

UCH-FC
DOC-BMCN
D291
C.1



“Modulación del fenotipo y función de las células dendríticas de ratón por el ácido *all-trans* retinoico”

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al grado de:

**Doctor en Ciencias con mención en
Biología Molecular, Celular, y Neurociencias
Facultad de Ciencias**

Por:

Jaime Bolívar De Calisto Contreras

Septiembre, 2010

Director de Tesis:

Dr. Mario Roseblatt S.

Co-Directores:

Dra. María Rosa Bono

Dr. Jorge Rodrigo Mora

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**



Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias, que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

JAIME BOLIVAR DE CALISTO CONTRERAS

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 14 de Septiembre de 2010.

Director de Tesis:

Dr. Mario Rosemblatt S.

A blue ink signature of Mario Rosemblatt S. written over a horizontal line.

Co-Director de Tesis:

Dra. María Rosa Bono

A blue ink signature of María Rosa Bono. written over a horizontal line.

Dr. J. Rodrigo Mora

A blue ink signature of J. Rodrigo Mora. written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marco Tulio Núñez

A blue ink signature of Marco Tulio Núñez. written over a horizontal line.

Dra. María Inés Becker

A blue ink signature of María Inés Becker. written over a horizontal line.

Dra. Mónica Imarai

A blue ink signature of Mónica Imarai. written over a horizontal line.

Dr. Flavio Salazar

A blue ink signature of Flavio Salazar. written over a horizontal line.

AUTOBIOGRAFÍA

Nací un 24 de Noviembre del año 1979 en la ciudad de Santiago de Chile. Soy el primogénito, y por ende el más regalón de mis padres.



Desde que tengo uso de razón que ellos me incitaron a realizar todo tipo de deportes. Pero la verdad, nunca fui muy bueno para eso. Yo creo que eso se debe a que soy medio ciego del ojo izquierdo. Aunque de pequeño fui bastante curioso, siempre he dicho que la película *Jurassic Park* y la clonación de la oveja Dolly (Q.E.P.D.) tuvieron la culpa de que entrara al “frío mundo de la ciencia”.



AGRADECIMIENTOS

Lo primero que recuerdo cuando estaba por entrar a este doctorado, fue mi renuncia a la beca CONICYT en el año 2003. En esa oportunidad, me debatía entre la decisión de permanecer en Chile o viajar a Londres para trabajar en el laboratorio del Dr. Roberto Mayor. No fue una elección fácil, por lo que quiero partir agradeciendo a toda mi familia, en especial a mis papas y hermano, los cuales con la confianza y apoyo que siempre han depositado en mí, me hicieron sentir que debía dejar de lado todos mis miedos y arriesgarme a experimentar un nuevo desafío, el de viajar y estar lejos de casa.

De vuelta en Chile, y luego de casi un año en el extranjero y una segunda adjudicación a la beca CONICYT, comenzaba a trabajar en mi futuro laboratorio. Agradezco infinitamente a mi jefa -María Rosa- por toda la confianza que me tuvo y espero siga teniendo. Aprecio el apoyo y el cariño que sentí de parte de ella, sobre todo cuando se trataba de asuntos ajenos al trabajo. Te pido mis más sinceras disculpas por todas las rabias que les hice pasar en los primeros años. Y mi otro Jefe, ese que sólo aparecía una vez a la semana y no era precisamente para felicitarte. Mario Roseblatt, lamento todos los atrasos, errores en el uso del castellano y por latearlos con tantas preguntas tontas durante los seminarios. Muchas gracias por el apoyo que me diste cuando más lo necesité. Gracias por financiar mi primer viaje a USA y por la beca "Fundación Roseblatt" durante éste, mi último año de tesis. Siempre los recordaré con cariño a ambos, a pesar de que no respondan mis e-mails. Cuenten conmigo para lo que necesiten.

Hoy día no estaría escribiendo estos agradecimientos de no ser por todos los experimentos que logré hacer en Boston durante el último año de mi tesis. A pesar de que habría preferido mil veces no tener que pasar por tantos "problemas técnicos" durante la primera parte de mi proyecto, creo que todo se arregló al realizar una estadía en el laboratorio del Dr. Rodrigo Mora. Lo que más recuerdo de trabajar en su grupo, es el gran apoyo científico que recibí de su parte y de sus integrantes: Eduardo y Sen. Creo que sin lugar a dudas, todos sus consejos me han servido para madurar y avanzar un paso más en mi formación como profesional. Nos vemos pronto!

Y que sería de la inmunología sin la citometría de flujo. Afortunadamente para mí, alcancé a trabajar con la Valeska Simon, a la cual le debo todo lo que sé acerca de esos "puntitos". Gracias por agarrarme a coscorriones cuando trataba de compensar el tubo de autofluorescencia. Nunca me olvidaré de aquel día.

Menos mal que en el Inmuno Lab tienen al Leito. La mano derecha de "la Bono" y el amigo de todos. Bueno... casi todos. Mi viejo perro, gracias por toda la ayuda experimental y el apoyo como amigo. Siempre voy a recordar las sacadas de vuelta, los chistes y pelambres junto al chascón del Raúl. Estoy seguro de que seguiremos en contacto por mucho tiempo más. Muchas buenas vibras para ti ahora que vas a ser papá.

Y aunque "no vine a hacer amigos aquí, sino que a trabajar", estoy feliz de haber compartido con tanta gente durante mi paso por el *Inmuno Lab*. Los "galancetes piteros": Paulita Michea, Pablo Espejo y Pablo Vargas; a ellos les debo los momentos de *relajo* y las discusiones profundas acerca de la vida. Gracias a todos ellos por escucharme. De las niñas: la Dani Sauma, la Pazita, la Joce, la Ale, la Fabi, la Cako, la Cinthia, la Pao y la Jenny, que, aunque no creo haber compartido lo suficiente con cada una de ellas, siempre estuvieron ahí cuando

les pedí algún consejo o protocolo. Gracias por su ayuda. Y a las que les tocó sufrir a mi lado por algún tiempo: la *rucia*, la Cami y la Gaby, gracias por soportarme. Espero que al menos hayan aprendido a dejar las micropipetas como corresponde. A mi sociate Gonzalo, por todas esas historias y *lanzazos*. Un saludo también para todas las nuevas contrataciones del lab, mucha suerte en lo que venga: Paulina (la agrandá'), la Pauli, la Sarah y la Yessia.

Quiero destacar también, la labor de los integrantes que están ahí en el lab, pero que no se ven tanto. La Pame, la Eva y el Oscar, que haríamos sin Uds., aprecio mucho el trabajo que hacen, nos dan un ambiente limpio y ordenando para ensuciar con nuestros experimentos y locuras. Lo siento si es que alguna vez les puse alguna mala cara o les dije alguna pesadez.

También quisiera agradecer a los integrantes de mi comisión por toda la paciencia que me tuvieron durante todos estos años, y a Inés Saavedra por todo el trabajo tras bambalinas que le toca realizar.

Aunque nos conocimos hace relativamente poco tiempo, desde el primer día fuiste una excelente compañera, y más tarde, te convertiste en una mejor amante. Gracias por estar siempre a mi lado y apoyarme en todo momento. Gracias por no rendirte nunca y entender que mi cabeza nunca deja de trabajar, que no se desconecta tan fácilmente de esto que es la ciencia. Admiro tu paciencia para soportarme, sé que soy pesado y gruñón. Me lo han dicho un par de veces. Gracias por los abrazos, la risa y las tonteras. Gracias por ser tan *monga* y cabra chica. Es justo lo que soy Yo. Te amo Ro.

Este año fue especial para mí, fui tío, me case, aprendí a manejar, y ahora estoy por empezar un post-doctorado en Harvard. Siempre he dicho que todos mis resultados han sido mitad esfuerzo y mitad "suerte". Las gracias entonces también para esa energía positiva que siempre me ha rodeado.



ÍNDICE DE CONTENIDOS



AUTOBIOGRAFÍA	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN	XI
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Homeostasis en la mucosa intestinal.....	3
1.2 Células dendríticas: origen y función.....	5
1.3 Células dendríticas asociadas a la mucosa intestinal y producción de ácido retinoico ...	7
1.4 Factores involucrados en la expresión de las enzimas RALDH en DC	10
1.5 Vitamina A: captación, almacenamiento y transporte hacia los tejidos	11
1.6 Receptores de ácido retinoico y señalización en el núcleo	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1 Animales	16



