

UCH - FC  
Biotecnología  
U 75



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS

**GENERACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS COMPETENTES EN  
LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS ALOGÉNICOS EN FORMA  
NO INMUNOGÉNICA**

MEMORIA DE TÍTULO

ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE  
EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS  
PARA OPTAR AL GRADO DE:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

POR

**GONZALO ANDRÉS URETA DÍAZ**

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. MARÍA ROSA BONO

DR. JUAN ALBERTO FIERRO



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE PREGRADO

**GENERACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS COMPETENTES EN LA  
PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS ALOGÉNICOS EN FORMA NO  
INMUNOGÉNICA**

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

**GONZALO ANDRÉS URETA DÍAZ**

Dra. María Rosa Bono Merino  
**Directora Seminario de Título**

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

**Comisión de Evaluación de la Memoria de Título**

Dr. Christian González

Dr. Alejandro Roth



Santiago de Chile, Noviembre 2007.



“La vida se asemeja a una competencia...te preparas para lograr triunfos y metas,  
tienes momentos buenos y malos, tienes un equipo de apoyo  
y algún tutor que siempre te entrena y te enseña algo.  
Esta es la etapa donde comienza la carrera y tienes que demostrar lo aprendido.”



*En el fondo, los científicos somos gente con suerte:  
Podemos jugar a lo que queramos  
durante toda la vida.*  
Julius Robert Oppenheimer



## AGRADECIMIENTOS

Con este trabajo se cierra un ciclo más de mi vida, no menos importante que el ingreso a la enseñanza superior o la vez que di mi primer paso. Por esto quiero agradecer a todas las personas que aportaron en esta etapa. Primero agradecer a todas las personas del laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias que estuvieron aportando con ideas, colaborando con los experimentos y haciendo del laboratorio el mejor lugar de trabajo; a los jefes María Rosa, Mario y Alberto que me enseñaron el estilo de vida del investigador y el profesionalismo científico, además de permitirme continuar con mi vida deportiva en paralelo...se los agradeceré eternamente; a mis compañeros de trabajo Karina, Fernando, Daniela, Fabiola, Leito, Jaime, Alejandra, Pablo Vargas, Pablo Espejo, Pazita, Raúl, Jocelyn, Jenny, Paula, Carolina, Paola, Evita, Pamela y Oscar que hacen del laboratorio el lugar más agradable y buena onda para trabajar. Agradezco también su compañerismo y amistad incondicional entregados en todos estos años, no cambien nunca!

También agradezco a mis padres y hermanos por apoyarme siempre en todo y estar conmigo en las buenas y en las malas...sí, porque además de padres y hermanos, son también mis amigos.

Por último quiero agradecerle a ti Estrella, por acompañarme todos estos años y por estar conmigo en los momentos de alegría, pena, desilusión y reconciliación, por estar siempre presente en mi mente, por tu amistad y cariño, por tu desinterés en ayudarme en todo lo que necesité...y sobretodo...por tu amor.



## ÍNDICE GENERAL



DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE GENERAL	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ABREVIATURAS	VII
<b>RESUMEN</b>	X
<b>ABSTRACT</b>	XII
1. <b>INTRODUCCIÓN</b>	1
HIPÓTESIS	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
2. <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	9
2.1 Ratones	9
2.2 Anticuerpos y reactivos	9
2.3 Generación de células dendríticas de médula ósea	10
2.4 Activación de células dendríticas	11
2.5 Caracterización de células dendríticas	12
2.6 Preparación de fagosomas alogénicos	12
2.7 Medición de MHC-II en los fagosomas	13
2.8 Incorporación de fagosomas por células dendríticas	14
2.9 ELISA	15
2.10 Preparación de linfocitos T vírgenes	16
2.11 Determinación de la proliferación de los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> mediante tinción con CFSE	16

2.12	Inducción de linfocitos T reguladores	17
2.13	RT-PCR para la detección del factor de transcripción Foxp3	18
2.14	Análisis estadístico	19
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>20</b>
3.1	La vitamina D <sub>3</sub> detiene la maduración de células dendríticas de médula ósea y les confiere un fenotipo tolerogénico	20
3.2	Vitamina D <sub>3</sub> induce un patrón de secreción de citoquinas inhibitorio en células dendríticas activadas	23
3.3	Los fagosomas purificados presentan cantidades detectables de MHC-II	25
3.4	Células dendríticas incorporan eficientemente fagosomas alogénicos	28
3.5	La incorporación de fagosomas alogénicos no induce la maduración de las células dendríticas	30
3.6	La incorporación de fagosomas alogénicos no induce la secreción de citoquinas en las células dendríticas	32
3.7	Células dendríticas inmaduras presentan péptidos derivados de fagosomas a linfocitos T CD4 <sup>+</sup>	34
3.8	Células dendríticas cargadas con fagosomas-OVA generan una población de linfocitos T con marcadores de células reguladoras	36
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>38</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>46</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Células dendríticas cultivadas en presencia de Vitamina D <sub>3</sub> presentan un fenotipo inmaduro.	22
FIGURA 2	Células dendríticas cultivadas en presencia de Vitamina D <sub>3</sub> presentan un patrón de secreción de citoquinas inhibitorio.	24
FIGURA 3	Los fagosomas purificados de células dendríticas presentan forma regular esférica de 1 µm diámetro.	26
FIGURA 4	Los fagosomas contienen MHC-II en su membrana.	27
FIGURA 5	Células dendríticas inmaduras incorporan eficientemente fagosomas alogénicos.	29
FIGURA 6	La incorporación de fagosomas mantiene un fenotipo inmaduro en células dendríticas.	31
FIGURA 7	La incorporación de fagosomas alogénicos no activa la secreción de citoquinas.	33
FIGURA 8	Células dendríticas inmaduras presentan péptidos derivados de fagosomas-OVA a linfocitos T CD4 <sup>+</sup> de ratones OT-II.	35
FIGURA 9	DCs inmaduras cargadas con fagosomas-OVA generan una población de LT con fenotipo regulador.	37





## ABREVIATURAS

2-ME:	2-mercaptoetanol
APC:	célula presentadora de antígeno
CFSE:	<u>C</u> arboxi- <u>F</u> luoresceína diacetato <u>S</u> uccinimidil <u>E</u> ster
CCR7:	receptor de quimioquina 7
DC:	célula dendrítica
DiIC <sup>18</sup> :	1,1'-dioctadecil-3,3',3',3'-tetrametil indocarbocianina perclorato
DMEM:	medio Eagle modificado por Dulbecco
DMPC:	dimetil-pirocarbonato
DNA:	ácido desoxirribonucleico
DTT:	di-tio-treitol
cDNA:	ácido desoxirribonucleico complementario
EDTA:	ácido etilen diamino tetra acético
ELISA:	<u>e</u> nzyme <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay
FCS:	suero fetal bovino
FITC:	isotiocianato de fluoresceína
Foxp3:	<i>Forkhead winged helix protein-3</i>
GM-CSF:	factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
HRP:	<u>H</u> orse <u>R</u> adish <u>P</u> eroxidase
IFN- $\gamma$ :	interferón gamma
IgG:	inmunoglobulina G
IL-2:	interleuquina 2
IL-10:	interleuquina 10
IL-12:	interleuquina 12

IL-3R:	receptor de interleuquina 3
IMDM:	medio Dulbecco modificado por Iscove
LPS:	lipopolisacárido
LTA:	ácido lipoteicoico
LT:	linfocito T
LTreg:	linfocito T regulador
MACS:	<i>magnetic activated cell sorter</i>
MHC-I:	complejo principal de histocompatibilidad de clase I
MHC-II:	complejo principal de histocompatibilidad de clase II
MIP-3 $\alpha$ :	proteína inflamatoria de macrófagos
NF- $\kappa$ B:	factor nuclear kappa-B
OVA:	ovalbúmina
PBS:	tampón fosfato salino
PE:	ficoeritrina
PerCP:	proteína peridina clorofila-a
RNA:	ácido ribonucleico
mRNA:	ácido ribonucleico mensajero
rpm:	revoluciones por minuto
RPMI 1640:	medio de cultivo celular
RT-PCR:	reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
RXR:	receptor X retinoideo
SDS-PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

TAP:	transportador asociado con el procesamiento de antígenos
TLR:	<i>Toll-like receptor</i>
Th1:	linfocito T helper 1
Th2:	linfocito T helper 2
TMB:	tetra-metil-bencidina
TNF:	factor de necrosis tumoral
VD3:	1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D <sub>3</sub>
VDR:	receptor de vitamina D

## RESUMEN

Las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígeno capaces de generar una respuesta inmune frente a antígenos extraños y de inducir tolerancia frente a antígenos propios. El proceso inmunoestimulador depende de la presentación de péptidos antigénicos a linfocitos T en un contexto inflamatorio por las DCs. Este proceso es mediado por una alta expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y de moléculas coestimuladoras tales como CD40, CD80 y CD86, así como de la secreción de citoquinas activadoras de la respuesta inmune como IL-2 e IL-12. Por el contrario, la función tolerogénica se genera cuando las DCs inmaduras capturan y presentan antígenos en un contexto no inflamatorio caracterizado por la baja expresión de moléculas coestimuladoras y un patrón de secreción de citoquinas inhibitorio. En este estado las DCs son capaces de generar linfocitos T reguladores los cuales potencian una respuesta tolerogénica.

En trasplantes, diversos factores provocan la maduración y activación de las DCs desencadenando una respuesta inmune contra el órgano trasplantado y siendo en parte, responsables del rechazo al injerto. Por lo tanto, la generación de DCs capaces de presentar antígenos alogénicos en un contexto tolerogénico tiene importantes implicancias clínicas.

En una primera etapa de este trabajo, se detuvo la maduración de las DCs mediante la inclusión de vitamina D<sub>3</sub> (VD3) durante la diferenciación de los precursores de médula ósea hacia DCs. Luego de 12 días de tratamiento con VD3 se obtuvieron DCs inmaduras que presentan una baja expresión de moléculas de MHC-II y CD86. Por otra parte, se produjeron fagosomas alogénicos como fuente de aloantígenos para las DCs, los cuales contienen en su membrana moléculas de MHC-II alogénicas. Estos

fagosomas fueron incorporados a los cultivos de DCs inmaduras observándose que más del 85% de estas células incorporan los fagosomas luego de 24 horas de cultivo. La incorporación de estos fagosomas no induce la expresión de marcadores de maduración tales como MHC-II y CD86 y mantienen niveles basales de secreción de citoquinas activadoras del sistema inmune como interleuquinas 2 y 12 (IL-2 e IL-12). Las mismas células al ser activadas con LPS aumentan la secreción de IL-10 lo que es consistente con una actividad reguladora. Por último, con el objetivo de evaluar el efecto de las DCs inmaduras sobre los linfocitos T, se cargaron las DCs con fagosomas-OVA y se cocultivaron con linfocitos T transgénicos vírgenes que reconocen específicamente un péptido de OVA. En estas condiciones logramos generar una población de linfocitos T con fenotipo de células reguladoras caracterizadas por la expresión de las moléculas CD25 y CD62L y el RNA mensajero para el factor de transcripción Foxp3.

## ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are antigen presenting cells capable of generating an immune response against foreign antigens and induce a tolerance against self antigens. The immunostimulatory process depends on the presentation to T lymphocytes of the antigenic peptide by the DCs in an inflammatory context. This process is mediated by a high expression of molecules of the major histocompatibility complex and costimulatory molecules such as CD40, CD80 and CD86, as well as the secretion of activator cytokines such as interleukin 2 and interleukin 12 (IL-2 and IL-12). On the other hand, the tolerogenic function of DCs is generated when immature DCs capture and present antigens in a non-inflammatory context, characterized by a lower expression of coestimulatory molecules and a secretion pattern of inhibiting cytokines. In this state, DCs are capable of generating regulatory T lymphocytes which express a tolerogenic response.

Several factors cause the maturation and activation of DCs, which trigger an immune response against transplanted organ, and responsible of graft rejection. Therefore, the generation of DCs able to present allogeneic antigens in a tolerogenic context has important clinical implications.

In one of the first stages of this work, the maturation of the DCs was stopped through the inclusion of the vitamin D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) during the differentiation of bone marrow precursors to DCs. After 12 days of treatment with VD<sub>3</sub> we obtained immature DCs that present a low surface expression of MHC-II and CD86 molecules. On the other hand, we produced phagosomes as a source of alloantigens for the DCs, which contain allogeneic MHC-II molecules in their membrane. When these phagosomes were cultured with immature DCs, more than 85% of these cells incorporate the phagosomes

after 24 hours of culture. These phagosomes incorporation did not induce the expression of maturation markers such as MHC-II and CD86, while basal levels of activator cytokines such as IL-2 and IL-12 were maintained. After activation with LPS, DCs increase IL-10 secretion which is consistent with a regulatory activity. Finally, in order to evaluate the effect of immature DCs on T lymphocytes, we incubated the DCs with phagosomes loaded with OVA and cocultivated then with naive transgenic T lymphocytes that specifically recognize an OVA peptide. Under these conditions we observed a population of T lymphocytes with a regulatory cell phenotype, as characterized by the expression of CD25 and CD62L and the messenger RNA for the transcription factor Foxp3.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las células dendríticas (DCs) pertenecen al grupo de células presentadoras de antígenos (APC) del sistema inmune y son las únicas células capaces de generar una respuesta inmune primaria. Están involucradas en la inducción y control de la inmunidad mediada por linfocitos T y en la modulación de la respuesta mediada por linfocitos B. Debido al importante rol que cumplen en la inducción y modulación de la respuesta inmune, las DCs han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas desde hace más de 30 años (Barker, 1967).

