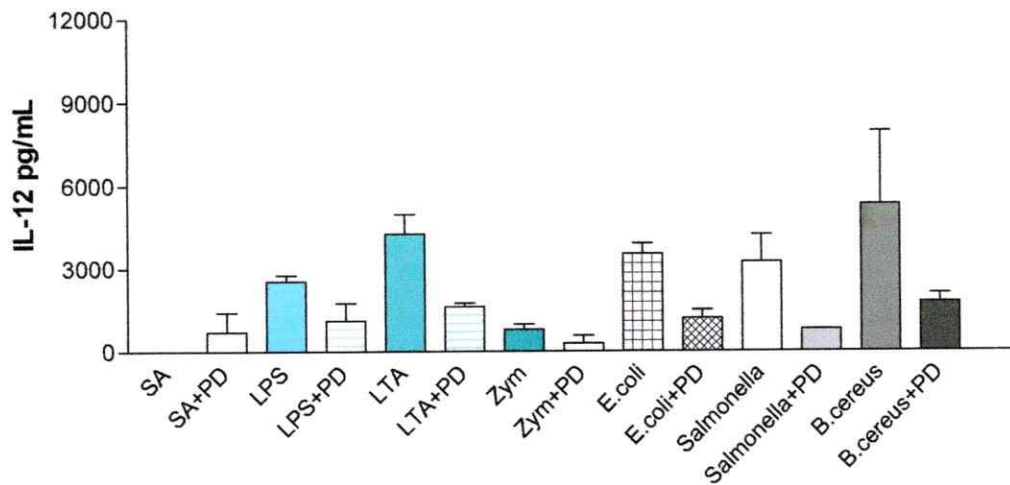
La IL-12 es una citoquina que promueve la erradicación de patógenos mediante la inducción de actividad antimicrobiana en macrófagos. Además, la IL-12 es un componente clave en el desarrollo de la respuesta Th1, y es producida en elevadas cantidad por células presentadoras de Ag, incluyendo a las DC (Trinchieri et al., 1995; Kalinski et al., 1999). Por el importante papel que juega esta citoquina en la maduración de la respuesta inmune, nuestro trabajo continuó con el análisis funcional de las DC en suspensión y adherentes, estudiando el efecto directo de distintos agonistas de TLR en la secreción de IL-12. Como se ilustra en la figura 6, DC en suspensión y DC adherentes secretan IL-12 frente a moléculas microbianas purificadas y bacterias. En el caso de las moléculas purificadas, el reconocimiento a través de TLR2/1 (TLRs que heterodimerizan cuando el estímulo es LTA) induce un mayor nivel de secreción de IL-12 en comparación con los estímulos reconocidos a través de TLR4 (LPS) y TLR2/6 (Zym). Comparando ambas poblaciones de DC, es posible describir que las DC en suspensión secretan altos niveles de IL-12 (>7000 pg/mL) cuando son estimuladas con bacterias Gram (-) o con bacterias Gram (+), a diferencia de las DC adherentes, donde no se supera los 5000 pg/mL de IL-12.

Como se mencionó anteriormente, la señalización a través de TLR activa a proteínas de las MAPK, es por ello que también analizamos el papel de la vía ERK en la secreción de IL-12. Cuando se inhibió la vía ERK se observó que la secreción de IL-12 fue bloqueada parcialmente. Para todos los estímulos la vía ERK no juega un rol esencial, lo que demuestra la participación de otras vías de señalización, anexas a ERK.

## A DC en Suspensión



## B DC Adherentes



**Figura 6.** DC en suspensión secretan mayores niveles de IL-12 que DC adherentes. La vía ERK está involucrada en la secreción de esta citoquina. Las DC en suspensión y adherentes fueron activadas con estímulos bacterianos puros o bacterias enteras durante 4 horas, en presencia o ausencia del inhibidor de la vía ERK (PD98059). **A.** Secreción de IL-12 por DC en suspensión. **B.** Secreción de IL-12 por DC adherentes.

### ***3.7 Secreción de IL-2 por Células Dendríticas activadas con estímulos patogénicos***

Recientemente se ha descrito que DC activadas con bacterias Gram (-) aumentan tanto la expresión de ARN mensajero de IL-2 como la secreción de esta citoquina, dentro de las primeras 4-6 horas de estímulos. La producción de IL-2 por las DC podría explicar la capacidad estimuladora hacia LT vírgenes, característica propia sólo de este tipo celular (Granucci et al., 2001).

Debido a la relevancia de estos antecedentes también estudiamos la secreción de IL-2 producida por las DC en suspensión y por las DC adherentes en respuesta a los estímulos ya mencionados.

Como se indica en la Tabla 2, DC en suspensión y DC adherentes, activadas con estímulos microbianos purificados o bacterias enteras, secretan IL-2. Para el caso de la señalización a través de TLR2/6 (Zym), los niveles de IL-2 son elevados (~100 pg/mL), superando a las concentraciones donde las DC fueron activadas con bacterias enteras.

Por otra parte, al estudiar el papel que juega la vía ERK en la secreción de IL-2, observamos que esta vía tiene un rol primordial, ya que las DC en suspensión y las DC adherentes pretratadas con el inhibidor de ERK y activadas con todos los estímulos, disminuyen notoriamente los niveles de IL-2 secretados.