2.2	Reactivos y medios de cultivo:	17
2.3	Generación <i>in vitro</i> de células dendríticas de médula ósea (BMDC).....	18
2.4	Expansión <i>in vivo</i> y aislamiento de las células dendríticas.....	18
2.5	Purificación inmunomagnética de las células dendríticas.....	18
2.6	Activación de las BMDC.....	19
2.7	Detección de citoquinas intracelulares en BMDC.....	19
2.8	Tratamiento oral con RA.....	19
2.9	Inmunofenotipo y citometría de flujo (FACS)	19
2.10	Anticuerpos y reactivos para citometría de flujo	20
2.11	Ensayo funcional de la actividad RALDH (<i>Aldefluor</i> ®).....	20
2.12	Separación de células dendríticas Alde ⁺ y Alde ⁻ mediante <i>cell sorting</i>	20
2.13	Extracción de RNA y síntesis de cDNA para PCR en tiempo real.....	21
2.14	PCR en tiempo real (qPCR).....	21
2.15	Purificación de linfocitos T.....	21
2.16	Co-cultivos de células dendríticas y linfocitos T	22
2.17	Análisis estadístico.....	22
3.	RESULTADOS	23
3.1	El ácido <i>all-trans</i> retinoico inhibe la expresión de MHC-II, CD80 y CD86 en células dendríticas de ratón generadas <i>in vitro</i> con GM-CSF	23
3.2	Células dendríticas de ratón generadas <i>in vitro</i> en presencia de ácido <i>all-trans</i> retinoico y tratadas con estímulos derivados de patógenos mantienen un fenotipo inmaduro.....	27
3.3	Células dendríticas de ratón generadas <i>in vitro</i> en presencia de ácido <i>all-trans</i> retinoico, no producen IL-12 ni IL-10, pero si IL-6 en respuesta a estímulos derivados de patógenos	29
3.4	El ácido <i>all-trans</i> retinoico induce la expresión de la enzima RALDH2 en células dendríticas de ratón.....	32
3.5	El ácido <i>all-trans</i> retinoico aumenta la actividad enzimática RALDH en células dendríticas de ratón.....	35

3.6 El tratamiento oral con ácido <i>all-trans</i> retinoico aumenta la actividad enzimática RALDH en células dendríticas de ratón de linfonodos subcutáneos	38
3.7 La actividad enzimática RALDH en células dendríticas se correlaciona directamente con la capacidad para inducir los receptores de <i>homing</i> a intestino ($\alpha 4\beta 7$ y CCR9) en linfocitos T ..	41
3.8 Células dendríticas generadas <i>in vitro</i> en presencia de ácido <i>all-trans</i> retinoico, inducen los receptores de <i>homing</i> a intestino $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en linfocitos T	44
4. DISCUSIÓN	47
4.1 Vitamina A y el sistema inmune.....	47
4.2 Efecto del ácido retinoico sobre las células dendríticas	48
4.3 Ácido retinoico y retroalimentación positiva de las enzimas RALDH en DC.....	52
4.4 Células dendríticas CD103 ⁺ y expresión de las enzimas RALDH	53
4.5 Producción de ácido retinoico por GALT-DC, e inducción de receptores de <i>homing</i> a intestino en linfocitos T	54
4.6 Modelo propuesto para la inducción de las enzimas RALDH en GALT-DC.....	56
5. CONCLUSIONES	57
6. BIBLIOGRAFÍA.....	58





ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las células dendríticas son un factor clave para el inicio de una respuesta inmune adquirida.	4
Figura 2. Síntesis del ácido retinoico a partir de sus precursores.	9
Figura 3. Concentraciones fisiológicas de RA no afectan la generación <i>in vitro</i> de DC.	24
Figura 4. El RA inhibe la expresión de MHC-II, CD80 y CD86 en BMDC.	26
Figura 5. BMDC generadas en presencia de RA son resistentes a la maduración.	28
Figura 6. BMDC generadas en presencia de RA no producen IL-12 en respuesta a LPS.	30
Figura 7. El RA favorece la generación de BMDC productoras de IL-6.	31
Figura 8. El RA aumenta la expresión del mRNA <i>Aldh1a2</i> en BMDC.	32
Figura 9. El RA aumenta la expresión del mRNA <i>Aldh1a2</i> en PLN-DC y Sp-DC.	34
Figura 10. El RA aumenta la actividad RALDH en BMDC.	36
Figura 11. El RA aumenta la actividad RALDH en las DC de linfonodos secundarios.	37
Figura 12. La administración oral de RA es suficiente para inducir la actividad RALDH en PLN-DC.	38
Figura 13. El RA es necesario y suficiente para la expresión <i>in vivo</i> de RALDH2 en MLN-DC. ..	40
Figura 14. La actividad enzimática RALDH en MLN-DC se correlaciona directamente con la expresión del mRNA <i>Aldh1a2</i> y la capacidad para inducir los receptores de <i>homing</i> a intestino $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en los LT.	42
Figura 15. La inducción <i>in vitro</i> de los receptores de <i>homing</i> $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en LT, depende de la síntesis <i>de novo</i> de RA por parte de las MLN-DC.	43
Figura 16. BMDC generadas en presencia de RA inducen los receptores de <i>homing</i> a intestino $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en LT CD4 ⁺	45
Figura 17. La administración exógena de RA por vía oral, promueve que PLN-DC adquieran la capacidad de inducir en LT CD8 ⁺ los receptores de <i>homing</i> a intestino $\alpha 4\beta 7$ y CCR9.	46
Figura 18. Efecto <i>in vivo</i> del RA sobre el fenotipo de las DC de PLN y MLN.	51
Figura 19. Las enzimas RALDH son inducidas por RA en las DC de lamina propia.	56

ABREVIATURAS

2-ME:	2-mercapto etanol
ADH:	Alcohol Deshidrogenasa
ALDH:	Aldehído Deshidrogenasa
Alde⁻:	Fracción de Células Aldefluor negativa
Alde⁺:	Fracción de Células Aldefluor positiva
DC:	Célula Dendrítica
DEAB:	Dietil-aminobenzaldeído
FACS:	Citometría de Flujo
FBS:	Suero Fetal Bovino
Fig.:	Figura
Flt3L:	<i>Fms-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand</i>
GALT-DC:	Células Dendríticas Asociadas a la Mucosa Intestinal
GM-CSF:	Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
HSC:	Células Hepáticas Estrelladas
IFNγ:	Interferón-gama
IgA:	Inmunoglobulina de tipo A
IL:	Interleuquina
LP:	Lámina Propia
LP-DC:	Célula Dendrítica de Lámina Propia
LPS:	Lipopolisacárido
LRAT:	Lecitin:Retinol Aciltransferasa
LRAT^{-/-} VAD:	cepa de ratones deficientes en la enzima LRAT alimentados con una dieta deficiente en vitamina A
LT:	Linfocitos T
LTreg:	Linfocitos T reguladores
MGH:	Hospital General de Massachusetts
min:	minutos



MLN:	Linfonodo Mesentérico
MLN-DC:	Célula Dendrítica de Linfonodo Mesentérico
OVA:	Ovoalbúmina
PLN:	Linfonodo Periférico Asociado a Piel
PLN-DC:	Célula Dendrítica de Linfonodo Periférico Asociado a Piel
PP-DC:	Célula Dendrítica de Placas de Peyer
PPARγ:	<i>Peroxisome Proliferator- Activated Receptor gamma</i>
qPCR:	PCR en tiempo real
RA:	ácido all- <i>trans</i> retinoico
RALDH:	Retinaldehído Deshidrogenasa
RARs:	Receptores de Ácido Retinoico
RXR:	Receptores de Retinoides X
RBP:	Proteína de Unión a Retinol
REH:	Retinil Éster Hidrolasa
SEM:	Error Estándar de la Media
Sp-DC:	Células Dendríticas de Bazo
STRA6:	<i>Stimulated by Retinoic Acid 6</i> (Receptor del Complejo Retinol:RBP)
T-MACS:	Tampón MACS
TLR:	Receptores de Tipo Toll
TGF-β:	Factor de Crecimiento Transformante beta
VAD:	Deficiente en Vitamina A





RESUMEN

Las células dendríticas (DC) asociadas a la mucosa intestinal (GALT-DC), tales como las células dendríticas de la lámina propia o las DC del linfonodo mesentérico (MLN-DC), son un factor clave en la regulación del balance entre linfocitos T reguladores Foxp3^+ y linfocitos pro-inflamatorios Th17. Además, ellas inducen eficientemente la expresión de los receptores de *homing* $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en células T y B, lo que les confiere a los linfocitos un tropismo preferencial por la mucosa intestinal. Todas estas propiedades de las GALT-DC, son atribuidas a su exclusiva habilidad de producir ácido retinoico (RA) a partir de su precursor la vitamina A. Dada la importancia que tienen las GALT-DC en la regulación de una respuesta inmune intestinal, una pregunta clave, y que no ha sido resuelta aún, es cómo estas células adquieren la capacidad de sintetizar el RA. Se ha documentado que la mucosa intestinal del intestino delgado de los mamíferos, es uno de los pocos tejidos en el cual se produce RA continuamente. Además, recientemente se describió que los precursores de las DC de la lámina propia, provenientes de la médula ósea, terminan su proceso de diferenciación en ese tejido. Por lo tanto, es muy probable que el RA module alguna de las propiedades inherentes a las GALT-DC, tal como la expresión de las enzimas involucradas en su propia síntesis (RALDH). En este trabajo, utilizando el modelo murino como aproximación experimental, se muestra que DC generadas *in vitro* en presencia de concentraciones fisiológicas de RA (1-100 nM), tienen una menor expresión de los marcadores clásicos de maduración: MHC-II, CD80 y CD86, comparadas con DC control. Además, este fenotipo inmaduro se mantuvo intacto, incluso después de la exposición a estímulos patogénicos. Interesantemente, las DC generadas en presencia de RA no produjeron la citoquina pro-inflamatorias IL-12 en respuesta a lipopolisacárido. Sin embargo, se observó un aumento en la producción de IL-6, comparado con las DC control. Por otro parte, se demostró que el RA es capaz de