Las DCs están distribuidas en diversos órganos y tejidos, especialmente en las puertas de entrada para el acceso de antígenos y microorganismos. Así, las DCs se pueden encontrar en los epitelios de la piel y de los sistemas gastrointestinal y respiratorio, como también en órganos linfoides (Kelsall y Strober, 1997; Wikstrom y Stumbles, 2007).

Existen diversas subpoblaciones de DCs que varían tanto en su capacidad para capturar y presentar antígenos, para activar o suprimir la respuesta inmune o para modular la respuesta humoral. La diversidad funcional de las DCs se relaciona con su origen mieloide o linfoide, con su estado de maduración, con su ubicación tejido-específica y con la interacción con otras células efectoras del sistema inmune (Banchereau y col, 2000; Shortman y Naik, 2002).

Las DCs se generan a partir de células progenitoras mieloides o linfoides y dependiendo de este origen, pueden diferenciarse tanto por la expresión de marcadores de superficie como por la función que desarrollan (Ardavín, 2003). Las DCs mejor estudiadas corresponden a las de origen mieloide (CD11c<sup>+</sup>) las cuales estimulan principalmente respuestas de tipo Th1, mientras que las DCs linfoides (IL-



3R<sup>+</sup>), generadas a partir de progenitores tímicos, producen generalmente respuestas de tipo Th2 o tolerogénica (Ardavín, 1997).

Las DCs mieloides se diferencian en células dendríticas inmaduras que migran hacia los tejidos periféricos en donde permanecen como células residentes hasta el encuentro con el antígeno. Estas células expresan receptores de ciertas quimioquinas como MIP-3 $\alpha$  secretada en el epitelio (Dieu y col, 1998), que le permiten viajar a los diferentes tejidos y permanecer en estos como células inmaduras. En este estado, las DCs se caracterizan por acumular moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) en compartimientos endosomales y presentar bajos niveles de MHC-II y moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 en la superficie (Kleijmeer y col, 1995; Banchereau y Steinman, 1998). Las células dendríticas inmaduras son altamente fagocíticas y utilizan diferentes vías para captar antígenos como (a) macropinocitosis, (b) endocitosis mediada por receptores de lectina tipo C (receptores de manosa y DEC-205) (Sallusto y col, 1995; Jiang y col, 1995) o receptores Fc $\gamma$  de tipo I, II y IV (Nimmerjahn y Ravetch, 2006) y (c) fagocitosis de partículas como perlas de látex, cuerpos apoptóticos (Albert y col, 1998) o necróticos, virus y bacterias (Rescigno y col, 1999).

Una vez que la célula dendrítica inmadura ha capturado algún antígeno comienza su proceso de maduración en el cual la DC sufre cambios fenotípicos y funcionales que culminan en la completa transición de célula fagocítica a célula presentadora de antígenos (APC). Durante este proceso, las DCs aumentan la expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras en la membrana celular, además de aumentar la secreción de citoquinas proinflamatorias y activadoras de linfocitos T como interleuquina 2 y 12 (IL-2 e IL-12) (Banchereau y Steinman, 1998). Durante su

maduración las DCs pierden moléculas de adhesión y disminuyen su función fagocítica, mientras que aumentan la expresión del receptor de quimioquina CCR7 que les permite migrar al linfonodo drenante y/o al bazo en respuesta a las quimioquinas CCL19 y CCL21 (Sallusto y col, 1998). En este estado las DCs son capaces de activar eficientemente a linfocitos T vírgenes para generar una respuesta efectora contra los antígenos presentados.

Las DCs procesan y presentan antígenos intracelulares y extracelulares a linfocitos T en el contexto de las moléculas MHC-I y MHC-II respectivamente. Los antígenos generados intracelularmente son degradados en el proteasoma de las DCs. Los péptidos antigénicos resultantes son transportados al interior del retículo endoplásmico por la proteína TAP (transportador asociado con el procesamiento de antígenos) donde se unen a moléculas de MHC-I recién sintetizadas (York y Rock, 1996). El complejo péptido/MHC-I es transportado a la superficie celular y presentado a linfocitos T citotóxicos o CD8<sup>+</sup> que expresan en su superficie un receptor clonogénico específico para ese péptido (Paglia y col, 1996). Los antígenos captados desde el medio extracelular en cambio, son internalizados por receptores específicos de superficie de las DCs e ingresados por la vía endocítica a un compartimiento llamado fagosoma, el cual se fusiona con el lisosoma formando el fagolisosoma. En este compartimiento los antígenos extracelulares son degradados por diferentes proteasas, en especial por las catepsinas S y L (Villadangos y col, 1999; Lennon-Duménil y col, 2002). Por otra parte, las moléculas MHC-II recién sintetizadas en el retículo endoplásmico son transportados al fagolisosoma en donde se forma el complejo péptido/MHC-II que es transportado a la superficie celular y presentado a linfocitos T colaboradores o CD4<sup>+</sup> (Bénaroch y col, 1995). Se ha descrito además, un tercer mecanismo de presentación antigénica exclusivo de células dendríticas llamado

presentación cruzada, en el cual los antígenos extracelulares son procesados y presentados en moléculas de MHC-I a linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Este mecanismo está implicado en la inmunidad contra la mayoría de los tumores y contra virus que no son capaces de infectar a las APCs (Heath y Carbone, 2001).

Otra de las propiedades importantes de las DCs es su capacidad para mantener la tolerancia central hacia antígenos propios descrita por primera vez en estudios relacionados con la tolerancia hacia péptidos propios generada durante el proceso de selección tímica (Matzinger y Guerder, 1989). Las DC en el timo presentan características de células inmaduras, con baja expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras y están involucradas en la eliminación de linfocitos T autorreactivos (Steinman y col, 1997). Esta observación llevó a establecer que, dependiendo del estado de maduración, las DCs pueden promover o suprimir la respuesta inmune de los linfocitos T. Cuando las DCs captan antígenos y los presentan en moléculas MHC a LT en un contexto inflamatorio, caracterizado por una alta expresión de moléculas coestimuladoras tales como CD40, CD80 y CD86, y en presencia de citoquinas activadoras como IL-2 e IL-12, se induce el proceso inmunoestimulador (Koch y col, 1996). Por el contrario, la función tolerogénica se genera cuando las DCs capturan y procesan antígenos en ausencia de señales coestimuladoras y los presentan a linfocitos T. En este proceso se genera anergia o apoptosis de los linfocitos T antígeno-específicos (Morelli y col, 2001) o bien se induce la formación de linfocitos T reguladores (Tregs) capaces de suprimir la respuesta efectora de linfocitos T (Kubo y col, 2004). Los LTregs mejor estudiados expresan constitutivamente en su superficie CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2), CD62L (L-selectina), y el factor de transcripción Foxp3, un gen clave en el desarrollo y función de estas células (Sakaguchi, 2003).

La propiedad tolerogénica de las DCs inmaduras ha llevado a numerosos investigadores a tratar de desarrollar sistemas que permitan regular la respuesta inmune, usando estas células en estrategias de intervención inmunológica que apuntan a la inducción de tolerancia antígeno-específica. El uso de células dendríticas tolerogénicas ha tenido grandes avances experimentales en el área de trasplantes, logrando disminuir la aloreactividad o promoviendo la tolerancia hacia el órgano trasplantado (Morelli y Thomson, 2003) y representa una terapia alternativa para disminuir o evitar el uso de drogas inmunosupresoras que suelen producir efectos adversos en el paciente (Cobbold y col, 2003).

En trasplantes, el principal mecanismo que provoca el rechazo al injerto es la fuerte respuesta inmune generada por los linfocitos T del receptor contra los complejos péptido/MHC proveniente de APCs del donante (presentación directa) y contra péptidos derivados del MHC del donante presentados en el MHC del receptor (presentación indirecta) (Lechler y col, 2003).

Se han estudiado diversos agentes farmacológicos como corticosteroides, aspirina y vitamina D<sub>3</sub> con la finalidad de inhibir la diferenciación y maduración de las células dendríticas (Xing y col, 2002). El metabolito activo de la vitamina D<sub>3</sub> (1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>) es una hormona esteroideal que regula el metabolismo del calcio y fósforo y tiene un efecto inmunomodulatorio en APCs y linfocitos T (Deluca y Cantorna, 2001). Las DCs expresan constitutivamente un heterodímero formado por el receptor para la vitamina D<sub>3</sub> (VDR) y el receptor X retinoideo (RXR). La unión de la vitamina D<sub>3</sub> a este receptor reduce la actividad del factor de transcripción NF $\kappa$ B, principal regulador de la transcripción de genes relacionados con inmunidad y repuestas inflamatorias (Cohen-Lahav y col, 2006). Por otra parte, la vitamina D<sub>3</sub> inhibe la síntesis de IL-12,

citoquina activadora de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, mientras que aumenta la secreción de IL-10, citoquina inhibitoria de respuestas inflamatorias de tipo Th1 (van Etten y Mathieu, 2005), además de detener la diferenciación, maduración y activación de las DCs (Penna y Adorini, 2000).

La inducción de tolerancia antígeno-específica es uno de los mayores desafíos de la inmunología de trasplantes. Para lograr este objetivo es necesario administrar antígenos en un contexto no inmunogénico a las células dendríticas de forma tal de mantener el estado inmaduro de éstas y sus propiedades tolerogénicas. Actualmente se han usado cuerpos apoptóticos para inducir tolerancia en un modelo de trasplante heterotópico de corazón en ratones (Wang y col, 2006) debido a que la incorporación de las células apoptóticas por parte de las DCs no induce inflamación (Cvetanovic y col, 2006; Morelli, 2006). Sin embargo, existe evidencia que bajo ciertas condiciones, la incorporación de cuerpos apoptóticos puede inducir eficientemente la maduración de las DC e inducir la activación de linfocitos T citotóxicos (Albert y col, 1998). Otro vehículo usado actualmente para inducir tolerancia a trasplantes heterotópicos de corazón en ratas son los exosomas derivados de células dendríticas inmaduras (Pesche y cols, 2003). Los exosomas son pequeñas vesículas de no más de 100 nm secretadas por un amplio rango de tipos celulares. Los exosomas derivados de células dendríticas contienen en su superficie moléculas de MHC-II junto con moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86 (Théry y col, 2001). Pêche y col. demostraron que bajo ciertas condiciones los exosomas alogénicos pueden regular la respuesta inmune aumentando la sobrevivencia de trasplantes de corazón heterotópicos en ratas. Sin embargo, en este mismo trabajo los autores mostraron que un exceso de exosomas alogénicos puede generar una respuesta inmune provocando el rechazo al

injerto. Además, su pequeño tamaño y su bajo rendimiento de purificación hacen difícil su manipulación y cuantificación para ser usados en terapia contra trasplantes.

En esta tesis se propuso desarrollar un sistema para administrar a DCs antígenos alogénicos de manera no inmunogénica mediante la incorporación de membranas celulares, ya que éstas no inducirían la activación de las células dendríticas. En estudios de la biogénesis de los compartimientos endosomales en macrófagos se diseñó un método para purificar fagosomas usando esferas de látex de baja densidad (Desjardins y col, 1994). Considerando que en los compartimientos endosomales de las DCs es el lugar donde se reclutan las moléculas MHC-II nos propusimos purificar fagosomas a partir de células dendríticas, con el fin de utilizarlos como fuente de moléculas MHC alogénicas. Nuestra hipótesis es que la fagocitosis de fagosomas alogénicos por DCs inmaduras evitaría la activación de las células dendríticas.

El objetivo del presente trabajo es generar las condiciones experimentales que nos permitan producir células dendríticas inmaduras capaces de presentar aloantígenos de manera no inmunogénica a linfocitos T. Para esto, primero generamos DCs inmaduras de haplotipo H-2<sup>b</sup> mediante tratamiento de precursores de médula ósea con vitamina D<sub>3</sub> in vitro. Luego demostramos que estas células procesan y presentan antígenos derivados de los fagosomas alogénicos H-2<sup>d</sup>. Este protocolo permitió detener la maduración de DCs de médula ósea las que fueron usadas para generar a partir de linfocitos T vírgenes, una población de linfocitos T con fenotipo de células reguladoras.

## **HIPÓTESIS**

La incorporación de antígenos por parte de células dendríticas inmaduras en la forma de fagosomas alogénicos, generaría células dendríticas en un estado tolerogénico.