**TABLA 2:** La vía ERK es fundamental para la secreción de IL-2 en DC.

**A**

Estímulos	IL-2 pg/mL		Inhibición (%)
	PD98059		
	(-)	(+)	
Sin activar	1,27	0	100
LPS	57,91	7,39	87,23
LTA	58,66	8,96	84,72
Zym	166,34	26,19	84,25
<i>E.coli</i>	124,2	26,1	78,98
<i>B.cereus</i>	129,5	23,7	81,69
<i>S.typhimurium</i>	129	20	84,49

**B**

Estímulos	IL-2 pg/mL .		Inhibición (%)
	PD98059		
	(-)	(+)	
Sin activar	0	0	0
LPS	38,2	1,3	96,59
LTA	48,13	1,8	96,26
Zym	78,6	1,33	98,31
<i>E.coli</i>	119,6	0,33	99,72
<i>B.cereus</i>	20,32	0,88	95,67
<i>S.typhimurium</i>	16,18	0,5	96,91

\*Las DC en suspensión y adherentes fueron activadas con estímulos bacterianos puros o bacterias enteras durante 4 horas, en presencia o ausencia del inhibidor de la vía ERK (PD98059). **A.** Secreción de IL-2 por DC en suspensión. **B.** Secreción de IL-2 por DC adherentes. Valores representativos de 2 experimentos independientes.



### ***3.8 Células Dendríticas en respuesta anti inflamatoria: secreción de IL-10***

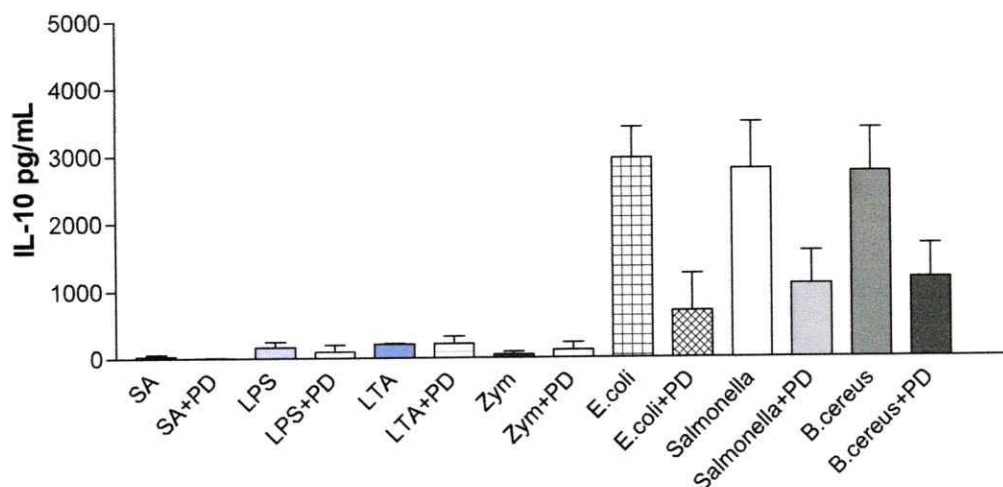
Se ha descrito que las DC juegan un papel importante en la polarización de la respuesta de LT *helper* (respuesta Th1 versus Th2) al secretar diferencialmente IL-12 o IL-10, respectivamente (Corinti et al., 2001). Además se ha demostrado que las DC son capaces de secretar IL-10 en respuesta a estímulos bacterianos, como por ejemplo LPS (Xia et al., 2003).

Basándonos en estos antecedentes nos propusimos estudiar la secreción de IL-10 por parte de ambos tipos de DC activadas con los distintos estímulos ya descritos.

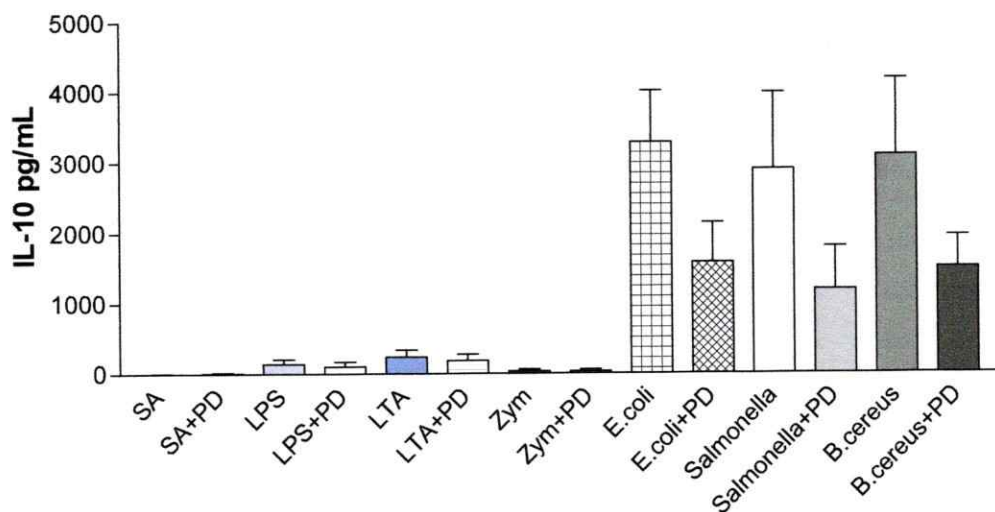
Como indica la figura 7, tanto las DC en suspensión como las DC adherentes secretan altos niveles de IL-10 cuando son estimuladas con bacterias enteras (>3000 pg/mL). La señalización a través de TLR2/1, TLR4 y TLR2/6 (estímulos purificados) no sería suficiente para lograr la secreción de esta citoquina. Alternativamente, el reconocimiento de otros componentes bacterianos (que al mismo tiempo involucraría señalización a través de receptores distintos de TLR para el caso de bacterias enteras como estímulo), permitiría la secreción de IL-10.