inducir específicamente la expresión del gen que codifica para la enzima RALDH2 (*Aldh1a2*), tanto en DC generadas *in vitro*, como en DC aisladas de linfonodos no asociados a la mucosa intestinal. Consistente con estos resultados, se encontró un mayor porcentaje de células con actividad enzimática RALDH (determinado mediante el ensayo de Aldefluor®) en las DC tratadas con RA, lo cual sugiere una mayor producción de RA por parte de estas células. Importantemente, este fenómeno ocurrió tanto *in vitro* como *in vivo*, en DC aisladas de ratones tratados oralmente con RA. Además, utilizando un modelo murino de deficiencia aguda de vitamina A (y por ende de RA), se demostró que las GALT-DC de estos animales tienen una menor expresión del mRNA RALDH2 y una menor actividad enzimática RALDH. Lo que a su vez, fue rescatado casi totalmente por el tratamiento oral con RA. Sugiriendo que el RA es necesario y suficiente tanto *in vivo* como *in vitro*, para la expresión y actividad de las enzimas involucradas en su propia síntesis. Finalmente, la purificación de la fracción de GALT-DC con actividad RALDH (células Aldefluor® positivas), permitió correlacionar directamente la actividad RALDH con la capacidad de inducir los receptores de *homing* a intestino $\alpha4\beta7$ y CCR9 en linfocitos T. El cual es un proceso que requiere de la producción de RA por parte de las DC.

En conjunto estos resultados muestran que, el RA modula el fenotipo y función de las DC, en donde el RA sería necesario y suficiente para conferirle a las GALT-DC la capacidad de sintetizar esta molécula. De esta forma, el mismo RA producido por las GALT-DC, actuando de manera autocrina, sería suficiente para mantener la expresión de las enzimas involucradas en su propia síntesis mediante un mecanismo de retroalimentación positiva.



ABSTRACT

Gut-Associated Dendritic Cells (GALT-DC), such as lamina propria dendritic cells (LP-DC) or mesenteric lymph node dendritic cells (MLN-DC) are key factors in regulating the balance between Foxp3⁺ T regulatory cells and Th17 pro-inflammatory lymphocytes. In addition, they efficiently induce the expression of the homing receptors $\alpha 4\beta 7$ and CCR9 in T and B cells, giving them a preferential tropism for the intestinal mucosa. All these properties, are attributed to the cells' unique ability to produce retinoic acid (RA) from its precursor vitamin A. Given the importance of GALT-DC in the regulation of intestinal immune responses, a key question that has not been resolved yet, is how these cells acquire the ability to synthesize RA. It has been documented that the small intestine of mammals, is one of the few tissues in which RA is continuously produced. Also, it was recently described that LP-DC precursors, coming from the bone marrow, ends their differentiation process in that tissue. Therefore, it is very likely that the RA modules some of the inherent properties of GALT-DC, such as the expression of the enzymes involved in their own synthesis (RALDH). In this work, we show that DC generated in vitro in the presence of physiological concentrations of RA (1-100 nM) have a lower expression of some of the classical maturation markers (MHC-II, CD80 and CD86), compared with control DC. Furthermore, this immature phenotype remained intact, even after exposure to pathogenic stimuli. Interestingly, DC generated in the presence of RA did not produce the pro-inflammatory cytokine IL-12 in response to LPS. However, there was an increase in the production of IL-6, compared with control DC. On the other hand, it was found that RA can specifically induce the expression of the gene encoding for the RALDH2 enzyme (*Aldh1a2*), both in vitro generated DC and in DC isolated from lymph nodes not associated with the intestinal mucosa. Consistent with these results, we found a higher percentage of cells with RALDH enzyme activity (determined by the test Aldefluor®) in RA-treated DC,

suggesting a higher production of RA by these cells. Importantly, this phenomenon occurred both in vitro and in vivo in DC isolated from mice pretreated orally with RA. Using a mouse model of acute deficiency of vitamin A (and thus RA), it was demonstrated that GALT-DC from these animals have a decreased expression of RALDH2 mRNA and a reduced RALDH enzyme activity. This in turn, was almost completely rescued by an oral treatment with RA. This suggests that RA is necessary and sufficient both in vivo and in vitro for the expression and activity of the enzymes involved in its own metabolism. Finally, the purification of GALT-DC fraction that showed RALDH activity (Aldefluor® positive cells), allowed for direct correlation of the RALDH activity with the ability to induce the gut homing receptor $\alpha 4\beta 7$ and CCR9 in T lymphocytes, which is a process that requires the production of RA by the DC.

Taken together, these results show that RA modulates the phenotype and function of DC, where the RA would be necessary and sufficient to confer the GALT-DC ability to synthesize this molecule. Thus, the same RA produced by GALT-DC, acting in an autocrine manner, would be sufficient to maintain the expression of the enzymes involved in its own synthesis through a positive feedback mechanism.

1. INTRODUCCIÓN

La mucosa intestinal es la mayor superficie corporal expuesta al medio ambiente. Se estima que el área promedio de un humano adulto alcanza los 400 m² de superficie (Tezuka & Ohteki 2010). A diferencia de otros epitelios, la mucosa intestinal esta formada por una única y delgada monocapa de células columnares la cual separa el lumen del intestino con el tejido conectivo o lámina propia (LP) del huésped (Artis 2008). Este sitio es la puerta de entrada de todo lo que ingerimos a través de la dieta y, además, es el nicho de millones de microorganismos los que en su conjunto componen la denominada flora comensal (Ley y col, 2006). Debido a la enorme carga de antígenos presente en el lumen del intestino, el sistema inmune se enfrenta al constante desafío de mantener un adecuado balance homeostático entre tolerancia -hacia antígenos dietarios y la flora comensal- e inmunidad -evitando la posible entrada y colonización de organismos patógenos-. Tanto componentes de la inmunidad innata como de la inmunidad adquirida, participarían en la mantención de este balance inmunológico (Arseneau y col, 2007). El quiebre de este equilibrio trae como consecuencia el desarrollo de diversos trastornos inflamatorios intestinales, siendo los más comunes y documentados la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (Nell y col, 2010; Xavier & Podolsky 2007). Bajo determinadas condiciones patológicas, dos de los mecanismos celulares que permiten explicar el desarrollo de estas enfermedades son la migración o *homing* anormal de los linfocitos T (LT) inflamatorios hacia la mucosa intestinal (Agace 2008; Eksteen y col, 2004; Mora 2008; Salmi & Jalkanen 2005; Xavier & Podolsky 2007), y un desbalance entre los LT reguladores (LTreg) y los linfocitos Th17 (Abraham & Cho 2009; Bai y col, 2009; Eastaff-Leung y col, 2010; Kitani & Xu 2008; Seiderer y col, 2008). En ambos casos, se produce como consecuencia una inflamación exacerbada y descontrolada de la mucosa intestinal. Recientemente, se demostró que las células dendríticas (DC) asociadas a la mucosa intestinal (GALT-DC) mediante la producción de

ácido retinoico (RA), podrían participar en ambos procesos. Por lo tanto, entender el mecanismo por el cual las GALT-DC adquieren la capacidad para producir RA permitiría el diseño de nuevas terapias que ayuden a combatir diversas patologías intestinales humanas.

A la fecha, existen pocos reportes en la literatura que documenten los factores que regulan las enzimas involucradas en la generación de RA por las GALT-DC, por lo que en este trabajo se estudió la existencia de un posible mecanismo de retroalimentación positiva gatillado por el mismo RA y, además, analizamos cómo esta molécula afecta el fenotipo de las DC utilizando como modelo de estudio el ratón.

1.1 Homeostasis en la mucosa intestinal

El desarrollo del sistema inmune en el intestino de los mamíferos, esta estrechamente ligado a la colonización bacteriana al momento del alumbramiento. La asumida esterilidad del feto, se pierde instantáneamente al contacto con el canal vaginal, y luego con el medio ambiente (Macfarlane & Macfarlane 2009). A pesar de la enorme diversidad de microorganismos existentes, sólo unos pocos han sido exitosos en colonizar el intestino humano. En total, constituyen un grupo de entre 500 a 1.000 organismos anaeróbicos, aeróbicos y aeróbicos facultativos, los cuales conforman la denominada flora comensal (Magalhaes y col, 2007; Pedron & Sansonetti 2008). La combinación de al menos tres mecanismos distintos de protección o control inmunológico, han permitido explicar cómo el sistema inmune funcionaría a nivel de la mucosa intestinal (Hooper & Macpherson 2010). El primero de ellos, el cual evita el contacto físico entre los microorganismos y el epitelio intestinal, esta mediado por la producción de mucus (Johansson y col, 2008), la secreción de proteínas con actividad anti-microbiana (Guani-Guerra y col, 2010; Meyer-Hoffert y col, 2008), y la producción de inmunoglobulinas de tipo A (IgA) por células B plasmáticas. El segundo punto de control, esta dado por una eficaz detección y destrucción de los organismos patógenos que logren penetrar la barrera epitelial, el cual esta mediado por macrófagos y monocitos intestinales (Kelsall 2008). Finalmente, la presencia de LTreg en el intestino permite un adecuado control de una respuesta inmune de tipo inflamatoria Th1 y/o Th17 (Barnes & Powrie 2009). Sin embargo, de ocurrir una disrupción en la barrera intestinal ya sea por un patógeno o un compuesto irritante, esto tendrá como consecuencia -entre otras- la activación de las DC residentes en ese lugar, lo que resultará a su vez en un aumento en la expresión de ciertos receptores de quimioquinas (tales como CCR7 y CXCR4) y de moléculas involucradas en la presentación de antígenos a los linfocitos, tales como: MHC-II, CD80 y CD86. Esta serie de cambios es comúnmente denominada como maduración de las DC. De esta manera,

y con el antígeno en su interior, las DC “maduras” migran a través de la linfa hacia el órgano linfoide más cercano. En este lugar, activarán de manera antígeno-específica a los linfocitos T y B, iniciando una respuesta inmune de tipo adquirida (Coombes & Powrie 2008) (Fig. 1).