### **OBJETIVO GENERAL**

Generar células dendríticas inmaduras capaces de incorporar antígenos y presentarlos en un contexto no inflamatorio a linfocitos T.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Generar células dendríticas inmaduras a partir de precursores de médula ósea mediante la diferenciación con GM-CSF en presencia de vitamina D<sub>3</sub>.
- Determinar la expresión de los marcadores de maduración de DCs: MHC-II y CD86 y estudiar el patrón de secreción de las citoquinas IL-2, IL-10 e IL-12.
- Obtener fagosomas alogénicos derivados de células dendríticas de médula ósea y analizar en éstos la presencia de MHC-II.
- Analizar la incorporación de fagosomas alogénicos por parte de DCs inmaduras.
- Analizar el estado de maduración y el patrón de secreción de las citoquinas IL-2, IL-10 e IL-12 en DCs inmaduras cargadas con fagosomas alogénicos.
- Evaluar la presentación de péptidos derivados de fagosomas a linfocitos T vírgenes determinando la generación y proliferación de linfocitos T reguladores.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Ratones

Se usaron ratones C57BL/6 y BALB/c de entre 2 y 3 meses de edad, los cuales poseen un background genético H-2<sup>b</sup> y H-2<sup>d</sup> respectivamente. Ambas cepas se adquirieron de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EE.UU.). Se usaron además ratones OT-II para los ensayos de presentación antigénica (proporcionados por el Dr. Alexis Kalergis, Pontificia Universidad Católica de Chile). Estos ratones poseen un background genético H-2<sup>b</sup> y sus linfocitos T reconocen el péptido 323-339 de la ovalbúmina de pollo (OVA<sup>323-339</sup>) presentado en un contexto MHC-II I-A<sup>b</sup> (Barnden y col, 1998). Todas las cepas usadas en este trabajo fueron mantenidas en un vivero convencional.

### 2.2 Anticuerpos y reactivos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales comerciales:

Conjugados a FITC: anti-I-A/I-E clon 2G9, anti-CD25 clon 7D4, anti-CD69 clon H1.2F3, anti-CD86 clonGL1. Conjugados a PE: anti-CD11c clon N418, anti-CD62L clon MEL-14. Conjugados a PerCP: anti-CD4 clon RM4-5. Conjugados a CyChrome: anti-CD44 clon IM7. Anticuerpos purificados: anti-I-A/I-E clon 2G9, anti-rat-IgG clon MARG2A-1. Todos estos anticuerpos fueron adquiridos de Pharmingen (BD Pharmingen, EE.UU.)

Se utilizó además el anticuerpo policlonal goat-anti-mouse HRP (Dako, CA., EE.UU.).

El péptido OVA<sup>323-339</sup> (H2N-ISQAVHAAHAEINEAGR-OH) fue sintetizado en New



England Peptide, Inc. (Boston, EE.UU.). La vitamina D<sub>3</sub> (1 $\alpha$ ,25- Dihydroxivitamin D<sub>3</sub>), las perlas de látex (Latex beads, deep blue dyed, 0.85  $\mu$ m) y lipopolisacárido (LPS) fueron adquiridas en Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.).

Además se usaron los siguientes reactivos: 2-Mercaptoetanol, tampón de reacción TRIS-HCl, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, DNA polimerasa e imidazol (todos de Invitrogen, Brasil); MACS anti-CD4 (clon L3T4) (Miltenyi Biotec, Alemania); cloroformo, isopropanol y etanol 75% (todos de Merk, Darmstadt, Alemania); DMPC, APS, Tween 20, sacarosa 99.5% y BSA fracción V (Sigma, St. Louis, EE.UU.); agarosa 0.8%, agarosa 2% y bromuro de etidio (W&Z Winkler, Stgo, Chile); DNAsa libre de RNAsa (Boehringer, Mannheim, Alemania); tampón de reacción y RNasin, M-MLV RT (Promega, Madison, WI, EE.UU.); TMB reagent (BD Pharmingen, EE.UU.); inhibidores de proteasas: aprotinina, leupeptina y pepstatina (Sigma, St. Louis, EE.UU.); TEMED y SDS (Bio-Rad, EE.UU.); Trizol, DTT y tripsina (Gibco BRL, EE.UU.).

### **2.3 Generación de células dendríticas de médula ósea**

Las DCs se generaron a partir de células precursoras de médula ósea de ratones C57BL/6 extraídas de tibias y fémures. Los huesos se lavaron con etanol 75% por 1 min y se perfundieron con medio RPMI suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100  $\mu$ g/ml. Se lisaron los glóbulos rojos por incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente en una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl 0.15 M, KHCO<sub>3</sub> 10 mM y Na<sub>2</sub>EDTA 0.1 mM, pH 7.2-7.4) luego de lo cual se lavaron con medio RPMI. Posteriormente las células se cultivaron

en placas de Petri bacteriológicas (140mm, Sterilin, Barloworld Scientific, U.K.) a una densidad de  $10^7$  células totales en 20 ml de medio RPMI + 10% FCS + 50 $\mu$ M 2-Mercaptoetanol + 50  $\mu$ g/mL gentamicina + 3%vol/vol del sobrenadante de la línea celular J558L secretora de GM-CSF murino (proporcionada por la Dra. A.M. Lennon-Duménil, Institut Curie, Paris, Francia).

Las células se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y a los días 4 y 8 de cultivo se replaquearon con medio fresco completo, después de tripsinizar durante 6 minutos a 37°C para recuperar las células adherentes. A los días 2, 4, 6 y 8 se agregó vitamina D<sub>3</sub> a una concentración final de 1 nM. Después de 12 días de cultivo se recuperaron separadamente las células adherentes y no adherentes y se analizaron las características fenotípicas por citometría de flujo y funcionales mediante evaluación de la secreción de citoquinas.

#### **2.4 Activación de las células dendríticas**

Luego de 12 días de cultivo, las DCs adherentes tratadas en presencia o ausencia de vitamina D<sub>3</sub>, se activaron con LPS a una concentración final de 100 ng/ml en placas de 24 pocillos y a una densidad celular de  $4 \times 10^6$  cel/ml en medio RPMI + 10% FCS + gentamicina + 2-ME. Luego de 4 horas de incubación a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, se recuperó el medio con células, se centrifugó a 2400 rpm por 5 minutos y se colectaron los sobrenadantes en tubos Eppendorf para analizar la secreción de IL-2, IL-10 e IL-12p70 mediante ELISA de captura.

## **2.5 Caracterización fenotípica de células dendríticas**

Las células dendríticas se resuspendieron en medio DMEM + 2% FCS en tubos Eppendorf y se incubaron por 20 minutos a 4°C en oscuridad con las diferentes combinaciones de anticuerpos conjugados directamente con el fluoróforo. Luego las células se lavaron con DMEM + 10% FCS y resuspendieron en PBS + 2% FCS a una densidad de  $10^6$  cel/ml para ser analizadas por citometría de flujo (Pino, 2005). Se evaluó la expresión del marcador de superficie específico de células dendríticas CD11c y marcadores de maduración tales como moléculas de MHC-II y la molécula co-estimuladora CD86. Se utilizó un citómetro FACScan (BD Biosciences, Mountain View, CA). Los análisis se realizaron utilizando el software WinMDI 2.8.

## **2.6 Preparación de fagosomas alogénicos**

Los fagosomas se prepararon a partir de DCs provenientes de precursores de médula ósea de ratones BALB/c preparadas como se describió anteriormente, a excepción de la utilización de 30% vol/vol del sobrenadante de la línea celular J558L. Luego de 12 días de cultivo,  $50 \times 10^6$  DCs adherentes y no adherentes se incubaron durante 1 hora a 37°C junto con  $500 \times 10^6$  perlas de látex de 0.85  $\mu$ m de diámetro. Esto se hizo incubando las células y las perlas durante los primeros 20 min en 500  $\mu$ l de RPMI, para en seguida continuar la incubación agregando 4 ml de RPMI + 10% FCS. Se detuvo la fagocitosis lavando 5 veces con 40 ml de PBS frío y finalmente resuspendiendo las células en 500  $\mu$ l de solución de sacarosa 8%, 3 mM de imidazol,

DTT 1 mM, inhibidores de proteasas 1x (aprotinina, leupeptina y pepstatina), en PBS. Se lisaron las células mecánicamente por jeringueo con aguja 21G en un tubo Eppendorf hasta que la viabilidad disminuyó a un 70 % del inicial. El lisado celular se centrifugó a 1000 rpm por 4 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Luego el sobrenadante se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 1 hora en una gradiente discontinua de sacarosa-3 mM de imidazol (65%-45%-35%-25%-8%) y se recuperaron en un tubo Eppendorf los fagosomas de la interfase 25%-8%. Se observó su integridad y tamaño por microscopía electrónica fijándolos con 8% de paraformaldehído y 2% de glutaraldehído. Para la inducción de linfocitos T reguladores se conjugaron los fagosomas con OVA, para lo cual las perlas de látex se incubaron por 12 horas con agitación rotatoria a 4°C, con 5 mg/ml de concentración final de proteína OVA.

## **2.7 Medición de MHC-II en los fagosomas**

La presencia de MHC-II en los fagosomas se determinó mediante Western Blot en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE). Se cargaron 10 µg de proteína total de fagosomas mezclados con una solución tampón de carga y se calentaron a 100°C por 10 min. Como control positivo de la presencia de MHC-II se usó un lisado de esplenocitos de un ratón BALB/c depletados de glóbulos rojos y como control negativo, un lisado de células B16, las cuales carecen de las moléculas MHC-II.

Se usó como reactivo primario un anticuerpo rat-anti mouse IA/IE, como anticuerpo secundario un mouse-anti-rat y como anticuerpo de detección un goat-anti-mouse HRP. Se hicieron los controles correspondientes con los diferentes anticuerpos

usados. Para la estimación del peso molecular de las proteínas se ocupó el estándar BenchMark Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen, Brasil) Las membranas de nitrocelulosa fueron reveladas en la oscuridad utilizando el kit ECL plus (Amersham Biosciences AB, UK) según las instrucciones del fabricante.

## **2.8 Incorporación de fagosomas por las células dendríticas**

Se determinó la incorporación de fagosomas alogénicos por las DCs mediante citometría de flujo y por microscopía de fluorescencia. Los fagosomas se incubaron previamente con el fluoróforo DiIC<sup>18</sup> a una concentración final de 100  $\mu$ M, durante 20 minutos a 37°C con agitación rotatoria. La reacción se detuvo agregando un volumen equivalente de FCS, se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C y luego se lavó con PBS frío. Los fagosomas marcados se agregaron a un cultivo de DCs generadas en presencia de vitamina D<sub>3</sub> y se incubaron por 24 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. La incorporación de fagosomas se evaluó por citometría de flujo. Se determinó además la secreción de IL-2, IL-10 e IL-12 a las 4 horas de cultivo por ELISA de captura. Como control negativo se midió la incorporación de fagosomas por DCs luego de 24 horas a 4°C. Para el análisis de la incorporación de fagosomas por microscopía de fluorescencia, se fijaron sobre un portaobjetos 50x10<sup>3</sup> células dendríticas cargadas por 24 horas con fagosomas marcados con DiIC<sup>18</sup>.

## 2.9 ELISA

La detección de IL-2, IL-10 e IL-12p70 secretadas por las DCs sometidas a los diferentes tratamientos, se realizó mediante ELISA de captura usando el kit BD OptEIA mouse ELISA set (BD Biosciences). El ensayo se realizó en placas de 96 pozos Immuno-plate Maxisorp (Nunc, EE.UU.) a las cuales se agregó 100  $\mu$ l por pozo de una dilución del anticuerpo de captura (1:250 para IL-2 y 1:125 para IL-10 e IL-12p70) en "coating buffer" ( $\text{NaHCO}_3$  0.33 M,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.66 M, pH 9.5) y se incubaron a 4°C toda la noche. Posteriormente la placa se lavó 3 veces con una solución de PBS + 0.1% Tween 20 (solución de lavado en adelante), se agregaron 420  $\mu$ l por pozo de una solución de bloqueo (PBS + 10% FCS) y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con la solución de lavado y se agregó a diferentes pozos 100  $\mu$ l de una dilución estándar de citoquina recombinante o los sobrenadantes de DCs activadas en las diferentes condiciones. Para la detección de IL-10 e IL-12p70, los sobrenadantes se diluyeron en PBS + 10% FCS a razón 1:2. Las muestras se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, las placas se lavaron 5 veces con la solución de lavado y luego se incubó con 100  $\mu$ l del anticuerpo de detección biotinilado (1:250 para IL-2, IL-10 e IL-12p70) más avidina peroxidasa 1:250. Al cabo de 1 hora la placa se lavó 7 veces con solución de lavado y se agregaron 100  $\mu$ l de la solución de revelado TMB Substrate reagent Set (BD Pharmingen, EE.UU.). Luego de 20 minutos de incubación, la reacción se detuvo agregando 50  $\mu$ l de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1 M. La coloración del ensayo se cuantificó a 450 nm en un espectrofotómetro Emax Precision Microplate Reader (Molecular Devices, EE.UU.).