La inhibición de la vía ERK disminuye ~50% la secreción de esta citoquina, lo que sugiere vías alternativas en la señalización para su secreción.

## A DC en Suspensión



## B DC Adherentes



**Figura 7.** DC en suspensión y DC adherentes estimuladas con bacterias secretan altos niveles de IL-10. La vía ERK está involucrada en la secreción de esta citoquina. Las DC en suspensión y adherentes fueron activadas con estímulos bacterianos puros o bacterias enteras durante 4 horas, en presencia o ausencia del inhibidor de la vía ERK (PD98059). **A.** Secreción de IL-10 por DC en suspensión. **B.** Secreción de IL-10 por DC adherentes.

### 3.9 Cinética de fosforilación de la vía ERK en Células Dendríticas

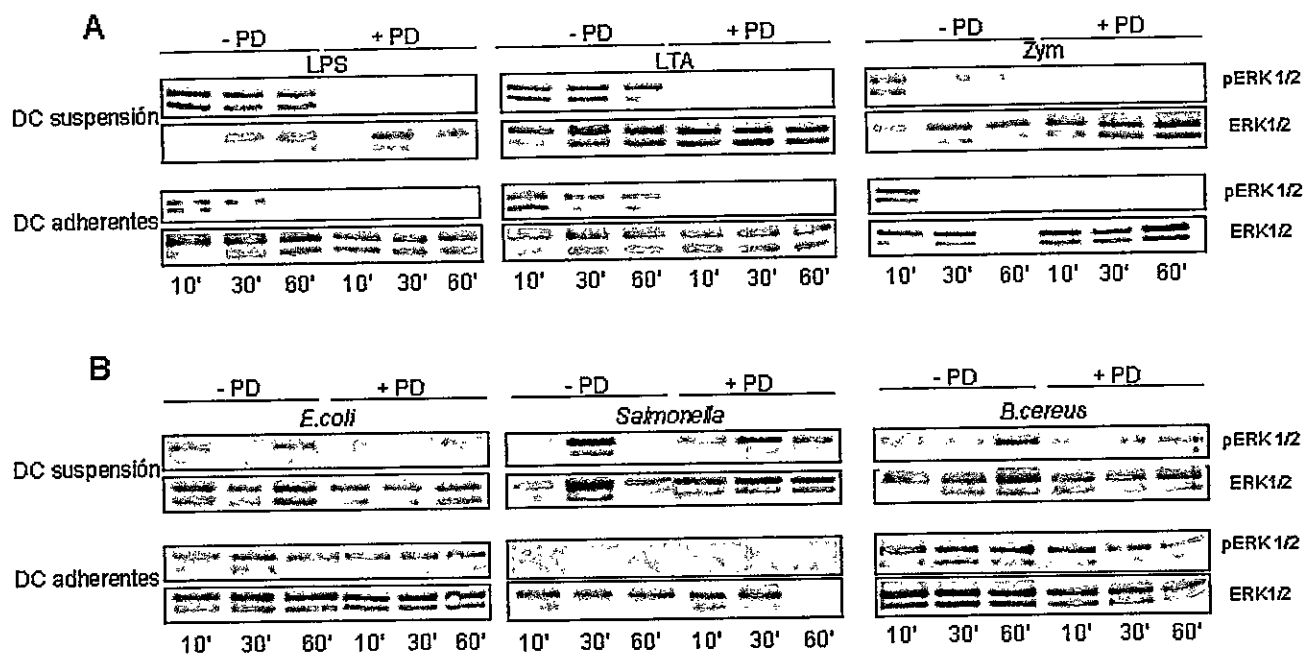
Debido a que la unión de los ligandos microbianos con los TLR activa distintas vías de señalización intracelulares, los que incluyen la familia de las MAPK (Brightbill et al., 2000), nos propusimos estudiar la cinética de fosforilación de ERK cuando las DC en suspensión y las DC adherentes son activadas con los estímulos ya mencionados.

Como se indica en la figura 8A, cuando las DC en suspensión y adherentes fueron activadas con los estímulos microbianos purificados (LPS, LTA y Zym) se observó una temprana fosforilación de ERK (pERK). La presencia del inhibidor de la vía ERK bloquea totalmente la fosforilación de esta proteína en DC en suspensión y adherentes activadas con estímulos microbianos purificados.

Cuando las DC en suspensión se estimularon con bacterias enteras (figura 8B) observamos que ERK es fosforilada tempranamente. Al estudiar la población adherente activadas con estos mismos estímulos (bacterias) observamos que *E.coli* y *B.cereus* inducen la fosforilación temprana y mantenida de ERK. Cuando se estimuló con *S. typhimurium* no se observó fosforilación de ERK.

A diferencia de las DC activadas con estímulos microbianos purificados, en las DC activadas con bacterias el inhibidor no bloqueó la fosforilación de ERK.

En controles de células dendríticas sin activar no se observó pERK (datos no mostrado).