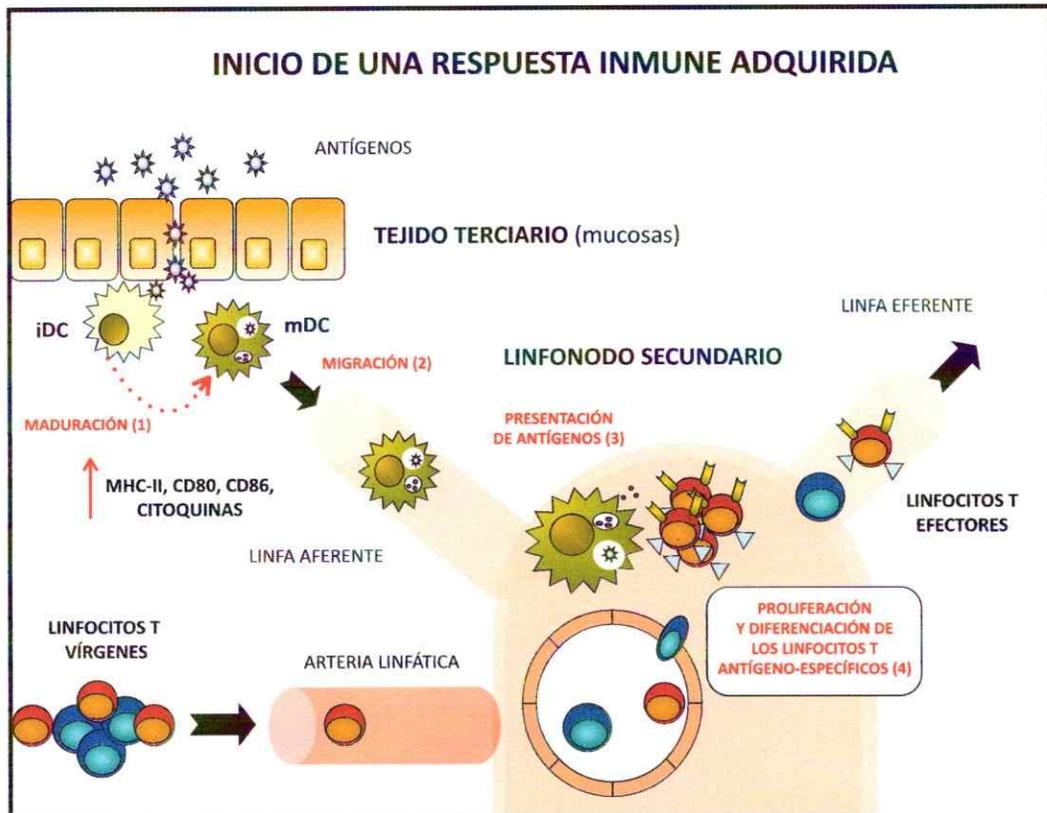


Figura 1. Las células dendríticas son un factor clave para el inicio de una respuesta inmune adquirida.

En la periferia, las células dendríticas (DC) presentes en el tejido terciario, se encuentran principalmente en un estado denominado “inmaduro” (iDC), en el que expresan bajos niveles de las moléculas: MHC-II, CD80 y CD86, entre otros marcadores. Estas iDC, son muy eficientes en capturar antígenos. Sin embargo, bajo determinadas condiciones, las iDC sufren una serie de cambios conocidos como “maduración”, en el que aumentan la expresión de los marcadores antes mencionados (1). Estas “DC maduras” (mDC), migrarán a través de la linfa hacia el linfonodo secundario más cercano (2), en donde presentarán a los linfocitos T y B, pequeños fragmentos del antígeno anteriormente capturado (3). Luego, únicamente los linfocitos antígeno-específicos serán capaces de proliferar y diferenciarse en linfocitos T efectores (4), los que a su vez son los encargados de ejecutar la respuesta inmune adquirida.

1.2 Células dendríticas: origen y función

Las DC son una población especializada de células presentadoras de antígeno que cumplen un rol clave durante el inicio de una respuesta inmune. Se encuentran distribuidas en prácticamente todos los tejidos del organismo, en pequeñas cantidades en relación a otras células, en donde funcionan como verdaderos centinelas frente a todo tipo de antígenos, ya sean propios o extraños (Banchereau y col, 2000). Sus precursores, los cuales se originan en la médula ósea, migran a través de la sangre colonizando los diferentes tejidos del organismo, y una vez allí, factores locales permiten su diferenciación terminal convirtiéndolas en las diferentes subpoblaciones de DC descritas. Además, se cree que estos factores locales les conferirían ciertas características funcionales tejido-específicas (Liu & Nussenzweig 2010; Sigmundsdottir & Butcher 2008). La expresión de los receptores para los factores de crecimiento GM-CSF y Flt3L en los precursores de las DC de ratón, ha permitido una mejor caracterización de estas células, tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que al cultivar estas células con los ligandos de estos receptores, se obtiene un considerable aumento del porcentaje de las DC presentes en cultivo, o en todos los órganos linfoides secundarios de estos animales (Inaba y col, 1992a; Maraskovsky y col, 1996).

Las DC son un grupo heterogéneo en cuanto a la función que desempeñan durante una respuesta inmune, lo cual podría depender del lugar donde ellas residen o activan a los linfocitos (Dudda y col, 2005; Dudda & Martin 2004; Dudda y col, 2004; Edele y col, 2008b; Neutra y col, 2001; Sheasley-O'Neill y col, 2007; Sigmundsdottir & Butcher 2008). La expresión de diferentes moléculas en la superficie de estas células, ha permitido su clasificación en al menos tres poblaciones principales: *DC residentes en los linfonodos* (Domínguez & Ardavín 2010), *DC migratorias no asociadas a los linfonodos* (Helft y col, 2010), y *DC plasmacitoides* (Swiecki & Colonna 2010). La principal función de los dos primeros grupos, es la mantención de la tolerancia frente antígenos inocuos y la inducción de una respuesta inmune contra cualquier tipo de

patógeno. Por otra parte, las DC plasmacitoides se caracterizan por secretar grandes cantidades de interferón-alfa ($IFN\alpha$) en respuesta a antígenos virales (Merad & Manz 2009). Generalmente, las DC se clasifican según la co-expresión de múltiples proteínas de superficie (Liu & Nussenzweig 2010). Sin embargo en el modelo murino, la expresión de la integrina CD11c se usa como un marcador universal de estas células, ya que se expresa -en mayor o menor medida- en todas las poblaciones de DC descritas hasta la fecha.

Es generalmente aceptado, que el estado de maduración de las DC tiene consecuencias en el tipo de respuesta inmune efectora observada. En condiciones no inflamatorias, las DC poseen un fenotipo inmaduro el cual sería importante para la generación y mantención de un estado de tolerancia antigénica al beneficiar la generación de LTreg, o bien al inducir un estado de anergia en estas células (Banchereau & Steinman 1998; Laffont y col, 2010; Rutella y col, 2006; Steinman y col, 2003; Thomson 2010; Tisch 2010; Verginis y col, 2005). Además, la producción de la citoquina anti-inflamatoria interleuquina (IL) -10 (IL-10) por parte de algunas DC inmaduras, es capaz de inhibir la maduración de otras DC cercanas (Fiorentino y col, 1991a; Fiorentino y col, 1991b; Monteleone y col, 2008) y a su vez, promover la generación de LTreg $Foxp3^+IL-10^+$ y LTreg $Foxp3^+IL-10^-$ (Xu y col, 2010; Yamazaki & Steinman 2009). En cambio, y dependiendo de la naturaleza del antígeno involucrado, las DC maduras producen un patrón de citoquinas más bien de tipo inflamatorio, el cual permite la generación de respuestas Th1, Th2 o Th17 (Kapsenberg 2003; Littman & Rudensky 2010). Por ejemplo, DC activadas por compuestos derivados de bacterias, tal como el lipopolisacárido (LPS), producen la citoquina pro-inflamatoria IL-12, la cual es un factor polarizante hacia Th1 en los linfocitos T $CD4^+$ (LT $CD4^+$). Por su parte, la citoquina IL-6 en conjunto con el factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$), promueven la polarización de los linfocitos hacia un fenotipo Th17. Por lo tanto, la expresión de MHC-II, CD80 y CD86 por parte de las DC, y el patrón de citoquinas

presentes al momento de la activación de los linfocitos, parecen ser factores claves para el desarrollo y tipo de respuesta inmune adquirida.