## **2.10 Preparación de linfocitos T vírgenes**

Los linfocitos T vírgenes se obtuvieron de bazo de ratones OT-II aislando las células CD4<sup>+</sup>. Para esto, los esplenocitos se obtuvieron perfundiendo el bazo con 5 ml de RPMI + 10% FCS. Los glóbulos rojos se lisaron con 2 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron y se incubaron por 15 minutos a 4°C con agitación rotatoria, con 900 µl de tampón MACS + 100 µl de perlas inmunomagnéticas anti-CD4 (Miltenyi Biotec, Alemania) por cada 100 x 10<sup>6</sup> células. Una vez finalizada la incubación, las células se lavaron y se resuspendieron con 1 ml de tampón MACS para luego purificarlas utilizando un magneto (VarioMACS) y columnas de selección positiva (columnas LS, Miltenyi Biotec, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Más del 90% de las células purificadas corresponden a una fracción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> con un fenotipo virgen, determinado por citometría de flujo.

## **2.11 Determinación de la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediante tinción con CFSE**

La proliferación celular se evaluó por citometría de flujo mediante dilución del colorante CFSE el cual se reparte equitativamente entre células hijas en cada ciclo de división celular, mientras que las células que no se dividen mantienen la fluorescencia inicial. De este modo pueden distinguirse picos sucesivos de marcaje con CFSE que representan los ciclos de división celular. Se purificaron los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de bazo

de ratones OT-II mediante separación inmunomagnética como se describió anteriormente. Los LT se marcaron con 5  $\mu$ M de CFSE por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se eliminó el exceso de colorante depositando las células sobre un volumen equivalente de FCS y centrifugando a 400 x g durante 7 minutos. Los LT marcados se cocultivaron con células dendríticas inmaduras por 4 días a 37°C a razón de 2:1 (LT:DC). Para inducir la proliferación de los LT CD4<sup>+</sup> OT-II, se agregó al cocultivo 50  $\mu$ g/ml de la proteína OVA; 6  $\mu$ g/ml del péptido OVA<sup>323-339</sup> (controles positivos); o fagosomas-OVA a una densidad de 10 fagosomas por cada célula dendrítica en el cocultivo. Luego de 4 días de cocultivo, se recuperaron las células y se analizó la dilución del colorante CFSE en los linfocitos T mediante citometría de flujo.

## **2.12 Inducción de linfocitos T reguladores**

Las células dendríticas tratadas con Vitamina D<sub>3</sub> y cargadas con fagosomas-OVA (4 x 10<sup>5</sup> cel/pozo) se cocultivaron por 4 días con LT vírgenes OT-II (2 x 10<sup>6</sup> cel/pozo) a una razón de 1:5 en medio IMDM + 10% FCS + 50  $\mu$ g/ml de gentamicina + 50  $\mu$ M de 2-ME + 0.5  $\mu$ g/ml de anfotericina-B. Las células se colectaron a los días 1 y 5 para analizar por citometría de flujo la expresión de los marcadores CD25, CD62L, CD44 y CD69. El mRNA del factor de transcripción Foxp3 se analizó por RT-PCR.



### 2.13 RT-PCR para la detección del factor de transcripción Foxp3

Se extrajo RNA total a partir de  $4 \times 10^6$  linfocitos T obtenidos al cuarto día de cultivo con DCs tratadas con Vitamina D<sub>3</sub>. Para esto se hizo una extracción con Trizol por 5 min, seguido de una extracción con cloroformo por otros 5 min. El RNA se precipitó con isopropanol por 72 horas a -20°C, luego se lavó con 1 ml de etanol 75%, se secó al aire, se resuspendió en H<sub>2</sub>O-DMPC y se incubó por 10 min a 60°C. La integridad del RNA se determinó en un gel de agarosa al 0.8% y se cuantificó determinando la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro 6405 UV/vis (Jenway Limited, Inglaterra). Previo a la RT-PCR, se digirieron 5 µg de RNA con 0.5 µl de DNasa-I libre de RNasa (1U/µl) en un volumen final de 25 µl con 1 µl de tampón de reacción (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) y 1 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM por 30 min a 37°C.

El cDNA se sintetizó a partir de 2 µg de RNA total, utilizando 500 ng de oligo (dT), 2 U buffer MMLV-RT y 15 U RNAsin, 0.5 mM dNTP por 1 h a 42°C. La amplificación del gen de Foxp3 se realizó mediante el siguiente protocolo: 2,5 min a 94°C, seguido de 31 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 57°C y 30 s a 72°C. Finalmente se terminó la reacción con un ciclo de 10 min a 72°C. Los primers usados para la detección de Foxp3 fueron los publicados por Hori y col. (Hori y col, 2003):

Sentido: 5'-CAG CTG CCT ACA GTG CCC CTA G-3'

Antisentido: 5'-CAT TTG CCA GCA GTG GGT AG-3'

Como control de carga se utilizó el gen de  $\beta$ -actina. El protocolo de la PCR fue el siguiente: 5 min a 94°C seguido de 18 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 58°C y 90 s a 72°C. Se finaliza la reacción con un ciclo de 10 min a 72°C. Los primers utilizados fueron los siguientes:

Sentido: 5'-AAA TCG TGC GTG ACA TTA AGG-3'

Antisentido: 5'-CCGATCCACACGGAGTACTT-3'

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa 1,2% con un transiluminador de luz ultravioleta. Los geles se fotografiaron utilizando una cámara digital Kodak (DC 120 Digital Camera, Gibco BRL, EE.UU.).

## **2.14 Análisis estadístico**

Los datos en los gráficos de barras son presentados como la media  $\pm$  la desviación estándar. Para el análisis estadístico y el diseño de los gráficos se usó el programa GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc. EE.UU.) utilizando el test de ANOVA en un sentido con test de comparación múltiple de Tukey.

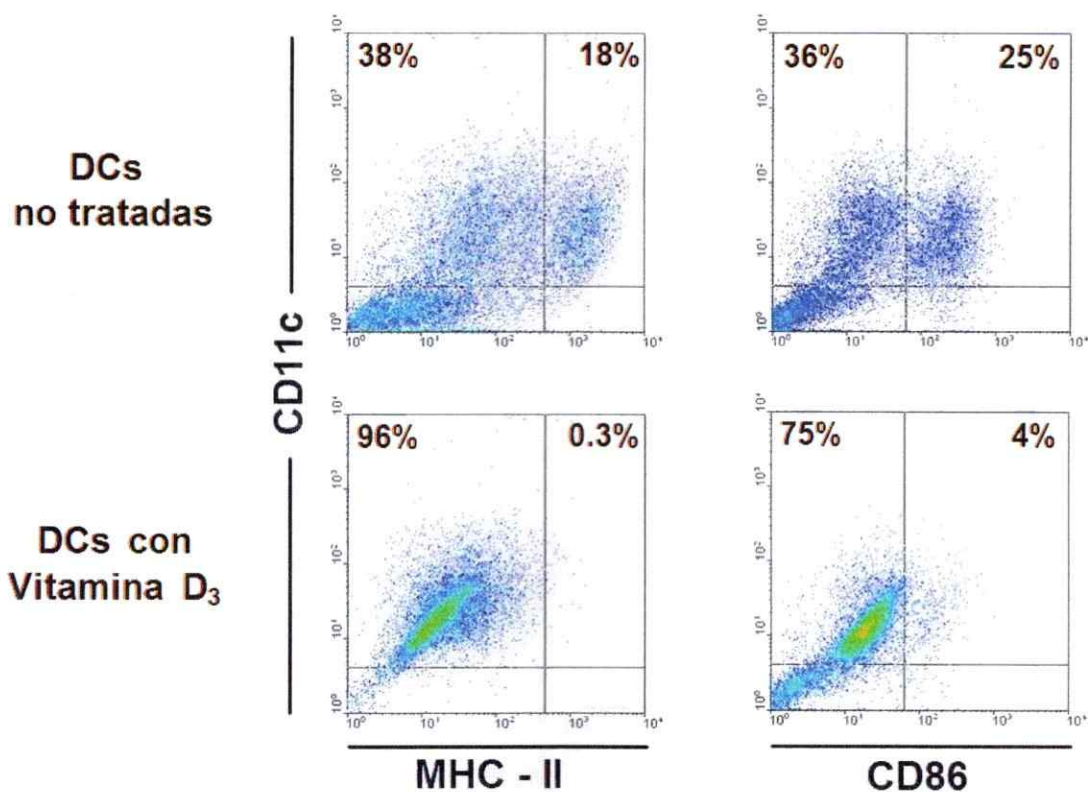
### 3. RESULTADOS

#### 3.1 La vitamina D<sub>3</sub> detiene la maduración de células dendríticas de médula ósea y les confiere un fenotipo tolerogénico

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que células dendríticas (DCs) cultivadas por 12 días en presencia de GM-CSF proveniente del sobrenadante de la línea celular J558L, genera una población de DC adherentes y otra en suspensión. Estas poblaciones celulares presentan diferencias en cuanto al fenotipo y a las citoquinas que secretan luego de ser activadas con diferentes estímulos (Pino 2005).

Para determinar el efecto de la vitamina D<sub>3</sub> (VD3) sobre las células dendríticas, agregamos VD3 1 nM durante la diferenciación de precursores de médula ósea a DCs de un ratón de haplotipo H-2<sup>b</sup>. Luego de 12 días de cultivo en estas condiciones se obtuvo una población celular homogénea compuesta principalmente de células adherentes con altos niveles de expresión del marcador de superficie de células dendríticas CD11c analizadas por citometría de flujo. En la figura 1 se muestra la comparación de la expresión de las moléculas MHC-II y CD86 en DCs cultivadas en ausencia de VD3 (sin tratamiento) versus DCs cultivadas en presencia de VD3, considerando células adherentes y no adherentes. Los resultados indican que la inclusión de VD3 detiene el proceso de maduración de las DCs manteniendo una baja expresión de la molécula coestimuladora CD86 (4%) y de MHC-II (0.3%) en la superficie, comparadas con las DCs sin tratamiento, las cuales muestran una expresión de un 25% para CD86 y un 18% para MHC-II. Al activar las DCs cultivadas en presencia o ausencia de VD3 con LPS durante 4 horas no se observan cambios en la

expresión de estos marcadores de maduración, conservándose el fenotipo mostrado en la figura 1.



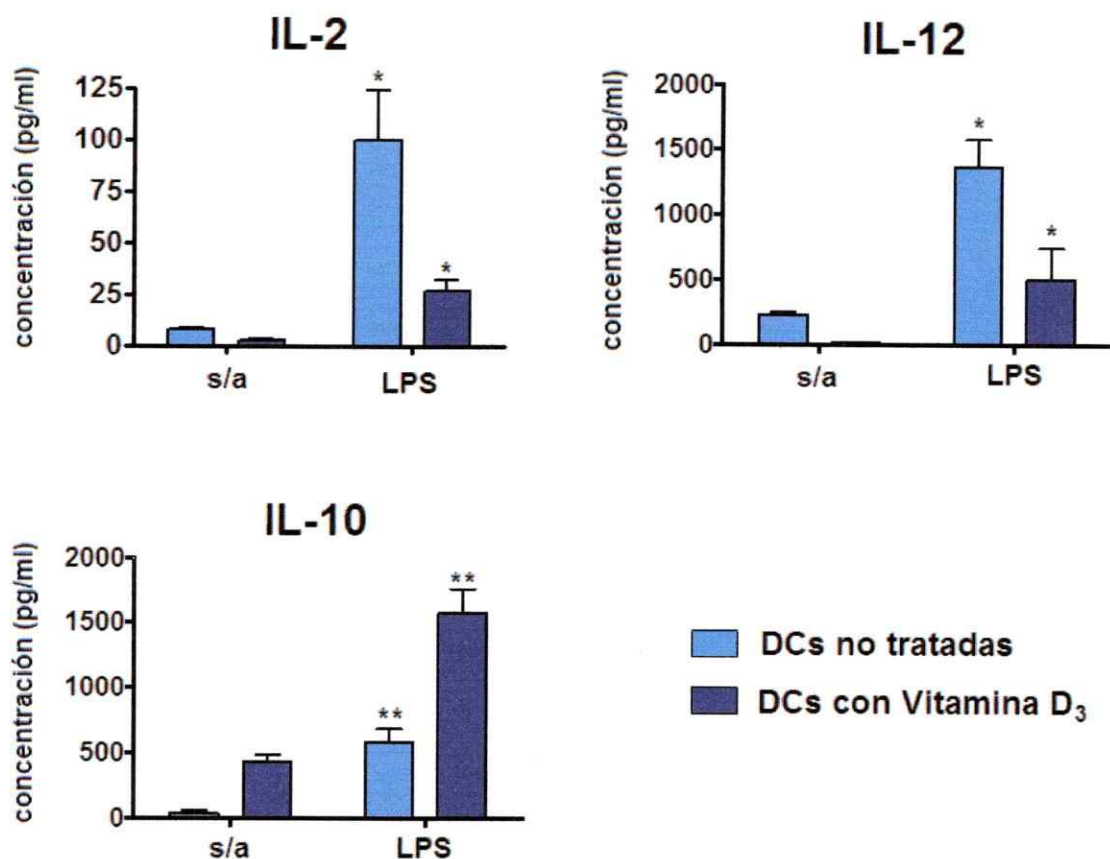
**Figura 1: Las células dendríticas cultivadas en presencia de Vitamina D<sub>3</sub> presentan un fenotipo inmaduro.** Se obtuvieron células dendríticas a partir de precursores de médula ósea en presencia de GM-CSF (DCs no tratadas) o en presencia de GM-CSF más vitamina D<sub>3</sub>. Luego de 12 días de cultivo se determinó la expresión en la superficie de CD11c, MHC-II y CD86 mediante citometría de flujo. Experimento representativo de 3 experimentos independientes.