**Figura 8.** Cinética de fosforilación de la vía ERK en DC en suspensión y DC adherentes. Al día 12 de cultivo, DC en suspensión y DC adherentes ( $1 \times 10^6$  céls) fueron activadas por distintos tiempos (10, 30 y 60 min) con estímulos microbianos purificados (LPS, LTA y Zym) y bacterias enteras (*E.coli* y *S.typhimurium* (10 moi), *B.cereus* (5 moi)), en presencia o ausencia ( $\pm$  PD) del inhibidor de la vía ERK (PD98059, 100 uM). **A.** Cinética de fosforilación de ERK tanto en DC en suspensión como en DC adherentes activadas con moléculas microbianas purificadas. **B.** Cinéticas de fosforilación de ERK en DC en suspensión y DC adherentes activadas con bacterias.

#### 4. DISCUSIÓN

Las DC derivan de células troncales hematopoyéticas en la médula ósea y forman una red de poblaciones celulares heterogéneas (Moll, 2003). Las DC inmaduras se encuentran en la sangre, tejido linfoide y no linfoide, mientras que DC maduras se encuentran principalmente en tejido linfoide (Resigno, 2002). Las DC inmaduras captan patógenos y/o Ag microbianos para degradarlos y cargar péptidos de éstos en MHC-II (Blanck et al., 1993; Guermonprez et al., 2002). El reconocimiento e internalización de las estructuras microbianas induce la maduración de las DC, un proceso que es acompañado por la migración desde el tejido periférico a áreas de LT en los órganos linfáticos secundarios (Moll et al., 1993).

En el transcurso de la maduración, las DC sufren profundos cambios; la capacidad endocítica disminuye, mientras que la expresión de MHC-II aumenta. Además, las DC maduras aumentan los niveles de CD80, CD86 y CD40 en la superficie (Banchereau et al., 2000). Como resultado de estas múltiples modificaciones, las DC maduras adquieren la habilidad de gatillar una respuesta primaria por LT. Las DC juegan un rol crítico en determinar la respuesta inmune emergente. Su activación por Ag microbianos induce la producción de citoquinas tales como IL-12 o IL-10, las cuales promueven el desarrollo de una respuesta Th1 o Th2 (Reis e Sousa et al., 1997; Moser & Murphy, 2000).

Muchos grupos de investigación se han centrado en la generación de un gran número de DC funcionales, tanto en ratón como en humanos, tratando los precursores de médula ósea solamente con GM-CSF, citoquina esencial para la diferenciación a este tipo celular o en combinación con otros factores de crecimiento (Scheicher et al., 1992; Inaba et al., 1992). Sin embargo, tales DC pueden ser propagadas solamente por periodos de tiempo limitados

(~3 meses). Winsler et al., han presentado evidencia que muestra que DC inmaduras pueden mantenerse en proliferación en cultivo continuo por más de 1 año. La proliferación y supervivencia de tales DC inmaduras dependería de GM-CSF exógeno y de factores de crecimiento de fibroblastos (Winzler et al., 1997). Por otra parte, Lutz et al., exploró factores que pueden incrementar la producción y maduración de DC propagadas a partir de precursores de médula ósea, en presencia de GM-CSF recombinante o en presencia del sobrenadante de una línea celular transfectada con GM-CSF murino. Sus resultados indican que es posible obtener DC (80-90% CD11c<sup>+</sup>) en grandes cantidades (1-3 x 10<sup>8</sup> células por ratón) luego de 10 días de cultivo (Lutz et al., 1999).

Desde 1997 varios grupos de investigación han utilizado en sus trabajos DC generadas en presencia del sobrenadante de la línea celular J558L (Qin et al., 1997; Lennon-Duménil et al., 2001; Rafiq et al., 2002; Qi et al., 2003; Cuadros et al., 2003; Yamazaki et al., 2003). Aunque en algunos de los estudios estas DC han sido utilizadas en terapias anti tumorales, no hay reportes que describan una caracterización fenotípica y funcional de las DC producidas mediante este protocolo.

Los experimentos realizados en esta tesis se orientan hacia la generación de un protocolo que permita obtener un gran número de DC, utilizando el sobrenadante de la línea celular J558L como fuente de GM-CSF y a la caracterización fenotípica y funcional de las células obtenidas.

Los resultados muestran que el cultivo de los precursores de médula ósea en presencia de este sobrenadante permite obtener una población heterogénea de DC lo cual no había sido reportado en ningún trabajo de la literatura. En los días iniciales del cultivo (días 0 al 4), las células poseen alta capacidad mitótica, la que disminuye a medida que transcurre el cultivo.

Durante todo este periodo, se observó 2 subgrupos de células, las que fueron definidas como DC en suspensión y DC adherentes. Las primeras siempre fueron más abundantes que las últimas.

Al analizar el fenotipo de ambos subgrupos, se observó que, tanto las DC en suspensión como adherentes incrementan la co-expresión de CD11c/MHC-II durante el cultivo (Figura 1). Este aumento, en función del tiempo, fue más importante en las DC en suspensión, donde al día 12 fue posible distinguir dos poblaciones de células, una CD11c/MHC-II intermedia y otra CD11c/MHC-II alta (Figura 2). Sin embargo, la fracción de DC adherentes fue más rica en células CD11c<sup>+</sup>, en cualquier tiempo del cultivo (Figura 1).

Cuando se estudió la expresión de las moléculas coestimuladoras, se observó que ambos tipos de DC expresan CD40 de similar manera (datos no mostrados), mientras que para CD86, la diferencia fue importante. A través del cultivo, las DC en suspensión aumentaron linealmente la expresión en la superficie de CD86 (Figura 1), a diferencia de las DC adherentes que mantuvieron un bajo porcentaje (< 10%) de células CD11c<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup>.