Además de activar eficientemente a los LT vírgenes, las DC también determinan el patrón de migración o *homing* de los linfocitos, mediante la inducción de distintas moléculas en la superficie de ellos. Es así, como las DC de los linfonodos periféricos asociados a piel (PLN-DC) inducen en los LT la expresión de los ligandos de E- y P-selectinas, los cuales a su vez permiten la migración específica de los linfocitos hacia la piel (Tietz y col, 1998). En cambio, las DC de la lamina propia (LP-DC), del linfonodo mesentérico (MLN-DC), o de las placas de Peyer (PP-DC), inducen la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ y el receptor de la quimioquina 9 (CCR9) en los linfocitos T y B, las cuales son moléculas necesarias para la migración de los linfocitos hacia el intestino delgado (Ng y col, 2010a). Por lo tanto, y dependiendo del lugar de procedencia de la DC (piel o mucosa intestinal), los LT adquieren diferencialmente la expresión de los receptores de *homing* en su superficie. Actualmente, se sabe que el ácido retinoico (RA) -producido casi exclusivamente por las GALT-DC- induce un patrón de receptores de *homing* a intestino en los linfocitos T y B, inhibiendo al mismo tiempo, la expresión de los receptores de *homing* a piel (Hamann y col, 1994; Iwata 2009; Iwata y col, 2004; Jaensson y col, 2008; Johansson-Lindbom & Agace 2007; Kantele y col, 1999; Mora y col, 2003; Mora & von Andrian 2006; Stagg y col, 2002; Svensson y col, 2002).

1.3 Células dendríticas asociadas a la mucosa intestinal y producción de ácido retinoico

Las GALT-DC, son un conjunto particular de DC que residen principalmente en la LP del intestino y en las capas musculares y serosa del peritoneo. También están presentes en las PP y en el MLN. Todas ellas comparten propiedades únicas que las distinguen de sus contrapartes asociadas a PLN. Entre estas características se cuentan: la inducción de un patrón específico de receptores de *homing* a intestino en linfocitos T

y B; la capacidad de favorecer la producción de IgA en células B; y la modulación del balance LTreg/Th17. El factor común detrás de estos tres fenómenos, reside en la habilidad por parte de las GALT-DC de producir RA. En particular, se demostró que la expresión de las enzimas retinal deshidrogenasas (RALDH) por las GALT-DC, está asociado con la capacidad de producir RA (Iwata 2009; Ng y col, 2010b; Tezuka & Ohteki 2010).

En ratón, la expresión de la integrina $\alpha E\beta 7$ (CD103) define un subconjunto particular de LP-DC (del Rio y col, 2010a), el cual ha sido involucrado en la captura y transporte de antígenos intestinales hacia el MLN (Schulz y col, 2009). Lugar en el cual, a través de la síntesis de RA, favorecería la inducción de LTreg Foxp3⁺ mediada por TGF- β . Por esta última razón, se cree que estas DC cumplen un rol clave en la generación de la tolerancia hacia antígenos orales (Bogunovic y col, 2009; Matteoli y col, 2010; von Boehmer 2007). Recientemente, se describió la existencia de esta subpoblación de DC también en humanos (del Rio y col, 2010a; Jaensson y col, 2008).

La síntesis del RA (Fig. 2) en GALT-DC, es mediada por dos conjuntos distintos de enzimas. En una primera etapa, la vitamina A o retinol es oxidado -de manera reversible- dando origen a una molécula de retinal. Esta reacción es catalizada por una subfamilia de las enzimas alcohol deshidrogenasas (ADH). Las diferentes isoformas de las ADH (ADH1, ADH2, ADH3, ADH4), son expresadas ubicuamente en la mayoría de los tejidos, por lo que se asume que la producción de este intermediario está limitada únicamente por la disponibilidad de su sustrato. En una segunda etapa, un conjunto distinto de enzimas pertenecientes a la familia de las aldehído deshidrogenasas (ALDH), las que se expresan en células de ciertos tejidos del organismo, oxidan el retinal -esta vez de manera irreversible- para producir el RA (Manicassamy & Pulendran 2009; Pino-Lagos y col, 2008b). Por lo tanto, se postula que la expresión selectiva de las enzimas ALDH es el paso limitante en la síntesis de RA, lo cual permitiría modular una respuesta inmune de manera tejido-específica (Duester y col, 2003).

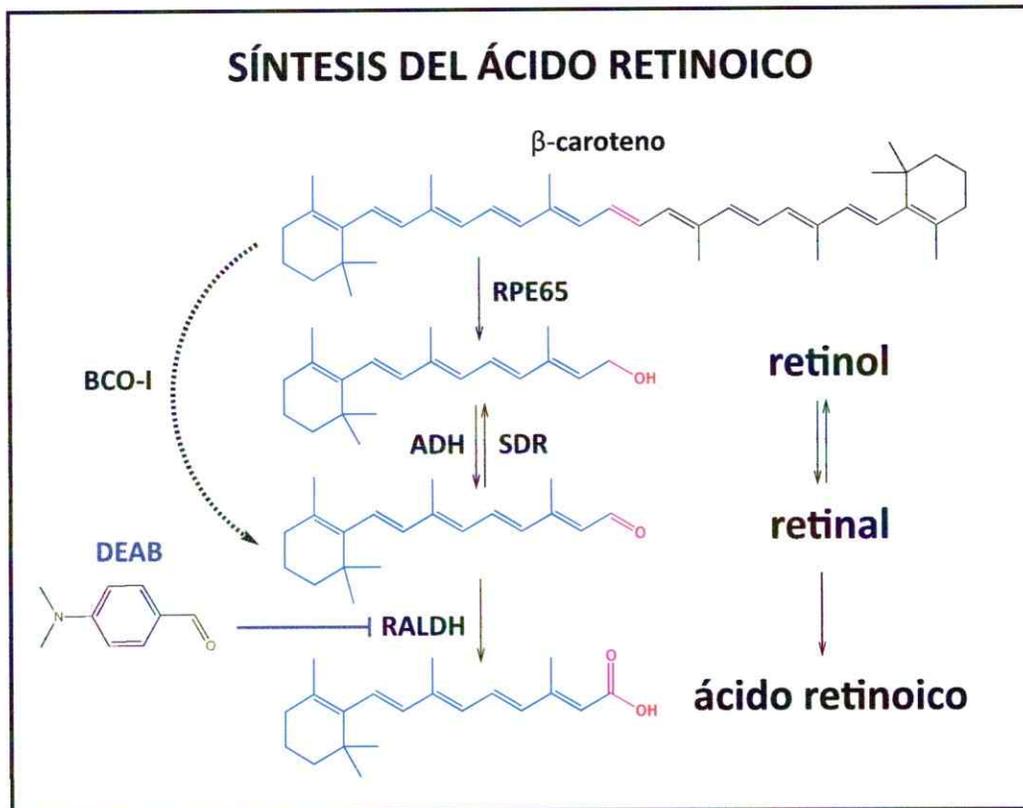


Figura 2. Síntesis del ácido retinoico a partir de sus precursores.

El esquema muestra una simplificación de las vías de síntesis del ácido retinoico actualmente descritas. El **retinol**, es oxidado de manera reversible a una molécula de **retinal** por las enzimas alcohol deshidrogenasas (**ADH**). A su vez, el **retinal** puede ser reducido a **retinol** por las enzimas **SDR** (*short-chain dehydrogenase/reductase*). En una segunda etapa irreversible, el **retinal** es oxidado por las enzimas retinal deshidrogenasas (**RALDH**), dando como resultado una molécula de **ácido retinoico**. Alternativamente, el **ácido retinoico** puede ser producido a partir de **β-caroteno** por la acción de la enzima β-β-caroteno-15,15'-oxigenasa (**BCO-I**), o por la enzima **RPE65** (Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein). El dietil-aminobenzaldeído (**DEAB**), es un potente inhibidor competitivo de las enzimas RALDH.

En ratón, existen tres isoformas de las enzimas ALDH involucradas en la síntesis del RA: RALDH1, RALDH2 y RALDH3, las cuales son expresadas diferencialmente por ciertos tejidos y células del sistema inmune. Por ejemplo, MLN-DC y LP-DC expresan principalmente la isoforma RALDH2 (codificada por el gen *Aldh1a2*); PP-DC y células epiteliales del intestino delgado expresan RALDH1 (codificada por el gen *Aldh1a1*); mientras que células del estroma de MLN expresan RALDH3 (codificada por el gen *Aldh1a3*) (Iwata 2009; Johansson-Lindbom & Agace 2007). Aún se desconoce el mecanismo involucrado en inducir la expresión diferencial de los genes RALDH en las diferentes poblaciones de DC, pero se cree que el medio ambiente donde se desarrollan estas células sería un factor clave.