### **3.2 Vitamina D<sub>3</sub> induce un patrón de secreción de citoquinas inhibitorio en células dendríticas activadas**

En nuestro laboratorio hemos demostrado que las DCs no secretan cantidades detectables de citoquinas como IL-2, IL-10 e IL-12 en ausencia de estímulos (Pino 2005). Una vez que las DCs son activadas por bacterias como *E. coli*, *B. cereus* o derivados bacterianos como LPS o LTA, éstas secretan altos niveles de citoquinas proinflamatorias y activadoras del sistema inmune.

Sin embargo, cuando las DCs son cultivadas en presencia de VD3 y activadas con LPS durante 4 horas, se mantienen bajos los niveles de secreción de las citoquinas activadoras IL-2 e IL-12, mientras que aumenta la secreción de la citoquina inhibitoria IL-10, comparadas con las DCs generadas en ausencia de VD3 (Figura 2). Resultados similares se obtuvieron al activar las DCs durante 4 horas con LTA y midiendo secreción de IL-2, IL-10 e IL-12 mediante ELISA de captura (datos no mostrados).

Estos resultados sugieren que la VD3 genera células dendríticas inmaduras resistentes a la maduración y con capacidad de secretar un patrón de citoquinas inhibitorio luego de ser activadas con un inductor.



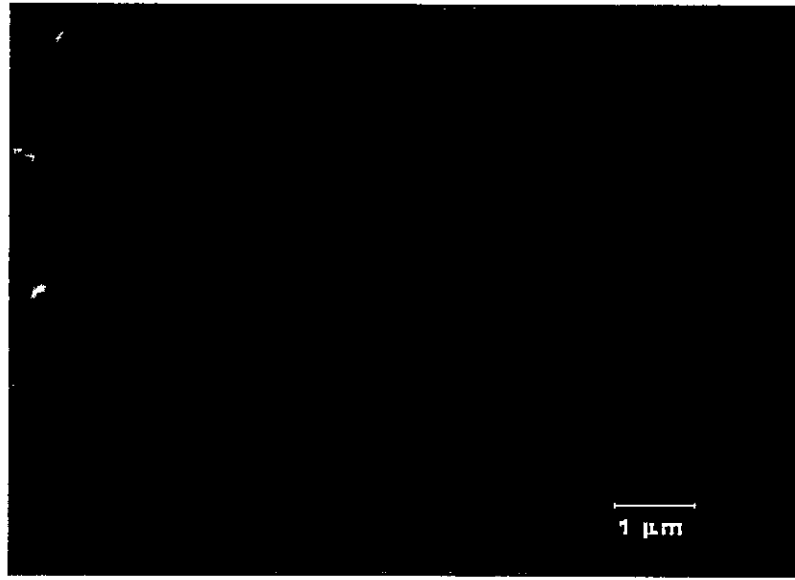
**Figura 2: Células dendríticas cultivadas en presencia de Vitamina D<sub>3</sub> presentan un patrón de secreción de citoquinas inhibitorio.** Células dendríticas obtenidas en presencia o ausencia de vitamina D<sub>3</sub> se incubaron durante 4 horas en presencia o ausencia de LPS y se midió la secreción de las interleuquinas 2, 10 y 12 (IL-2, IL-10 e IL-12) mediante ELISA de captura. Las barras corresponden a la desviación estándar de 3 experimentos independientes. (s/a = sin activar con LPS). \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$ .

### 3.3 Los fagosomas purificados presentan cantidades detectables de MHC-II

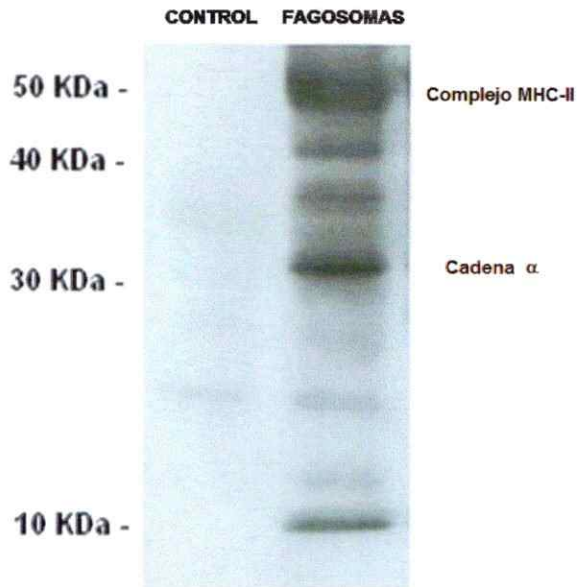
La producción de fagosomas H-2<sup>d</sup>, se hizo a partir de DCs de haplotipo H-2<sup>d</sup> luego de 12 días de cultivo las cuales fueron incubadas por 1 hora con esferas de látex de 0.85  $\mu\text{m}$  de diámetro. Más del 90% de las DCs fagocitan estas esferas de látex y mantienen una viabilidad de aproximadamente 90%. Luego de purificar los fagosomas según lo descrito en métodos, se fijaron en una solución de paraformaldehído y glutaraldehído. Mediante microscopía electrónica fue posible observar la membrana que recubre las esferas de látex y el tamaño de los fagosomas (Figura 3). Estos tienen forma esférica y homogénea de un diámetro aproximado de 1  $\mu\text{m}$ , indicando que la esfera de látex está inmediatamente recubierta por la membrana celular.

Para determinar la presencia de MHC-II en la membrana de los fagosomas se realizó un Western blot en condiciones desnaturalantes usando un anticuerpo que marca tanto moléculas MHC-II IA como IE. En la figura 4 se observa una banda sobre los 30 KDa que corresponde a la cadena pesada del MHC-II la cual tiene un peso molecular entre 33 y 35 KDa (Cresswell, 1994). Además observamos una segunda banda intensa cercana a los 50 KDa que corresponde a complejos péptido/MHC-II de alta estabilidad en presencia de SDS (El-Sukkari y col, 2003).





**Figura 3: Los fagosomas purificados de células dendríticas presentan forma regular esférica de 1  $\mu\text{m}$  diámetro. Fotografía de los fagosomas derivados de células dendríticas de médula ósea de ratones BALB/c tomada por microscopía electrónica.**



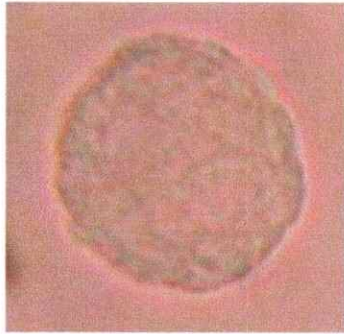
**Figura 4: Los fagosomas contienen MHC-II en su membrana.** Se determinó la presencia de MHC-II en la membrana de los fagosomas mediante Western Blot usando un anticuerpo primario anti I-A/I-E. El control corresponde al marcaje del anticuerpo primario más el anticuerpo terciario anti mouse HRP. La cadena  $\alpha$  del MHC-II tiene un peso molecular de 34 KDa y el complejo MHC-II estable a la desnaturación por SDS, un peso molecular de 48 KDa.

### 3.4 Células dendríticas incorporan eficientemente fagosomas alogénicos

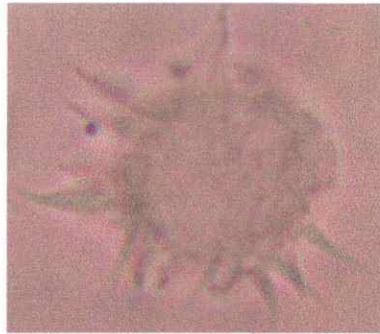
Las células dendríticas inmaduras se caracterizan por tener una alta capacidad fagocítica y baja respuesta inmunogénica. Una vez que la célula dendrítica fagocita un antígeno entra en proceso de maduración cambiando su forma, disminuyendo su capacidad fagocítica y aumentando su función activadora de la respuesta inmune. En la figura 5A se muestra a la izquierda la forma de una célula dendrítica inmadura que fue cultivada en presencia de VD3 y al centro una DC madura que fue cultivada en ausencia de VD3, en la que se observa la aparición de dendritas. A la derecha se observa una célula dendrítica que ha incorporado eficientemente los fagosomas alogénicos manteniendo un fenotipo de célula inmadura.

Para determinar si las células dendríticas incorporan la membrana que recubre los fagosomas, lugar donde se encuentran los antígenos (MHC-II), se marcaron los fagosomas con el fluoróforo DiIC<sup>18</sup> que se une a la parte hidrofóbica de las membranas celulares. Las DCs que se cultivaron con vitamina D<sub>3</sub> se incubaron por 24 horas a 37°C con fagosomas marcados con DiIC<sup>18</sup> y luego se fijaron sobre un porta objetos para ser analizadas al microscopio de fluorescencia. En la figura 5B se puede observar que sólo las células dendríticas que han incorporado fagosomas marcados con DiIC<sup>18</sup> emiten fluorescencia, lo que indica que la membrana de los fagosomas ha sido incorporada por las células dendríticas.

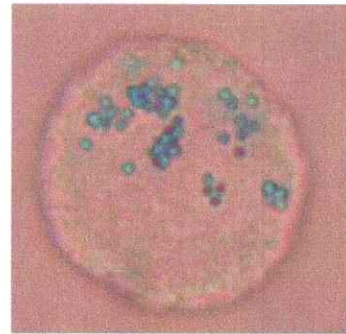
A.



DC Inmadura

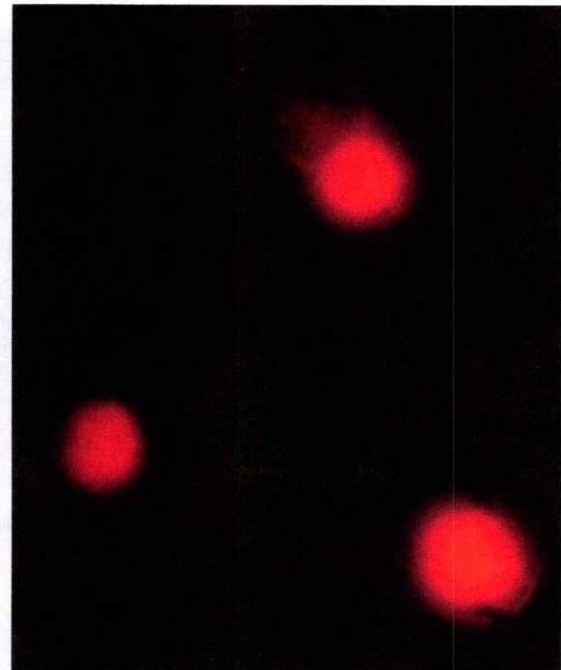


DC Madura



DC + Fagosomas

B.

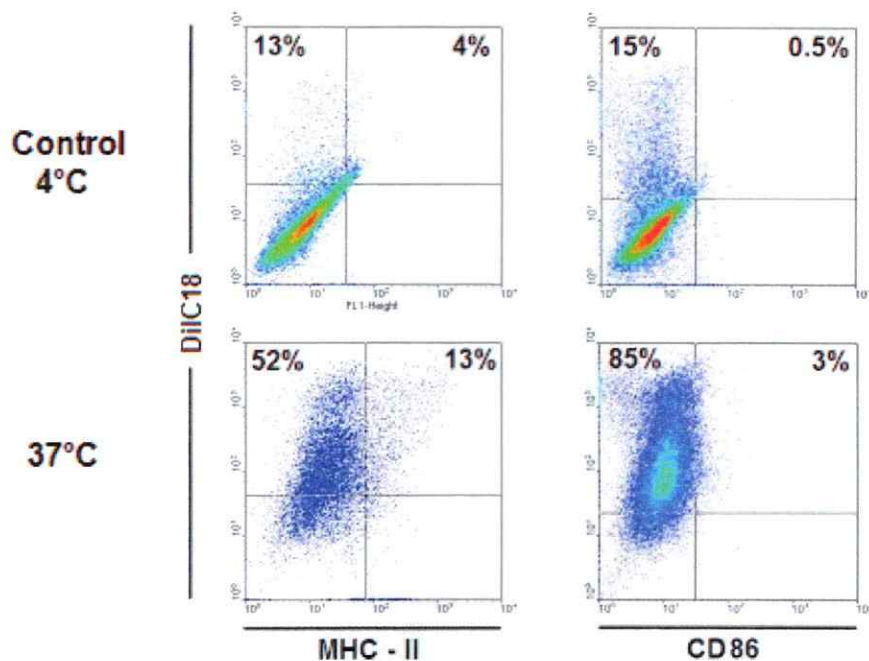


**Figura 5: Células dendríticas inmaduras incorporan eficientemente fagosomas alogénicos.** En A. se muestra a la izquierda la forma de una célula dendrítica inmadura cultivada en presencia de vitamina D<sub>3</sub>; en el centro una célula dendrítica madura cultivada en ausencia de vitamina D<sub>3</sub> y a la derecha una célula dendrítica obtenida en presencia de vitamina D<sub>3</sub> luego de haber incorporado fagosomas alogénicos. En B. se muestra una fotografía tomada por microscopía de fluorescencia con aumento 40X luego de la incorporación de fagosomas alogénicos marcados con DiIC<sup>18</sup>. A la izquierda sin filtro; a la derecha con filtro.