La observación anterior permite discriminar y definir, fenotípicamente a las DC en suspensión como células más maduras y a las DC adherentes como más inmaduras.

Debido a las diferencias en el fenotipo de ambos tipos celulares, el paso siguiente fue estudiar el estado de madurez de estas células a nivel funcional. Para ello se analizó la capacidad endocítica, la que se ha demostrado se encuentra disminuida en las células maduras.

Los resultados indican que la población de DC adherentes presentan mayor capacidad endocítica que las DC en suspensión, apoyando la idea que las primeras son más inmaduras

que estas últimas (Figura 3). Esto corresponde con la observación realizada a partir del estudio fenotípico, donde las DC en suspensión son más maduras que las DC adherentes.

Para estudiar la relación entre el estado de madurez y la capacidad endocítica, tanto las DC en suspensión como adherentes fueron activadas con LPS durante 4 y 24 horas. Cuando se analizó la capacidad endocítica no se observó diferencias con respecto a las DC no activadas, lo que sugiere que estas células son incapaces de aumentar su estado de maduración frente a este estímulo (datos no mostrados).

Las diferencias fenotípicas observadas entre ambos tipos de DC (expresión de MHC-II y CD86), nos llevaron a indagar acerca de la capacidad estimulatoria de ellas en una MLR usando LT alogénicos.

Debido a que la población de DC en suspensión expresa mayores niveles de MHC-II y CD86, esperábamos que ellas serían capaces de estimular la proliferación de los LT en mayor medida que las DC adherentes. Los resultados no mostraron diferencias entre aquellos LT estimulados con DC en suspensión o DC adherentes, aunque en ambos casos el 70% de los LT entraron en proliferación cuando la razón DC:LT fue de 4:1 (Figura 4). Esta observación sugiere que el estado de maduración de ambos tipos de DC no permite una estimulación óptima de los LT, o bien, que algún otro factor (soluble) podría estar afectando la respuesta proliferativa de los LT frente a las DC.

Como se mencionó al comienzo de este trabajo, las DC reconocen estructuras características microbianas a través de receptores más o menos específicos, los que incluyen los TLR. La señalización a través de ellos induce la maduración de estas células liderando un incremento en la inmunogenicidad (Takeda et al., 2003). Varios receptores TLR han sido identificados a la fecha, y se ha demostrado que ellos permiten discriminar patrones característicos de patógenos. La activación de vías de transducción de señales por



los TLR lleva a la inducción de varios genes que funcionan en el sistema de defensa del huésped, los que incluyen citoquinas inflamatorias, quimioquinas, moléculas MHC y de coestimulación (Medzhitov, R. 2001).

Tanto los TLR como el IL-1R cuentan con dominios TIR intracelular los cuales activarían vías de señalización similares, incluyendo NFkB, MAPK p38, JNK y ERK1/2 (Re et al., 2001).

Dong et al., ha indicado que las MAPK juegan un rol crítico en la regulación de la respuesta Th1/Th2 en LT (Dong et al., 2002). Al mismo tiempo, Yi et al., sugiere un rol de estas proteínas en la regulación de la producción de citoquinas en células presentadoras de Ag (Yi et al., 2002).

En esta tesis también se estudió el rol de la vía ERK1/2 en las DC en suspensión y en las DC adherentes activadas con diferentes estímulos, los que son reconocidos a través de distintos TLR. El análisis se centró en el papel que juega esta vía, tanto en la adquisición del fenotipo de las DC como en la secreción de citoquinas, haciendo uso de un inhibidor específico (PD98059), el que impide la fosforilación y activación de ERK1/2.

Los resultados indican que, tanto las DC en suspensión como las DC adherentes son incapaces de avanzar en su estado de madurez, ya sea frente a estímulos purificados (LPS, LTA y Zym) o frente a bacterias (Tabla 1). Lo anterior fue demostrado analizando el fenotipo de las células (CD11c/MHC-II y CD11c/CD86) post-activación. Además, se encontró que el inhibidor de la vía ERK no afecta la expresión de estas moléculas. Por lo tanto, la vía ERK no estaría involucrada en la maduración temprana de las DC.

Debido a las observaciones realizadas a partir de los ensayos de endocitosis, MLR y activación de las DC con distintos estímulos, donde las células no muestran un cambio

notable en el estado de madurez, se determinó estudiar las citoquinas presentes en el sobrenadante de la línea celular J558L.

A través del ensayo de ELISA se pudo detectar IL-10 y la ausencia de IL-2, IL-12, IL-4 e IFN- $\gamma$  (figura 5). La presencia de IL-10 en este sobrenadante concuerda con lo descrito por Qin et al, donde líneas tumorales expresan espontáneamente IL-10 por razones aun desconocidas. La presencia de esta citoquina explicaría que tanto DC en suspensión como DC adherentes no maduran frente a agentes microbianos. Lo anterior sería apoyado por trabajos donde DC tratadas con IL-10 producen células inmaduras con bajos niveles de expresión de moléculas MHC-II y coestimuladoras en su superficie las cuales serían capaces de generar tolerancia (Steinbrink et al., 1997; Adikari et al., 2004).