1.4 Factores involucrados en la expresión de las enzimas RALDH en DC

Recientemente, se demostró que factores presentes en la mucosa intestinal y en los linfonodos asociados a ella, pueden instruir a las DC confiriéndoles la capacidad de inducir los receptores de *homing* $\alpha 4\beta 7$ y CCR9, así como de promover la diferenciación de LTreg Foxp3⁺ (Dudda y col, 2004; Edele y col, 2008a; Iliiev y col, 2009a; Iliiev y col, 2009b; Liu 2009; Yokota y col, 2009a). Todo lo anterior, residiría en la capacidad de las GALT-DC para producir RA. Por esta razón, es posible proponer que *la expresión de las enzimas RALDH en GALT-DC es consecuencia de uno o varios factores presentes en la mucosa intestinal o en el MLN, ya sea durante la presentación antigénica o durante la diferenciación de las DC, entre los cuales el RA parece ser una de las opciones más atractivas*. Consistente con esta idea, se demostró que los ligandos de PPAR γ , los cuales están presentes principalmente en el intestino, promovían la producción de RA en DC a través del aumento en la expresión de las enzimas ADH y ALDH (Szatmari y col, 2006). Evidencias de nuestro propio laboratorio, demostraron que la IL-4, una citoquina involucrada con la homeostasis de la respuesta inmune

intestinal, aumenta la expresión del mRNA que codifica para la enzima RALDH2 en MLN-DC (*Aldh1a2*), y que esta citoquina sería necesaria *in vivo* para una expresión normal de esta enzima en MLN-DC (Elgueta y col, 2008). Más tarde, y complementario a este trabajo, se demostró que el GM-CSF tiene un efecto sinérgico al de la IL-4, aumentando todavía más la expresión de las enzimas RALDH en DC generadas *in vitro* con la citoquina Flt3L, o purificadas de bazo (Sp-DC) (Yokota y col, 2009a). Ambos estudios sugieren fuertemente que factores solubles presentes en el intestino serían necesarios para la expresión normal de las enzimas RALDH en DC. Sin embargo, en ninguno de ellos se proveen evidencias directas que muestren a los putativos factores moduladores como suficientes para inducir la expresión *in vivo* de estas enzimas. Por otra parte, se reportó que DC porcinas generadas *in vitro* podían “capturar” el RA presente en el medio de cultivo, y luego traspararlo a los LT durante la presentación antigénica, induciendo de esta manera los receptores de *homing* a intestino en los linfocitos (Saurer y col, 2007). Complementario a este grupo de evidencias experimentales, resultados de nuestro laboratorio y del laboratorio del Dr. Rodrigo Mora (Harvard Medical School, Boston-USA), sugieren que el RA también es capaz de aumentar la expresión del mRNA que codifica para la enzima RALDH2 en DC de ratón. Por lo tanto, los efectos que tiene el RA sobre la funcionalidad de las DC son todavía poco claros.

1.5 Vitamina A: captación, almacenamiento y transporte hacia los tejidos

Los compuestos derivados de la vitamina A, denominados en su conjunto como retinoides, juegan un papel importante durante el desarrollo, diferenciación y homeostasis celular de los mamíferos. Se estima que al menos 500 genes son regulados directamente por diferentes tipos de retinoides (Balmer & Blomhoff 2002). La ingesta alimenticia es la vía natural de entrada de estos compuestos, ya sea como vitamina A (retinol), o bien como pro-vitamina A (β -caroteno) (Theodosiou y col, 2010b). En los

enterocitos, los diferentes retinoides son procesados y empacados junto con otros lípidos y proteínas formando unas estructuras denominadas quilomicrones. Estos complejos lipoproteicos difunden a través de la linfa para luego alcanzar la circulación sanguínea, permitiendo así el transporte de los retinoides hacia el hígado. Una vez en este lugar, las células hepáticas estrelladas (HSC) transforman el retinol en su forma de retinil éster, reacción catalizada por la enzima LRAT (lecitin:retinol aciltransferasa). De esta manera, los retinil ésteres son almacenados en el citoplasma de las HSC dentro de unos pseudo-organelos denominadas como “gotas lipídicas” (Blaner y col, 2009). La enzima LRAT, se expresa en una gran variedad de tejidos y tipos celulares. Sin embargo, es detectada en mayores niveles en el ojo, hígado e intestino delgado. Ratones deficientes en LRAT (LRAT^{-/-}) no pueden almacenar los retinoides en el hígado y tienen bajos niveles de retinil ésteres a nivel sistémico. Su fenotipo es muy similar al encontrado en humanos con deficiencia en vitamina A, por lo que se considera como un buen modelo para estudiar los efectos de la deficiencia de vitamina A en mamíferos (O'Byrne y col, 2005). Cabe destacar, que si estos ratones se mantienen en una dieta suplementada con vitamina A, la concentración de retinil ésteres detectado en el suero es muy similar a los niveles normales, evitando así causar una deficiencia crónica de esta vitamina en el animal.

Cuando el retinol es requerido por el resto de los órganos, los retinil ésteres almacenados en las HSC son hidrolizados por la enzima retinil éster hidrolasa (REH). Una vez que el retinol se encuentra en su forma libre en el citoplasma de la célula, este es capturado por la proteína de unión a retinol (RBP), y forma un complejo retinol-RBP que permitirá su posterior difusión a través de la sangre (Blomhoff y col, 1990). Al igual que los ratones LRAT^{-/-}, la carencia de la proteína RBP (RBP^{-/-}) disminuye la concentración de retinoides detectados en el suero (Quadro y col, 2003). A la fecha, el único transportador específico que media la entrada del complejo retinol-RBP hacia el citoplasma de las células, es el receptor denominado STRA6. Este transportador se expresa a nivel de la membrana plasmática de distintos tipos celulares entre los que se

incluyen: células del bazo, órganos reproductores masculino y femenino, timo, corazón, pulmones, epitelio pigmentado de la retina y macrófagos (Kawaguchi y col, 2007). Sin embargo, no existen reportes que describan la expresión de este receptor en DC. Una vez dentro de las células, el retinol es metabolizado por las enzimas ADH y ALDH produciendo el RA, tal y como se describió previamente.

1.6 Receptores de ácido retinoico y señalización en el núcleo

Toda la señalización a nivel génica asociada al metabolismo de la vitamina A, es mediada por la unión del RA a sus receptores nucleares, los que a su vez actúan como factores de transcripción. Existen dos familias de receptores de ácido retinoico descritas en vertebrados, los RARs (*Retinoic Acid Receptors*) y los RXRs (*Retinoids X Receptors*), y cada familia consiste de al menos tres miembros (α , β , γ). Los RARs, pueden unirse a la forma *all-trans* y *9-cis* del RA, en cambio los RXRs tienen una mayor afinidad por la forma *9-cis* del RA (Chambon 2005; Rochette-Egly & Germain 2009; Theodosiou y col, 2010b), siendo la forma *all-trans* la que predomina biológicamente en vertebrados. *La expresión de las diferentes isoformas de los receptores de RA, ha sido estudiada en DC humanas y de ratón (Fritsche y col, 2000; Pino-Lagos y col, 2008a), lo cual sugiere que las GALT-DC, además de producir el RA, serían susceptibles a responder a este metabolito.*

Dada la importancia que tiene el RA en la respuesta inmune, este proyecto de tesis investigó los efectos de esta molécula sobre el fenotipo y funcionalidad de las DC. Para esto, se trabajó con DC de ratón, ya sea generadas *in vitro*, para evaluar directamente los efectos del RA sobre el fenotipo de las DC, como también *in vivo*, para extrapolar alguna de las conclusiones obtenidas.

HIPÓTESIS

En base a los antecedentes antes presentados, se postula la siguiente hipótesis:

“El ácido retinoico modula el fenotipo y función de las células dendríticas. El cual, mediante un mecanismo de retroalimentación positiva, induce las enzimas responsables de su propia síntesis (RALDH)”.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del ácido retinoico sobre la diferenciación y funcionalidad de las células dendríticas de ratón.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estudiar el efecto del RA sobre el fenotipo de DC generadas *in vitro* en presencia de esta molécula.
- 2) Determinar el efecto *-in vitro e in vivo-* del RA sobre la expresión y actividad de las enzimas RALDH en DC de ratón.
- 3) Determinar si DC de ratón diferenciadas *-in vitro e in vivo-* en presencia de RA, inducen los receptores de *homing* a intestino $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en linfocitos T, mediante la producción de RA.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales

Los ratones utilizados en esta tesis se adquirieron en The Jackson Laboratory (USA), o en Taconic Farms, Inc. (USA), y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en el bioterio de la Fundación Ciencia para la Vida, Santiago-Chile, o en el bioterio del Hospital General de Massachusetts (MGH), Boston-USA. Todos los experimentos que involucraron ratones, se realizaron de acuerdo a la normativa de manejo de animales de CONICYT o del MGH, respectivamente.

Ratones C57BL/6 (B6): cepa de ratones de haplotipo b. Estos animales se utilizaron para la generación *in vitro* de DC (BMDC), para la purificación de DC de linfonodos, y para los experimentos de tratamiento oral con RA.

Ratones OT-I/RAG1^{-/-}: cepa de ratones transgénicos de haplotipo b. Estos animales poseen LT CD8⁺ cuyo TCR reconoce exclusivamente un péptido de ocho aminoácidos derivado de la proteína ovoalbúmina de pollo (OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴; SIINFEKL) presentado en una molécula MHC-I de haplotipo b (H-2K^b). Además, son deficientes en el gen *Rag1* (*recombinase reactivating gene 1*), por lo que no desarrollaran linfocitos T o B maduros. Virtualmente todos los LT CD8⁺ periféricos expresan el TCR transgénico. Estos animales se utilizaron para la purificación de LT CD8⁺ de bazo, y posterior co-cultivo con BMDC o DC.