### **3.5 La incorporación de fagosomas alogénicos no induce la maduración de las células dendríticas**

Para comprobar si la incorporación de fagosomas alogénicos induce cambios en el estado de maduración de las DCs, se analizó mediante citometría de flujo la expresión de los marcadores de maduración de DCs (MHC-II y CD86) en la superficie, luego de la incorporación de fagosomas. Las DCs tratadas con vitamina D<sub>3</sub> se cultivaron durante 24 horas a 37°C con fagosomas marcados previamente con el fluoróforo DiIC<sup>18</sup>. Como control, se midió la expresión de estos marcadores en un cultivo de DCs y fagosomas incubados por 24 horas a 4°C. En la figura 6 se muestra el análisis por citometría de flujo de la incorporación de fagosomas marcados con el fluoróforo DiIC<sup>18</sup> en las células dendríticas CD11c<sup>+</sup>. Al mismo tiempo se muestra la expresión de MHC-II y CD86 en las DCs. Observamos que más del 80% de las células dendríticas ha incorporado los fagosomas alogénicos y que esta incorporación no aumenta la expresión de la molécula de coestimulación CD86. Se observa un leve aumento de la expresión de MHC-II en las células dendríticas que han incorporado fagosomas comparado a DCs no tratadas (4% a 13% respectivamente).

Este pequeño aumento en la expresión de MHC-II y la ausencia de CD86 debería ser favorable a nuestros propósitos ya que los antígenos fagocitados por las DCs deben ser presentados en las moléculas de MHC-II en un contexto no inflamatorio a linfocitos T para generar tolerancia hacia el antígeno.



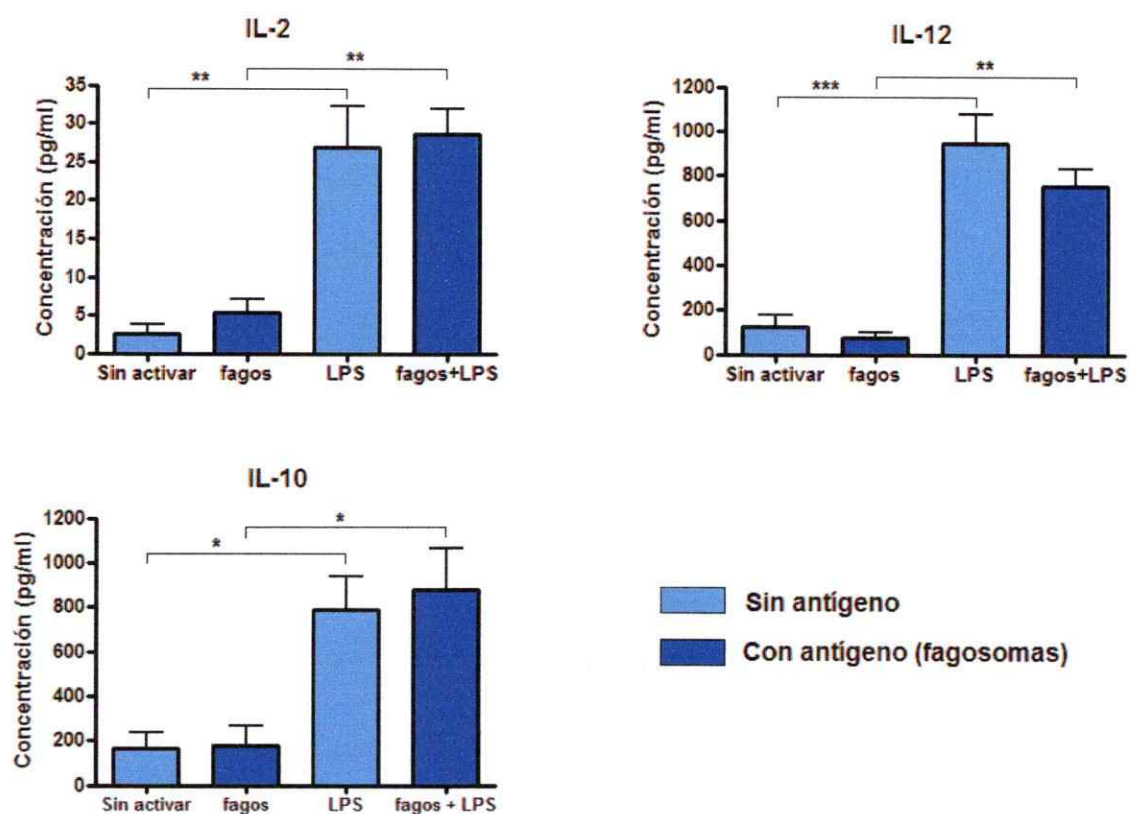
**Figura 6: La incorporación de fagosomas mantiene el fenotipo inmaduro en células dendríticas.** Se cultivaron células dendríticas tratadas con Vitamina D<sub>3</sub> con fagosomas alogénicos marcados con DiIC<sup>18</sup> durante 24 horas a 4°C (control) y a 37°C. Se determinó la expresión de MHC-II, CD86 y la incorporación de fagosomas marcados mediante citometría de flujo en células CD11c positivas. Experimento representativo de 3 experimentos independientes.

### **3.6 La incorporación de fagosomas alogénicos no induce la secreción de citoquinas en las células dendríticas**

Las células dendríticas producen citoquinas en respuesta a diferentes estímulos. Por tanto evaluamos el patrón de secreción de citoquinas inducida por la incorporación de fagosomas.

Para esto se midió en el sobrenadante de DCs inmaduras luego de haber incorporado fagosomas, la secreción de las citoquinas IL-2, IL-10 e IL-12 mediante ELISA de captura. Las DCs tratadas con VD3 fueron incubadas con fagosomas alogénicos durante 4 horas a 37°C, en presencia o ausencia de LPS. La figura 7 muestra que la secreción de IL-2, IL-10 e IL-12 se mantiene a un nivel basal similar al obtenido con DCs inmaduras que no han incorporado fagosomas. La activación de las DCs con LPS aumenta significativamente la secreción de estas tres citoquinas, confirmando el patrón de secreción de citoquinas inhibitorio mostrado en la figura 2. Este aumento se observa tanto en el cultivo de células dendríticas sin antígenos como en las células que incorporaron fagosomas alogénicos.

Estos resultados indican que la administración de aloantígenos en forma de fagosomas no induce la activación de las células dendríticas y no produce cambios en el patrón de secreción de citoquinas.



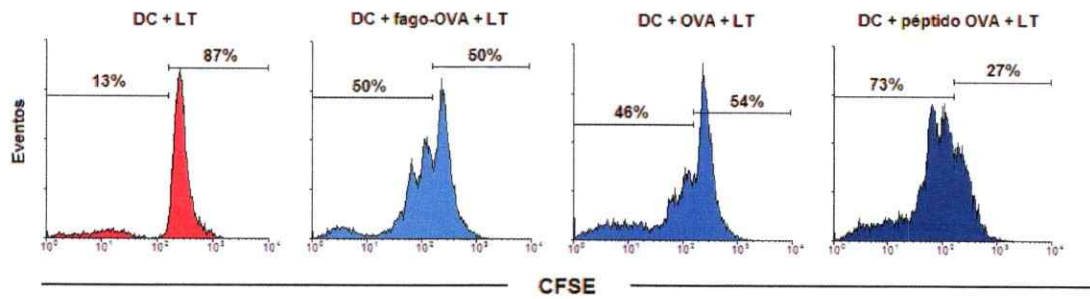
**Figura 7: La incorporación de fagosomas alogénicos no activa la secreción de citoquinas.** Células dendríticas que fueron cultivadas con o sin fagosomas, se incubaron en presencia o ausencia de LPS durante 4 horas a 37°C y se determinó la concentración de las citoquinas IL-2, IL-10 e IL-12 mediante ELISA de captura. Las barras corresponden a la desviación estándar de 3 experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



### **3.7 Células dendríticas inmaduras presentan péptidos derivados de fagosomas a linfocitos T CD4<sup>+</sup>**

Para determinar si las células dendríticas pueden presentar péptidos derivados de los fagosomas se realizó un ensayo de proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratones transgénicos OT-II que poseen un TCR que reconoce un péptido derivado de OVA. Células dendríticas tratadas con VD3 se cocultivaron durante 4 días con LT CD4<sup>+</sup> en presencia o ausencia de fagosomas-OVA, proteína OVA o péptido OVA. La proliferación celular se evaluó mediante la distribución de CFSE según se describe en métodos. Por lo tanto linfocitos OT-II se marcaron con CFSE y luego se cultivaron con DCs tratadas con fagosomas-OVA, proteína OVA o péptido OVA, y se compararon con el control sin proteína donde no se observa dilución de CFSE (Figura 8). Tanto en el cocultivo donde se agregó fagosomas-OVA como en el cocultivo con proteína OVA se pueden observar tres picos del colorante CFSE lo que indica que durante los 4 días de cocultivo los linfocitos T CD4<sup>+</sup> sufrieron 3 ciclos de división. Esto sugiere que en ambos casos la proteína OVA fue procesada por las DCs y presentada a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Por otra parte, en el cocultivo donde se agregó el péptido OVA se puede observar que más de un 70% de los LT entraron en división, lo que indica que el péptido fue presentado más eficientemente por las DCs a los LT CD4<sup>+</sup>. Estos resultados sugieren que las células dendríticas cultivadas en presencia de VD3 pueden procesar y presentar péptidos derivados del fagosoma en moléculas de MHC-II a linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

### Ensayo de proliferación de linfocitos T

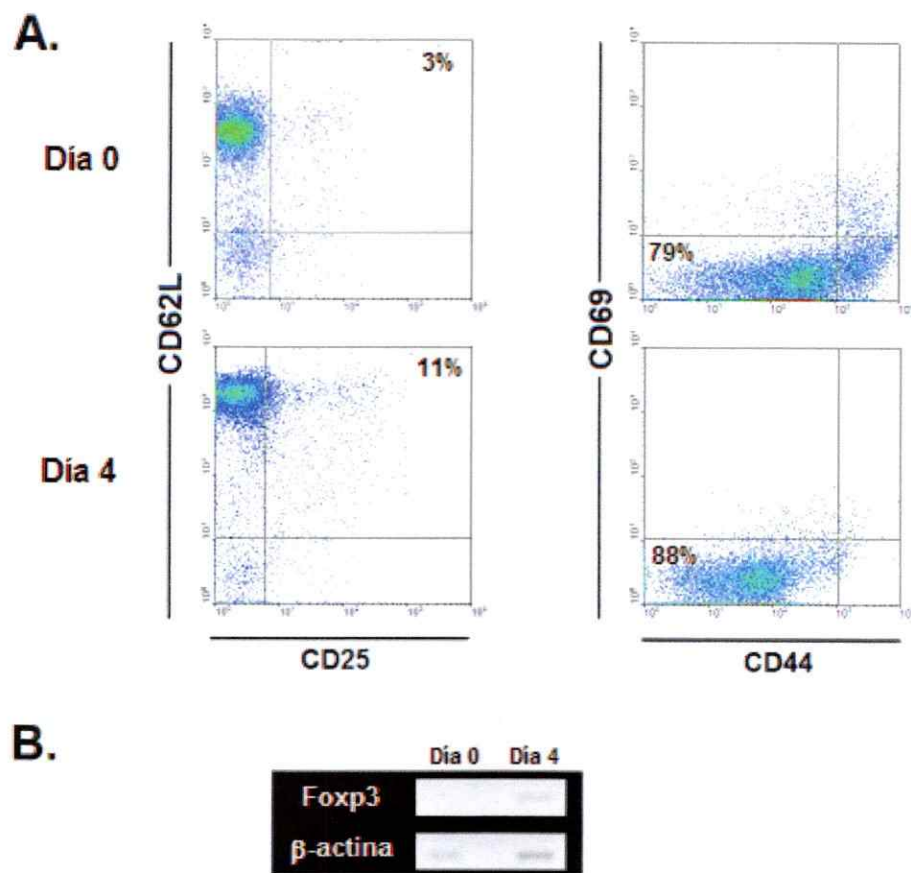


**Figura 8: Células dendríticas inmaduras presentan péptidos derivados de fagosomas-OVA a linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratones OT-II.** Determinación de la dilución de CFSE en cocultivos de células dendríticas y linfocitos T CD4<sup>+</sup> en ausencia de OVA (control, histograma rojo) o en presencia de fagosomas-OVA (fago-OVA), proteína OVA o péptido OVA<sup>323-339</sup>. La determinación de CFSE se realizó luego de 4 días de cocultivo, mediante citometría de flujo.