Continuando con el estudio funcional de ambas poblaciones de DC, se analizó la secreción de citoquinas en respuesta a estímulos microbianos purificados dirigidos a TLR2/TLR1 (LTA), TLR4 (LPS) y TLR2/TLR6 (Zym). Además se estudió el efecto de bacterias Gram (+) y Gram (-), y el rol de la vía ERK en la secreción de citoquinas. Luego de la activación con los distintos estímulos se detectó la presencia de IL-12, IL-2 e IL-10, mientras que para IL-4 e IFN- $\gamma$  se obtuvo resultados negativos. Al estudiar la secreción de IL-12 (Figura 6) se observó que LTA inducía niveles levemente más altos que LPS o Zym, tanto en DC en suspensión como en DC adherentes, lo que se traduce en que la estimulación a través del heterodímero TLR2/1 activado cuando se trata de LTA es mejor señal para la secreción de esta citoquina, que el heterodímero TLR6/2 activado por Zym o TLR4 activado por LPS.

Cuando se usó bacterias como estímulo, la población de DC en suspensión mostró niveles de IL-12 mucho más altos que las DC adherentes, las que presentaron concentraciones similares a la detectada luego de la estimulación con agentes purificados. Al utilizar el

inhibidor de la vía ERK se pudo observar que esta MAPK participa en la secreción de IL-12, pero no juega un rol único, ya que la inhibición en la secreción de IL-12 fue sólo parcial.

En el estudio de la secreción de IL-2 las cantidades de esta citoquina secretadas variaron entre experimentos. Sin embargo, cabe señalar que la tendencia tanto en la secreción de IL-2 como en los porcentajes de inhibición es reproducible. Como muestra la tabla 2, tanto la población de DC en suspensión como adherentes secretan IL-2 frente a todos los estímulos. Dentro de los estímulos microbianos purificados, Zym resultó ser mejor activador (mayores niveles de IL-2) en ambas poblaciones de DC, donde en la población de DC en suspensión superó los niveles secretados cuando se trató con bacterias enteras como estímulo. Lo anterior sugiere que la señalización a través de TLR2/TLR6 (activado por Zym) promueve la secreción de IL-2, a diferencia de lo observado para IL-12, donde TLR2/TLR1 (activado por LTA) aparece como crucial para generar altos niveles de IL-12.

Por otra parte, la vía ERK sería esencial en la señalización de IL-2 ya que la inhibición de esta vía redujo drásticamente los niveles de IL-2 secretados. Nuestros resultados concuerdan con reportes anteriores sobre la presencia de IL-2 por DC (Granucci et al., 2001), aunque este fenómeno no ha sido estudiado por aquellos grupos que utilizan un protocolo para generar DC con el sobrenadante de las células J558L.

Por otro lado, tanto las DC en suspensión como las adherentes no secretan IL-10 en respuesta a estímulos bacterianos purificados. Por lo tanto, la señalización a través de TLR4 y TLR2 dimerizado con TLR1 y TLR6 constituiría una señal débil para la secreción de esta citoquina.

Por el contrario, tanto en las DC en suspensión como adherentes activadas con bacterias completas secretan importantes niveles de IL-10 (>3000 pg/mL).

Esto indicaría que la secreción de esta citoquina requeriría de señales más intensas (bacterias enteras vs estímulos purificados) y que los estímulos dirigidos a TLR puntuales serían insuficientes para este fin, figura 7.

La inhibición de la vía ERK mostró una reducción parcial en los niveles de IL-10 secretados, lo que sugiere que en la producción de esta citoquina esta no sería la única vía de transducción involucrada.

Cuando se analizó la cinética de fosforilación de la vía ERK (pERK), figura 8, en DC en suspensión y adherentes activadas con estímulos microbianos purificados, se observó que la fosforilación de ERK ocurre tempranamente y no se mantiene en el tiempo. Al realizar el mismo estudio en DC activadas con bacterias completas se observó que en DC en suspensión los tres tipos bacterianos utilizados (*E.coli*, *S.typhimurium* y *B.cereus*) activan la fosforilación de ERK tempranamente, la cual se mantiene en el tiempo. Por otro lado, en las DC adherentes se observó los mismos resultados cuando los estímulos fueron *E.coli* y *B.cereus*, mientras que con *S.typhimurium* no se detectó la fosforilación de ERK. Si consideramos que esta bacteria enviaría señales a través del TLR5 -debido a que posee flagelo- y a que diversas subpoblaciones de DC varían en su expresión de los diferentes TLR, estimamos necesario analizar en el futuro la expresión diferencial de estos TLR tanto en las DC en suspensión como en las adherentes con el fin de explicar la diferencias observadas.

Agrawal et al. han descrito que en DC humanas activadas con agonistas de TLR tanto la magnitud como la duración de la fosforilación de las vías MAPK tendría un efecto en la respuesta inmune. Esto se debería a que los blancos finales de las vías de señalización son factores de transcripción involucrados con la expresión de genes (moléculas de superficie,

citoquinas, reguladores de la viabilidad celular, etc) que juegan un papel en la respuesta efectora.

Las diferencias en la cinética de fosforilación sugiere que la activación de TLR específicos (estímulos purificados) sería una señal débil con respecto a bacterias completas, donde las DC las reconocerían por más de un TLR, además de la participación de otros receptores. La observación que la forma fosforilada de ERK se mantiene en el tiempo cuando el estímulo es bacteria completa, sugiere además que en el núcleo podrían reclutarse múltiples genes encargados de la expresión de proteínas de manera de asegurar una respuesta inmune más eficiente contra a estos patógenos. Debido a que la presencia del inhibidor de ERK no disminuyó la fosforilación de esta proteína cuando el estímulo es bacteria completa, indica que se requerirían de concentraciones mayores para bloquear la señal gatillada por estos estímulos. Para el caso de IL-2 específicamente, donde la vía ERK sería esencial para la secreción de esta citoquina, aunque la concentración del inhibidor usada es efectiva para bloquear eficientemente la secreción de esta proteína (para todos los estímulos), no la sería para bloquear la fosforilación de ERK cuando las DC sensan bacterias. Cabe mencionar que la vía ERK podría estar involucrada en otros procesos como sería la expresión de moléculas relacionadas con la capacidad migratoria de estas células, en la sobrevivencia de ellas, entre otros, lo cual requiere nuevos estudios para complementar las observaciones antes discutidas.