Ratones OT-II/RAG1^{-/-}: cepa de ratones transgénicos de haplotipo b. Estos animales poseen LT CD4⁺ cuyo TCR reconoce exclusivamente un péptido de 17 aminoácidos derivado de la proteína ovoalbúmina de pollo (OVA³²³⁻³³⁹; ISQAVHAAHAEINEAGR), presentado en una molécula MHC-II de haplotipo b (I-Ab). Además, son deficientes en el gen *Rag1*, por lo que no desarrollaran linfocitos T o B maduros. Virtualmente todos los LT CD4⁺ periféricos expresan el TCR transgénico. Estos animales se utilizaron para la purificación de LT CD4⁺ de bazo, y posterior co-cultivo con BMDC.

Ratones OT-II: cepa de ratones transgénicos de haplotipo b, que posee LT CD4⁺ cuyo TCR reconoce exclusivamente un péptido de 17 aminoácidos derivado de la proteína ovoalbúmina de pollo (OVA³²³⁻³³⁹; ISQAVHAAHAEINEAGR), presentado en una molécula MHC-II de haplotipo b (I-Ab). Estos animales se utilizaron para la purificación de timocitos CD4⁺, y posterior co-cultivo con BMDC.

Ratones LRAT^{-/-}: cepa de ratones de haplotipo b, deficientes en la enzima LRAT. Estos animales fueron donados por el Dr. William S. Blaner (Columbia University, Nueva York-USA) como parte de una colaboración con el laboratorio del Dr. Rodrigo Mora. Cuando estos animales se alimentan con una dieta deficiente en vitamina A (VAD) por 1-2 meses, los niveles de retinoides son casi indetectables en todos los tejidos (≈ 0).

2.2 Reactivos y medios de cultivo:

Para la generación *in vitro* de las DC (BMDC), se usó el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos recombinante de ratón (rmGM-CSF; BD Pharmingen™) a una concentración final de 10 ng/mL en medio RPMI 1640 (GIBCO®) suplementado con 10% de suero fetal de bovino inactivado por calor (FBS; Hyclone-Thermo SCIENTIFIC). El medio de diferenciación de las BMDC se suplementó con diferentes concentraciones de ácido all-*trans* retinoico (RA) ($\geq 98\%$ HPLC; Sigma-Aldrich) de acuerdo al tipo de experimento (ver leyenda de figura para más detalles). El stock de RA se preparó con etanol absoluto ($\geq 99\%$; Sigma-Aldrich) a una concentración final de 2 mM, y se guardó a -80°C . Las diluciones se realizaron directamente en el medio de cultivo correspondiente. Como control del solvente se usó etanol absoluto, agregando un volumen idéntico al de RA usado.

Para la activación antígeno específica de los LT CD4⁺ o CD8⁺, se usaron los péptidos OVA: ISQAVHAAHAEINEAGR o SIINFEKL, respectivamente, ambos de la compañía New England Peptide (USA). Se utilizó una concentración de 2,5 μM de péptido OVA para la mayoría de los experimentos, a menos que se indique otra cosa. El medio utilizado para los co-cultivos de DC y LT fue: IMDM + 10% FBS +

2-mercaptoetanol (2-ME) 50 μ M + penicilina 20 U/mL + estreptomicina 20 μ g/mL (ambos de GIBCO®).

2.3 Generación *in vitro* de células dendríticas de médula ósea (BMDC)

Las BMDC se generaron de acuerdo al protocolo original descrito por Inaba y col. con ciertas modificaciones (Inaba y col, 1992b; Sauma y col, 2004), Brevemente, células de la médula ósea de los huesos largos de las patas traseras de ratones B6 se cultivaron en medio RPMI + 10% FBS + rmGM-CSF [10 ng/mL] a una densidad de 10^6 células/mL en placas de 24 pocillos (p24). Al segundo y cuarto día, se reemplazaron 800 μ L de medio por 1 mL de medio fresco suplementado o no con RA (0,01-1000 nM final), o con etanol absoluto como control del solvente. Al sexto día de cultivo, las DC se purificaron mediante selección inmunomagnética utilizando MACS® CD11c y columnas de selección positiva de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec).

2.4 Expansión *in vivo* y aislamiento de las células dendríticas

Para aumentar el número de DC en los ratones, se utilizó el protocolo descrito por Mora y cols. (2003). Brevemente, ratones B6 se inyectaron subcutáneamente con 10^7 células del melanoma murino B16 secretoras de la citoquina Flt3L. Después de 12-15 días, los ratones se sacrificaron y los linfonodos se digirieron enzimáticamente con liberasa CI [250 μ g/mL] y DNAsa-I [50 μ g/mL] (Roche) en medio de cultivo IMDM (sin aditivos) por 40 minutos (min) a 37°C. Finalmente, las DC se purificaron inmunomagnéticamente mediante MACS® CD11c (Miltenyi Biotec).

2.5 Purificación inmunomagnética de las células dendríticas

Las BMDC se recuperaron mediante pipeteo y se lavaron con tampón MACS® (T-MACS; PBS + EDTA [2 mM] + 5% FBS). Luego, las células se incubaron por 20 min a 4°C en T-MACS + 30 μ L de microesferas MACS® CD11c por cada 50×10^6 de células totales. Al final de la incubación, las células se lavaron con T-MACS y se continuó de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando columnas de selección positiva LS (Miltenyi Biotec).

2.6 Activación de las BMDC

Para inducir la maduración de las BMDC, se utilizó lipopolisacárido (LPS) (*Escherichia coli*, serotipo 055:B5, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 100 ng/mL en RPMI + 10% FBS por 24 horas a 37°C en placas p24 a una concentración de 10⁶ células/mL.

2.7 Detección de citoquinas intracelulares en BMDC

Para la determinar la producción de citoquinas intracelularmente en BMDC [IL-6, IL-10, IL-12(p40/p70) y p40(IL-12/IL-23)], se utilizó el kit Cytofix/Cytoperm™ de la compañía Beckton & Dickinson. Brevemente, las BMDC se activaron por 4 horas a 37°C con LPS [100 ng/mL] o con Pam₃CSK₄ [1 µg/mL]) en medio RPMI + 10% FBS en presencia de golgi-stop™ (inhibidor del aparato de Golgi). El marcaje intracelular se continuó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Beckton & Dickinson).

2.8 Tratamiento oral con RA

Los animales se alimentaron por vía oral durante 5 días seguidos con 200 µL de una solución de RA [2 mg/mL] preparada en aceite de oliva virgen. Brevemente, el RA (50 mg) se disolvió en 500 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich), y luego se agregaron 24,5 mL de aceite de oliva virgen (Sigma-Aldrich). Como control de este experimento, los animales se alimentaron con 200 µL de aceite de oliva virgen. Al día siguiente de finalizado el tratamiento, se disecaron los diferentes linfonodos para su posterior análisis.

2.9 Inmunofenotipo y citometría de flujo (FACS)

Para el marcaje de las células con anticuerpos, se usó medio IMDM (GIBCO®) + 2% FBS + EDTA [2 mM, pH= 8,0; Sima-Aldrich]. Brevemente, las células se incubaron en oscuridad con las distintas mezclas de anticuerpos por 20 min a 4°C. Luego, las células se lavaron una vez y se resuspendieron en PBS + 2% FBS para su posterior adquisición mediante FACS (FACSCanto™ II o FACScalibur™) Para el análisis de los datos se utilizaron los programas Cell Quest (BD Biosciences) o FlowJo.

2.10 Anticuerpos y reactivos para citometría de flujo

Anticuerpos adquiridos a BD Pharmingen™: CD11c (HL3); CD80 (16-10A1); CD86 (GL1); I-A/I-E (M5/114.15.2); IAb (25-9-17); CD40 (3/23); B220 (RA 3-6B2); CD4 (RM 4-5); CD8 α (53-6.7); IFN- γ (XMG1.2); IL-10 (JES5-16E3); IL-12(p40/p70) (C15.6); LPAM-1 (*integrin α 4 β 7 complex*, DAKT32). Anticuerpos adquiridos a eBioscience: CD103 (M290); CCR9 (CD199/eBioCW); p40(IL-12/IL-23) (C17.8); IL-6 (MP5-20F3).

Para determinar la viabilidad de las células por citometría, se utilizó el marcador de apoptosis anexina V y el reactivo 7-AAD (ambos de BD Pharmingen™). En algunos casos se usó también yoduro de propidio (PI, Sigma-Aldrich) según las recomendaciones del fabricante.

2.11 Ensayo funcional de la actividad RALDH (*Aldefluor*®)

El ensayo de Aldefluor® (StemCell Technologies) está diseñado para la identificación de células con actividad enzimática aldehído deshidrogenasa (ALDH⁺) mediante FACS (Hess y col, 2004). Recientemente, se usó para la identificación de DC RALDH⁺ (Schulz y col, 2009; Yokota y col, 2009c). Brevemente, las células se incubaron por 15-30 min a 37°C en presencia del reactivo Aldefluor®, y luego se lavaron con el tampón provisto por el fabricante. La adición de 4-dietil-aminobenzaldeído (DEAB) durante el ensayo, el cual es un inhibidor competitivo de las enzimas ALDH (Mahmoud y col, 1993; Russo y col, 1988), se usó como control para distinguir con precisión la población de células con actividad ALDH (Alde⁺), de las células con baja o sin actividad ALDH (Alde⁻).