### **3.8 Células dendríticas cargadas con fagosomas-OVA generan una población de linfocitos T con marcadores de células reguladoras**

Luego de haber comprobado que las DCs son capaces de fagocitar, procesar y presentar antígenos derivados de los fagosomas alogénicos manteniendo un estado inmaduro, y que pueden inducir la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, nos preguntamos si era posible usar estas DCs para generar una población de linfocitos T reguladores. Para esto se realizó un cocultivo de DCs cargadas con fagosomas-OVA y LT CD4<sup>+</sup> vírgenes derivados de ratones OT-II. Luego de 4 días se analizó la expresión de CD25, CD62L, y los marcadores de activación CD44 y CD69 por citometría de flujo. Además se determinó por RT-PCR la presencia del mRNA del factor de transcripción Foxp3, molécula expresada exclusivamente en linfocitos T reguladores. En la figura 9A se observa una población de linfocitos T (11%) que expresa las moléculas CD25 y CD62L en la superficie y que mantiene bajos los niveles de expresión de CD44 y CD69. Además se comprobó la presencia del mRNA de Foxp3 en esta población de linfocitos T.

Estos resultados indican que células dendríticas cultivadas en presencia de VD3 son capaces de presentar péptidos derivados de los fagosomas a LT CD4<sup>+</sup> vírgenes y generar una población de linfocitos T con marcadores de células T reguladoras.



**Figura 9: DCs inmaduras cargadas con fagosomas-OVA generan una población de LT con fenotipo regulador.** A. Determinación de la expresión de los marcadores de superficie CD25, CD62L, CD44 y CD69 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratones OT-II que fueron cocultivados con DCs inmaduras cargadas con fagosomas-OVA. Los gráficos superiores muestran la expresión de estos marcadores en LT CD4<sup>+</sup> vírgenes recién purificados (Día 0); los gráficos inferiores muestran la expresión de estos marcadores luego de 4 días de cocultivo. B. Determinación mediante RT-PCR de la expresión del mRNA del factor de transcripción Foxp3 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes (Día 0) y luego de 4 días de cocultivo (Día 4). Como control de carga se usó la expresión del mRNA de  $\beta$ -actina.

#### 4. DISCUSIÓN

En el área de trasplante de órganos es de vital importancia la regulación de la respuesta inmune generada por los linfocitos T contra las células del injerto. Actualmente se usan drogas inmunosupresoras para evitar el rechazo agudo del trasplante y aumentar la aceptabilidad del injerto. Sin embargo, esta inmunosupresión es inespecífica y luego de algunos años, el sistema inmune del receptor frecuentemente termina rechazando al injerto. Por otro lado, el uso prolongado de drogas inmunosupresoras genera una serie de complicaciones tales como hipertensión arterial producto de la vasoconstricción renal, aumento en la susceptibilidad a padecer tumores malignos, infecciones virales, entre otras (Dantal y Souillou, 2005). Es por esto que numerosos investigadores están desarrollando nuevas técnicas para modular la respuesta inmune y así evitar el uso de estas drogas inmunosopresoras.

La evidencia de que las DCs son las responsables de presentar aloantígenos a linfocitos T para iniciar una respuesta efectora o para mantener la tolerancia central hacia los antígenos propios, ha hecho de las DCs una de las principales fuentes de estudio en tolerancia a trasplantes y en enfermedades autoinmunes. En estudios recientes se ha demostrado que células dendríticas inmaduras son capaces de inducir tolerancia a través de la generación de linfocitos T reguladores (Jonuleit y col, 2000; Lan y col, 2006).

Las células dendríticas mieloides residen en los tejidos periféricos en donde mantienen un estado inmaduro y una alta capacidad fagocítica. Una vez que las DCs han fagocitado al antígeno, comienza su proceso de maduración en donde se inducen cambios fenotípicos y funcionales. Las DCs maduras migran desde los tejidos periféricos hacia el linfonodo drenante, aumentan la expresión de MHC-II y de

moléculas coestimuladoras y aumentan su capacidad para presentar antígenos en el contexto de moléculas MHC-II a linfocitos T. Durante este proceso, las DCs secretan citoquinas que modulan la respuesta inmune como IL-2, IL-12 y TNF- $\alpha$  (Granucci y col, 2002; Banchereau y Steinman, 1998). Es así como las DCs inician la respuesta inmune frente a un antígeno determinado. Sin embargo, bajo ciertos estados de maduración, las DCs pueden inhibir la respuesta inmune de linfocitos T, como ocurre en la adquisición de tolerancia hacia los propios antígenos del organismo. Se han descrito 3 sistemas por el cual las células dendríticas mantienen la tolerancia frente a algún antígeno: 1) anergia funcional de linfocitos T, 2) delección por apoptosis, y 3) supresión por linfocitos T reguladores. La anergia funcional ocurre frecuentemente en los tejidos periféricos y consiste en la incapacidad de respuesta por parte de un linfocito T una vez que éste ha sido estimulado por su antígeno específico (Schwartz, 1996). La apoptosis es inducida por la estimulación antigénica de los timocitos o linfocitos T autorreactivos en la periferia y en ausencia de coestimulación (Lenardo y col, 1999). En este caso intervienen los receptores asociados a la muerte celular relacionados con el gen Fas y con el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF). Los linfocitos T reguladores (LTregs) más estudiados expresan en su superficie las moléculas CD4+, CD25+ y expresan el factor de transcripción Foxp3. Los LTregs tienen alta afinidad para ciertos auto-antígenos que escapan a la selección negativa en el timo. Debido a su interacción con células del epitelio reticular medular, los LTregs migran a los órganos linfoides secundarios y frenan las repuestas inmunitarias de linfocitos T estimulados por sus respectivos auto-antígenos (Mason, 2001). Su deficiencia genera enfermedades autoinmunes en el ratón e IPEX en humanos (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy X-linked syndrome), un síndrome letal marcado por una serie de trastornos autoinmunes (Bennett y col, 2001). Los LTregs tienen un rol

fundamental en la mantención de la tolerancia a trasplantes debido a que estos potencian la respuesta supresora contra los antígenos del donante.

En los 3 mecanismos de inducción de tolerancia mencionados, las DCs presentan los péptidos a linfocitos T en ausencia de una coestimulación adecuada, ya sea por la falta de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y/o CD86, o por la secreción de citoquinas inhibitorias como IL-10.

Debido a estos antecedentes, numerosos científicos han intentado modular la maduración de las células dendríticas administrando fármacos o anticuerpos durante la diferenciación de células progenitoras hacia células dendríticas. Penna y Adorini demostraron que la inclusión de vitamina D<sub>3</sub> a los cultivos de células dendríticas humanas podía inhibir su maduración y activación in vitro. Más adelante, Griffin y cols. demostraron que esta inhibición de la maduración se mantiene tanto in vitro como in vivo en un modelo murino.

Uno de los objetivos fundamentales que se pretende conseguir en el área de trasplantes es la tolerancia antígeno-específica contra antígenos derivados de moléculas de MHC-II del donante, que son la principal causa del rechazo a trasplantes.

En este trabajo se desarrolló un protocolo de generación de células dendríticas inmaduras capaces de incorporar antígenos provenientes de fagosomas que presentan moléculas de MHC-II alogénicas, sin inducir la maduración de estas células. Para detener la maduración de las células dendríticas se agregó vitamina D<sub>3</sub> a una concentración final de 1 nM durante la diferenciación de los precursores de médula ósea hacia células dendríticas. La inclusión de VD3 permitió generar DCs que expresan bajos niveles de MHC-II y CD86, corroborando los resultados obtenidos por Penna (2000) y Griffin (2001). Además se observó que al activar las DCs con un estímulo bacteriano (LPS o LTA) se induce un patrón de secreción de citoquinas

inhibitorio dado por una mayor secreción de IL-10 y una disminución en la secreción de IL-2 e IL-12, comparadas con DCs cultivadas en ausencia de VD3. Estas características son propias de DCs implicadas en respuestas de tipo Th2 o tolerogénicas. Algunos de los efectos provocados por la vitamina D<sub>3</sub>, particularmente la disminución de IL-12 se debe a la inhibición del factor de transcripción NF-κB (D' Ambrosio y col, 1998). El principal represor de NF-κB es la proteína citoplasmática IκBα que impide la traslocación de NF-κB hacia el núcleo. Se ha demostrado que la vitamina D<sub>3</sub> aumenta los niveles de IκBα mediante la estabilización del mRNA (Cohen-Lahav y col, 2006). Además la vitamina D<sub>3</sub> suprime otro factor de transcripción, NFAT, el cual está involucrado en la actividad biológica de las citoquinas. La vitamina D<sub>3</sub> reduce la síntesis de IL-2 inhibiendo directamente la formación del complejo NFATp/AP-1 dependiente del receptor de vitamina D<sub>3</sub>, VDR (Alroy y col, 1995).

Por otra parte, se ha descrito que la fagocitosis de antígenos no inmunogénicos no induce la maduración de células dendríticas. Actualmente se han usado 2 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 leucocitos del donante en apoptosis temprana, ricos en moléculas MHC-II alogénicas, y que pueden aumentar la supervivencia de un trasplante heterotópico de corazón en ratones, disminuyendo la respuesta efectora anti-donante de linfocitos T (Wang y col, 2006). Sin embargo, existen estudios que indican que bajo ciertas condiciones, las células apoptóticas inducen la activación de linfocitos T efectores eficientemente. Por otro lado, los exosomas derivados de células dendríticas del donante presentan altos niveles de MHC-II y ciertas moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, tienen un tamaño



pequeño de aproximadamente 100 nm y están siendo usados como vehículos presentadores de antígenos. Pesche y cols., demostraron que inyectando exosomas derivados de DCs inmaduras del donante se prolonga la supervivencia de trasplantes de corazón en ratas (Pesche y cols, 2003). Sin embargo, en este mismo trabajo se muestra que bajo ciertas concentraciones de exosomas se inhibe este efecto inmunosupresor. Además, debido a su pequeño tamaño y baja densidad, se hace difícil su purificación, cuantificación y manipulación para ser usados como terapia.

En esta tesis se desarrolló un sistema de administración de antígenos alogénicos a células dendríticas resistentes a la maduración, que permite mantener el fenotipo tolerogénico de las DCs determinado por la baja expresión de MHC-II y CD86 y por un patrón de secreción de citoquinas inhibitorio.

En los compartimientos endosomales de las células dendríticas inmaduras, particularmente en los fagosomas, se agrupan las moléculas de MHC-II recién sintetizadas por el retículo endoplásmico (Kleijmeer y col, 1995). Desjardins y cols. lograron purificar estos fagosomas usando pequeñas esferas de látex de baja densidad, separándolos mediante un gradiente discontinuo de sacarosa. En nuestro laboratorio modificamos este sistema para purificar fagosomas alogénicos derivados de células dendríticas inmaduras, que contienen moléculas MHC-II en su membrana. La utilización de la microscopía electrónica nos permitió determinar la forma y tamaño de los fagosomas generados con las esferas de látex. Estos tienen forma esférica y homogénea y un diámetro aproximado de 1  $\mu\text{m}$ . Demostramos que estos fagosomas son incorporados eficientemente por DCs inmaduras tratadas con VD3 y que esta incorporación no induce la maduración de estas células, como lo demuestran la baja expresión de MHC-II y CD86 en la superficie de las DCs tratadas con VD3. Además, observamos que la incorporación de fagosomas alogénicos no activa la maquinaria de

secreción de citoquinas en DCs inmaduras y que luego de activarlas con LPS se reestablece el patrón de secreción de citoquinas inhibitorio observado en las DCs tratadas con VD3, donde observamos un aumento en la secreción de IL-10 y una disminución de IL-2 e IL-12, comparadas con DCs cultivadas en ausencia de VD3. Estos resultados sugieren que la incorporación de fagosomas, mantiene las características tolerogénicas de las células dendríticas tratadas con VD3.