En resumen, los resultados mostrados en esta tesis establecen que los precursores de médula ósea de ratón cultivados con el sobrenadante de las células J558L generan efectivamente un gran número de DC, pero que las DC generadas en esta tesis están compuestas de al menos 2 tipos celulares que se diferencian por su fenotipo, estado de madurez y vías de señalización intracelular activadas por compuestos purificados

provenientes de bacterias o bacterias completas. Cabe destacar que las DC generadas poseen baja capacidad de maduración lo cual las hace atractivas para el estudio y generación de terapias que involucren la mantención o generación de un estado de tolerancia, como en el caso de la trasplantología o enfermedades autoinmunes. Es por ello que en nuestro laboratorio continuamos con el estudio de ambas poblaciones. Por una parte considerando que las DC en suspensión poseen en su membrana una alta expresión de moléculas MHC (presentación antigénica) y CD86 (coestimulación) lo que permitiría la manipulación de ellas para presentar antígenos de interés e inducir una respuesta inmune dirigida, sin que las células entren en un proceso de maduración. Adicionalmente, estudiamos la posible función de ambas poblaciones de DC en la generación de tolerancia *in vivo* en un modelo de trasplante de piel. Es así como hemos observado, sorprendentemente, que la población de DC en suspensión, que posee un fenotipo más maduro que las DC adherentes promueve la sobrevida de injerto de piel alogénico, no así las DC adherentes con un fenotipo más inmaduro. Esta observación es apoyada por estudios recientes que han descrito a CD86 como una molécula esencial para la función supresora de LT reguladores encargados de la generación y/o mantención de un estado de supresión o tolerancia (Zheng et al., 2004).

Este trabajo aporta a la expansión *ex vivo* de DC que podrían usarse en diferentes terapias. Nuestros datos señalan además que las conclusiones de trabajos ya reportados en la literatura deberían ser revisadas en función de estas observaciones.

## 5. CONCLUSIONES

- Precusores de médula ósea de ratón cultivados en presencia de GM-CSF, presente en el sobrenadante de las células J558L se diferencian a DC, luego de 12 días de cultivo.
- Los cultivos obtenidos corresponden a una población celular heterogénea, compuesta de dos tipos de DC (suspensión y adherentes), con una pureza que supera el 70% de células CD11c<sup>+</sup>.
- Además de no requerir GM-CSF recombinante comercial ni purificación por selección con columnas magnéticas, este cultivo permite generar  $>3 \times 10^8$  de DC, a partir de un ratón.
- Fenotípicamente, ambas poblaciones celulares son distinguibles, donde las DC en suspensión resultan ser más maduras (CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>) que las DC adherentes (CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>CD86<sup>-</sup>).
- Funcionalmente, ambos tipos de DC presentan capacidad endocítica, además de estimular LT alogénicos.
- Tanto DC en suspensión como adherentes son incapaces de una posterior maduración frente a estímulos microbianos (sobreexpresar moléculas presentadoras de Ag y coestimuladoras), lo que es independiente de la vía ERK.
- IL-10 presente en el sobrenadante de las células J558L podría estar manteniendo el estado de inmadurez de las DC.

- Las citoquinas IL-2, IL-12 e IL-10 son secretadas por DC en suspensión y adherentes frente a estímulos patogénicos. Mientras que IL-4 e IFN- $\gamma$  no fueron detectadas.
- La vía ERK sería esencial para la secreción de IL-2. Para IL-12 e IL-10 actuarían vías adicionales.
- pERK se detectó tempranamente y se mantuvo en el tiempo cuando DC en suspensión se maduraron con estímulos purificados. No así en DC adherentes donde pERK decae en el tiempo.
- El inhibidor específico de la vía ERK bloquea completamente la fosforilación de ERK cuando se utilizó componentes microbianos purificados.
- pERK se detectó tempranamente y se mantuvo en el tiempo cuando las DC en suspensión y DC adherentes fueron activadas con bacterias.
- *S. typhimurium* no induce la fosforilación de ERK en DC adherentes.
- El inhibidor específico de la vía ERK no bloquea completamente la fosforilación de ERK cuando se usan bacterias como estímulo.



## 6. REFERENCIAS

1. Adikari, S., Pettersson, A., Soderstroms, YM & Link, E. (2004) *Scand. J. Immunol* **59**: 600-606.
2. Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van Dyke, T & Pulendran, B. (2003) *J. Immunol* **171**: 4984-4989.
3. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S & Liu, YJ. (2000) *Annu. Rev. Immunol* **18**: 767-811.
4. Blanck, C., Fuchs, H., Rappersberger, K., Röllinghoff, M & Moll, H. (1993) *J. Infec. Dis* **167**:418-425.
5. Brightbill, HD & Modlin, RL. (2000) *Immunology* **101**:1-10.
6. Cella, M., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (1997) *Curr. Opin. Immunol* **9**:10-16.
7. Corinti, S., Albanesi, C., Sala, A., Pastore, S & Girolomoni, G. (2001) *J. Immunol* **166**: 4312-4318.
8. Cuadros, C., Dominguez, AL., Frost, G., Borgstrom, P & Lustgarten, J (2003) *Cancer Research* **63**: 5895-5901.
9. Dong, C., R. J. Davis, & R. A. Flavell. (2002) *Annu. Rev. Immunol* **20**: 55-72.
10. Granucci, F., Fean, S., Angeli, V., Trottein, F & Ricciardi-Castagnoli, P. (2003) *J. Immunol* **170**: 5075-5081.
11. Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Resigno, M., Moro, G & Ricciardi-Castagnoli, P. (2001) *Nat. Immunol* **2(9)**: 882-888.
12. Grohmann, U., Belladonna, M., Vacca, C., Bianchi, R., Fallarino, F., Orabona, C., Fioretti, M & Puccetti, P. (2001) *J. Immunol* **167**: 221-227

13. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thèry, C & Amigorena, S. (2002) *Annu. Rev. Immunol* **20**: 621-667.
14. Hashimoto, C., Hudson, KL & Anderson, KV. (1988) *Cell* **52**: 269-279.
15. Inaba, K., Witmer-Pack, M & Inaba, M. (1994) *J. Exp. Med* **180**:1849-1860.
16. Kalinski, P., Hilkens, C., Wierenga, E & Kapsenberg, M. (1999) *Immunol. Today* **20**: 561-567.
17. Lemaître, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, JM & Hoffman JA. (1996) *Cell* **86** : 973-983.
18. Lennon-Duménil, AM., Roberts, R., Valentijn, K., Driessen, C., Overkleeft, H., Erickson, A., Peters, P., Bikoff, E., Ploegh, H & Bryant, P. (2001) *The EMBO J* **20(15)**: 4055-4064.
19. Lu, HT., yang, DD., Wysk, E., Gatti, I., Mellman, RJ & Flavell, RA. (1999) *EMBO, J* **18**: 1845-1857.
20. Lutz, MB., Kukutsch, N., Ogilvie, AL., Rößner, S., Koch, F., Romani, N & Schuler, G. (1999) *J. Immunol. Meth.* **223**: 77-92.
21. Moll, H., Fuchs, H., Blanck, C & Röllinghoff, M. (1993) *Eur. J. Immunol* **23**:1595-1601.
22. Moll, Heidrun. (2003) *Cellular Microbiology* **5(8)**, 493-500.
23. Moore, KW., de Waal Malefyt, R., Coffman, RL & O'Garra, A. (2001) *Ann. Rev. Immunol* **19**: 683-765.
24. Moser, M & Murphy, KM. (2000) *Nat. Immunol* **1**:199-205.
25. Ozato, K., Tsujimura, H & Tamura, T. (2002) *Bio Techniques* **33**: 566-575.

26. Paul, W. (2003) *Fundamental of Immunology*, 5ta edición, Lippincott Williams & Wilkins.
27. Qi, H., Denning, T & Soong, L. (2003) *Infection and Immunity* **71(6)**: 3337-3342.
28. Qin, Z., Noffz, G., Mohaupt, M & Blankenstein, T. (1997) *J. Immunol* **159(2)**: 770-776.
29. Rafiq, K., Bertold, A & Clynes, R. (2002) *J. Clin. Invest* **110**: 71-79.
30. Reis e Sousa, C., Hien, S., Scharon-Kersten, T., Jankovic, D., Charset, H & Germain, R. (1997) *J. Exp. Med* **186**: 1819-1829.
31. Resigno, M. (2002) *TRENDS in Microbiology* **10(9)**, 425-431.
32. Resigno, M., Martino, M., Sutherland, C., Gold, M & Ricciardi-Castagnoli, P. (1998) *J. Exp. Med* **188 (11)**: 2175-2180.
33. Schuler, G & Steinman, RM. (1985) *J. Exp. Med* **161**: 526-546.
34. Shortman, K & Liu, YJ. (2002) *Nat. Rev. Immunol* **2**: 151-161.
35. Steinman RM & Witmer MD. (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 5132-5136.
36. Steinman RM. (1991) *Ann. Rev. Immunol.* **9**: 271-296.
37. Steinbrink, K., Wölfl, M., Jonuleit, H., Knop, J & Enk, A. (1997) *J. Immunol* **159**: 4772-4780.
38. Takeda, K., Kaisho, T & Akira, S. (2003) *Annu. Rev. Immunol* **21**: 335-376.
39. Takeda, K & Akira, S. (2004) *Sem. Immunol* **16**: 3-9.
40. Trinchieri, G. (1995) *Annu. Rev. Immunol* **13**: 251-276.
41. Trinchieri, G. (2003) *Nat. Rev. Immunol* **3**: 133-146.
42. Yi, A. K., J. G. Yoon, S. J. Yeo, S. C. Hong, B. K. English, and A. M. Krieg. (2002) *J. Immunol* **168**: 4711-4720.

43. Winzler, C., Rovere, P., Resigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V., Davoust, J & Ricciardi-Castagnoli, P. (1997) *J. Exp. Med* **185**(2): 317-328.
44. Zal, T., Volkmann, A. & Stockinger, B. (1994) *J. Exp. Med.* **180**, 2089.
45. Zheng, Y., Manzotti, C., Liu, M., Burke, F., Mead, K & Sansom, D. (2004) *J. Immunol* **172**, 2778-2784.