Las esferas de látex pueden ser usadas también como vehículo para incorporar proteínas específicas a las células dendríticas debido a las propiedades adherentes del látex. Así, es posible realizar experimentos de proliferación y presentación de antígenos a linfocitos T provenientes de ratones transgénicos para el TCR. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratones OT-II reconocen específicamente el péptido OVA<sup>323-339</sup> presentado en el contexto de moléculas de MHC-II de haplotipo H-2<sup>b</sup>. En los experimentos de proliferación de LT usamos fagosomas que fueron generados con esferas de látex cubiertas con la proteína OVA. De esta manera, es posible incorporar fagosomas-OVA a DCs inmaduras y determinar si estas células están procesando la proteína y presentando el péptido OVA a linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratones OT-II. Observamos que la cinética de proliferación de LT cocultivados con DCs cargadas con fagosomas-OVA es similar a la obtenida en el cocultivo de LT con DCs cargadas sólo con la proteína OVA luego de 4 días. Esto indica que el procesamiento y presentación de péptidos derivados de los fagosomas ocurre en un período de tiempo similar al obtenido para proteínas extracelulares. Cuando se analiza la proliferación de LT que fueron cocultivados con DCs cargadas directamente con el péptido OVA<sup>323-339</sup> observamos que los LT se encuentran en un estado más avanzado de proliferación, probablemente debido a que la presentación del péptido se logra por un intercambio de péptidos en las moléculas de MHC-II en la superficie celular.

En este trabajo se demostró además que es posible generar una población de linfocitos T con fenotipo regulador a partir de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes cocultivados con DCs cargadas con fagosomas en un modelo transgénico. Esta población de LT presenta expresión de los marcadores específicos de LTregs: CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> y el factor de transcripción Foxp3. Cabe destacar además que el resto de los linfocitos T que no presentan los marcadores de células reguladoras, se mantienen en estado virgen mostrando una baja expresión de CD25 y de los marcadores de maduración CD44 y CD69. Esto confirma las propiedades no inmunogénicas de los fagosomas y tolerogénicas de las células dendríticas.

El uso de células dendríticas inmaduras cargadas con fagosomas puede tener grandes implicancias clínicas, ya que permite expandir selectivamente una población de LT reguladores con especificidad hacia un antígeno determinado.

## 5. CONCLUSIONES

- Células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea de ratones C57BL/6 cultivadas en presencia de vitamina D<sub>3</sub> mantienen un estado inmaduro.
- La activación de DCs generadas en presencia de VD3 no induce cambios fenotípicos y genera un patrón de secreción de citoquinas inhibitorio.
- La incorporación de fagosomas alogénicos no induce la maduración de DCs producidas en presencia de VD3 manteniéndose la secreción basal de citoquinas. Luego de activarlas con LPS se mantiene el estado inmaduro y se induce un patrón de secreción de citoquinas inhibitorio.
- Las células dendríticas producidas en presencia de VD3 procesan y presentan antígenos derivados de fagosomas a linfocitos T vírgenes induciendo su proliferación.
- Las células dendríticas producidas en presencia de VD3 y cargadas con fagosomas-OVA en contacto con linfocitos T CD4 vírgenes generan una población de linfocitos T reguladores caracterizados por la expresión de los marcadores CD25 y CD62L y por la expresión de Foxp3.

## 6. REFERENCIAS

- Albert, M., Pearce, S., Francisco, L., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R., Bhardwaj, N. (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via  $\alpha\beta 5$  and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. J. Exp. Med. **188**: 1359-68.
- Alroy, I., Towers, T., Freedman, L. (1995). "Transcriptional repression of interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor". Mol. Cell. Biol. **15**: 5789-5799.
- Ardavín, C. (1997). "Thymic dendritic cells". Immunol. Today. **18** (7): 350-361.
- Ardavín, C. (2003). "Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells". Nature Rev. Immunol. **3**: 1-9.
- Banchereau, J. and Steinman, R. (1998). "Dendritic cells and the control of immunity". Nature. **392**: 245-252.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y., Pulendran, B., Palucka, K. (2000). "Immunobiology of dendritic cells". Annu. Rev. Immunol. **18**: 767-811.
- Barker, DS. (1967). "The dendritic cell system in human gingival epithelium". Arch. Oral. Biol. **12** (2): 203-208.
- Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W., Carbone, F. (1998). "Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta- chain genes under the control of heterologous regulatory elements". Immunol Cell Biol **76** (1): 34-40.
- Bénaroch, P., Yilla, M., Raposo, G., Ito, K., Miwa, K., Geuze, HJ., Ploegh, HL. (1995). "How MHC class II molecules reach the endocytic pathway". EMBO J. **14**: 37-49.
- Bennett, C., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M., Ferguson, P., Whitesell, L., Kelly, T., Saulsbury, F., Chance, P., Ochs, H. (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3". Nat. Genet. **27**: 20-21.
- Cobbold, S., Nolan, K., Graca, L., Castejon, R., Le Moine, A., Frewin, M., Humm, S., Adams, E., Thompson, S., Zelenika, D., Paterson, A., Yates, S., Fairchild, P., Waldmann, H. (2003) "Regulatory T cells and dendritic cells in transplantation tolerance: molecular markers and mechanisms". Immunol. Rev. **196**: 109-124.
- Cohen-Lahav, M., Shany, S., Tobvin, D., Chaimovitz, C., Douvdevani. (2006). "Vitamin D decreases NF $\kappa$ B activity by increasing I $\kappa$ B $\alpha$  levels". Nephrol. Dial. transplant. **21**:889-897.
- Cresswell, P. (1994) "Assembly, transport, and function of MHC class II molecules". Annu. Rev. Immunol. **12**: 259-293.

Cvetanovic, M., Mitchell, J., Patel, V., Avner, B., Su, Y., van der Saag, P., Witte, P., Fiore, S., Levine, J., Ucker, D. (2006). "Specific recognition of apoptotic cells reveals a ubiquitous and unconventional innate immunity". J. Biol. Chem. **281**: (29), 20055-20067.

D' Ambrosio, D., Cippitelli, M., Cocciolo, M., Mazzeo, D., Di Lucia, P., Lang, R., et al. (1998). "Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene". J. Clin. Invest. **101**: 252-262.

Deluca H, Cantorna M. (2001). "Vitamin D: Its role and uses in immunology". FASEB J. **15**: (14), 2579-2585.

Dantal, J., Souillou, J. (2005) "Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation". N. Engl. J. Med. **352**: 1371-1373.

Desjardins, M., Celis, J., van Meer, G., Dieplinger, H., Jahraus, A., Griffiths, G., Huber, L. (1994). "Molecular characterization of phagosomes". J. Biol. Chem. **269**: (51), 32194-32200.

Dieu, M., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., Caux, C. (1998). "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites". J. Exp. Med. **188**: 373-86.

El-Sukkari, D., Wilson, N., Hakansson, K., Steptoe, R., Grubb, A., Shortman, K., Villadangos, J. (2003). "The protease inhibitor Cystatin C is differentially expressed among dendritic cell populations, but does not control de antigen presentation". J. Immunol. **171**: 5003-5011.

Granucci, F., Andrews, D., Degli-Esposti, M., Ricciardi-Castagnoli. (2002). "IL-2 mediates adjuvant effect of dendritic cells. Trends. Immunol. **23**: (4), 169-171.

Griffin, M., Iutz, W., Phan, V., Bachman, L., McKean, D., Kumar, R. (2001). "Dendritic cell modulation by 1 $\alpha$ , 25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its analogs: A vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity *in vitro* and *in vivo*". PNAS. **98**: (12), 6800-6805.

Heath, W., Carbone, F. (2001). "Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance". Nat. Rev. Immunol. **1**: 126-34.

Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3". Science **299**: 1057-1061.

Jiang, W., Swiggard, W., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R., Nussenzweig, M. (1995). "The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing". Nature. **375**: 151-155.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., Enk, H. (2000) "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells" J. Exp. Med. **192**: 1213-1222.

Kelsall, B., Strober, W. (1997). "Dendritic cells of the gastrointestinal tract". Springer. Semin. Immunopathol. **18**: 409-420.

Kleijmeer, M., Ossevoort, M., van Veen, C., van Hellemond, J., Neefjes, J., Kast, W., Melief, C., Geuze, H. (1995). "MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells". J. Immunol. **154**: 5715-24.

Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., Romani, N. and Schuler, G. (1996). "High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10". J. Exp. Med. **184**: 741-747.

Kubo, T., Hatton, R., Oliver, J., Liu, X., Elson, C., Weaver, C. (2004). "Regulatory T cell suppression and anergy are differentially regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells". J. Immunol. **173**: 7249-7258.

Lan, Y., Wang, Z., Raimondi, G., Wu, W., Colvin, B., De Creus, A., Thomson, A. (2006). "Alternatively activated dendritic cells preferentially secrete IL-10, expand Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, and induce long-term organ allograft survival in combination with CTL4-Ig". J. Immunol. **177**: 5868-5877.

Lechler, R., Garden, O. and Turka, L. (2003). "The complementary roles of deletion and regulation in transplantation tolerance". Nat. Rev. Immunol. **3**: 147-158.

Lenardo, M., Chan, F., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J., Zheng, L. (1999). "Mature T lymphocyte apoptosis-immune regulation in a dynamic and predictable antigenic environment". Ann. Rev. Immunol. **17**: 221-253.

Lennon-Duménil, AM., Bakker, A., Maehr, R., Fiebiger, E., Overkleeft, H., Roseblatt, M., Ploegh, H., Lagaudrière-Gesbert, C. (2002). "Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation". J. Exp. Med. **196**: (4), 529-540.

Mason, D. (2001). "Some quantitative aspects of T cell repertoire selection: the requirement for regulatory T cells". Immunol. Rev. **182**: 80-88.

Matzinger, P., Guerder, S. (1989). "Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell?". Nature. **338**: 74-76.

McCurry, K., Colvin, B., Zahorchak, A., Thomson, A. (2006). "Regulatory dendritic cell therapy in organ transplantation". Transplant. International. **19**: (7), 525-538.

Morelli, A., Hackstein, H., Thomson, A. (2001). "Potential of tolerogenic dendritic cells for transplantation". Semin. Immunol. **13**: 323-335.

Morelli, A., Thomson, A. (2003). "Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction". Immunol. Rev. **196**: 125-146.

Morelli, A. (2006). "The immune regulatory effect of apoptotic cells and exosomes on dendritic cells: Its impact on transplantation". Am. J. Transplant. **6**: 254-261.

Nimmerjahn, F., Ravetch, J. (2006). "Fcγ receptors: old friends and new family members". Immunity. **24**: 19-28.

Paglia, P., Chiodoni, C., Rodolfo, M., Colombo, P. (1996). "Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo". J. Exp. Med. **183**: 317-322.

Peche, H., Heslan, M., Usal, C., Amigorena, S., Cuturi, MC. (2003). "Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection". Transplantation. **76**: 1503-1510.

Penna, G., Adorini, L. (2000). "1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation". J. Immunol. **164**: 2405-2411.

Pino, K. (2005). "Caracterización fenotípica y funcional de células dendríticas de médula ósea." Memoria de título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requerimientos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Rescigno, M., Granucci, F., Citterio, S., Foti, M., Ricciardi-Castagnoli, P. (1999). "Coordinated events during bacteria induced DC maturation". Immunol. Today. **20**: 200-3.

Sakaguchi, S. (2003). "The origin of FOXP3-expressing CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: thymus or periphery". J. Clin. Invest. **112**: 1310-1312.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A. (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products". J. Exp. Med. **182**: 389-400.

Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C., Qin, S., Lanzavecchia, A. (1998). "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation". Eur. J. Immunol. **28**: 2760-2769.

Schwartz, R. (1996). "Models of T cell anergy: Is there a common molecular mechanism?" J. Exp. Med. **184**: 1-8.

Shortman, K. and Naik, S. (2002). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development". Nature Rev. Immunol. **2**: 151-161.



Steinman, R., Pack, M., Inaba, K. (1997). "Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs". Immunol. Rev. **156**: (1), 25-37.

Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., Amigorena, S. (2001). "Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles". J. Immunol. **166**: 7309-7318.

Van Etten, E., Mathieu, C. (2005). "Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: Basic concepts". J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. **97**: 93-101.

Villadangos, J., Bryant, R., Deussing, J., Driessen, C., Lennon-Duménil, AM., Riese, R., Roth, W., Saftig, P., Shi, GP., Chapman, H., Peters, C., Ploegh, H. (1999). "Proteases involved in MHC class II antigen presenting". Immunol. Rev. **172**: 109-120.

Wang, Z., Larregina, A., Shufesky, W., Perone, M., Montecalvo, A., Zahorchak, A., Thomson, A., Morelli, A. (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.

Wikstrom, M., Stumbles, P. (2007). "Mouse respiratory tract dendritic cell subsets and the immunological fate of inhaled antigens". Immunol. Cell. Biol. **85**: 182-188.

Xing, N., Maldonado, M., Bachman, L., McKean, D., Kumar, R., Griffin, M. (2002). "Distinctive dendritic cell modulation by vitamin D3 and glucocorticoid pathways". Biochem. Biophys. Res. Commun. **297**: 645-652.

York, I., Rock, K. (1996). "Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex". Annu. Rev. Immunol. **14**: 369-396.