2.12 Separación de células dendríticas Alde⁺ y Alde⁻ mediante *cell sorting*

La fracción de DC CD11c⁺ fue enriquecida mediante inmunoselección magnética positiva (Miltenyi Biotec) a partir de MLN de ratones B6 ($n=5$). Luego, se realizó el ensayo de Aldefluor®, tal y como se describió previamente (sección 2.11). Las DC fueron marcadas con los anticuerpos CD11c (PECy5.5) y CD103 (APC) por 15 min a 4°C en el tampón del ensayo de Aldefluor® según las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, las fracciones CD103⁺Alde⁻ y CD103⁺Alde⁺ se separaron utilizando un *cell sorter* de tres láseres FACS AriaII perteneciente al Hospital General de Massachussets (Boston-USA).

2.13 Extracción de RNA y síntesis de cDNA para PCR en tiempo real

Para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA, se usaron el RNeasy Mini Kit (QIAGEN) y el iScript cDNA synthesis kit (BIO-RAD Laboratories), respectivamente. Ambos siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.14 PCR en tiempo real (qPCR)

Para evaluar la expresión del mRNA de las diferentes isoformas de los genes RALDH (*Aldh*), se utilizaron sondas TaqMan (*Aldh1a1* (Mm00657317_m1), *Aldh1a2* (Mm00501306_m1), *Aldh1a3* (Mm00474049_m1); Applied Biosystems), las cuales fueron previamente validadas para su uso en qPCR. Para la cuantificación relativa de los transcritos se utilizó el método comparativo de los Ct, usando la expresión del gen β -*actina* para su normalización (*Actinb* (4352933)).

2.15 Purificación de linfocitos T

Los LT vírgenes se purificaron mediante inmunoselección positiva (Miltenyi biotec) a partir del bazo de ratones OT-I/*RAG1*^{-/-} u OT-II/*RAG1*^{-/-}. Para esto, esplenocitos totales depletados de glóbulos rojos, se incubaron por 15 min a 4°C con microesferas MACS® anti-CD8 (#130-045-201) o anti-CD4 (#130-091-894), según corresponda. Posteriormente, las células se lavaron con T-MACS y se separaron utilizando columnas de selección positiva LS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). En algunos experimentos, se usaron como fuente de LT CD4⁺ vírgenes, timocitos de ratones OT-II depletados de células presentadoras. Brevemente, el timo de ratones B6 se disgregó mecánicamente y luego los timocitos se incubaron con el anticuerpo rat anti-mouse I-Ab por 30 min a 4°C. Luego, se lavaron con T-MACS y se incubaron con microesferas MACS® anti-rat IgG [#130-048-502] por 10

min a 4°C. Para la separación de los timocitos, se utilizaron columnas de selección negativa LD siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec).

2.16 Co-cultivos de células dendríticas y linfocitos T

Las DC (0.2×10^5 células/mL) y los LT (1×10^5 células/mL) se co-cultivaron a una razón de 1:5 en medio IMDM + 10% FBS suplementado con 50 μ M de 2-ME, 50 μ g/mL de gentamicina y 0.5 mg/mL de anfotericina-B (Fungizona®) a 37°C y 5% de CO₂. Para la activación de los LT CD8⁺ OT-I/RAG1^{-/-} se usó el péptido OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴ (SIINFEKL), y para los LT CD4⁺ OT-II/RAG1^{-/-} el péptido OVA³²³⁻³³⁹ (ISQAVHAAHAEINEAGR) comprados a la compañía New England Peptide™ (USA). Luego de 5 días de cultivo, las células se recuperaron para el análisis por FACS.

2.17 Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron usando el programa GraphPad Prism 5.0a, y son presentados como el promedio \pm SEM. Para comparar dos grupos, se usó el test estadístico *t* de *student*. Y para comparar 3 o más grupos, se usó el test ANOVA. Los resultados se consideraron como estadísticamente significativos cuando el *P value* fue < 0.05.

3. RESULTADOS

3.1 El ácido *all-trans* retinoico inhibe la expresión de MHC-II, CD80 y CD86 en células dendríticas de ratón generadas *in vitro* con GM-CSF

Puesto que el objetivo principal de este trabajo fue el de evaluar los efectos que tiene el RA sobre la funcionalidad de las DC, pero dado que existen reportes en la literatura en los cuales el RA parece afectar la expresión de ciertos marcadores en las DC humanas, decidimos evaluar primero, si este fenómeno también ocurría en DC de ratón. Para esto, células de médula ósea de ratones B6 se cultivaron con rmGM-CSF [10 ng/mL], sin o con diferentes concentraciones de RA. Al final del cultivo, se analizó el fenotipo de las DC mediante FACS. Únicamente se observó una disminución en la viabilidad de las células cuando se usaron concentraciones mayores a 100 nM de RA (500-1000 nM de RA, datos no mostrados). Por esta razón, todos los experimentos siguientes se realizaron en un rango de concentraciones considerado como fisiológico [1-100 nM de RA] (Iwata 2009; Kane y col, 2008; Theodosiou y col, 2010a; Wang y col, 2010). Al día 6 de cultivo y previo a la purificación de las DC, se obtuvo aproximadamente un 60% de células CD11c⁺ tanto en la condición control (etanol) como en la condición con RA (Fig. 3A). Además, la viabilidad celular (evaluada mediante el marcaje con anexina V y el reactivo 7-AAD), no mostró diferencias significativas en los cultivos tratados con RA con respecto al control. Sin embargo, en las células tratadas con RA, se observó una leve tendencia a disminuir el porcentaje de células anexina V⁺ y 7-AAD⁺ (Fig. 3B).

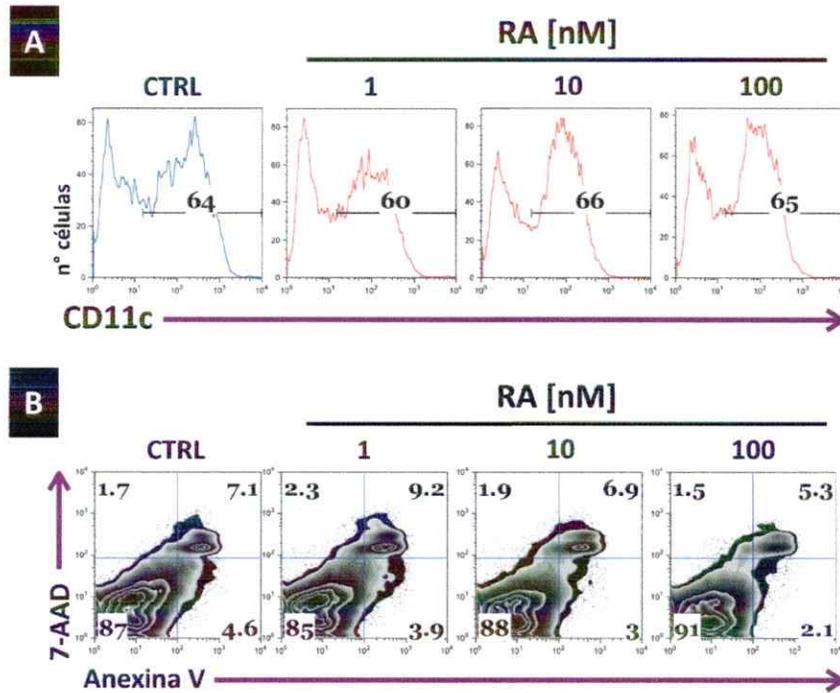


Figura 3. Concentraciones fisiológicas de RA no afectan la generación *in vitro* de DC. Las BMDC fueron generadas a partir de células de médula ósea de ratones B6 cultivadas por 6 días con rmGM-CSF [10 ng/mL] en ausencia (CTRL), o presencia de diferentes concentraciones de RA. Al final del cultivo y previo a la purificación de las DC, se evaluó la expresión del marcador CD11c por FACS. **(A)** histogramas representativos del porcentaje de células CD11c obtenidas bajo las diferentes condiciones de cultivo ($n=5$). **(B)** gráficos representativos del análisis de viabilidad de los cultivos de BMDC ($n=5$).

Interesantemente, las DC generadas en presencia de RA (BMDC^{RA}) mostraron un fenotipo más inmaduro que la condición control (BMDC^{CTRL}), encontrándose un menor porcentaje de células CD11c⁺ que expresaban los marcadores clásicos de maduración de DC: MHC-II, CD80 y CD86 (Fig. 4A). Este cambio en el fenotipo se mantuvo cuando las DC fueron generadas en presencia de 1, 10 ó 100 nM de RA (Fig. 4B). Concentraciones menores a 1 nM de RA no tuvieron efecto sobre estos marcadores (datos no mostrados). Cabe destacar que la expresión de otros marcadores fenotípicos no relacionados con el grado de maduración de las DC, tales como PD-L1 y PD-L2, no cambiaron por la adición de RA durante el cultivo (el 100% de las células CD11c⁺ co-expresaron el marcador PD-L1, y aproximadamente un 40% el marcador PD-L2; datos no mostrados), lo que sugiere un efecto inhibitorio específico del RA sobre la expresión de los marcadores de maduración en las DC.

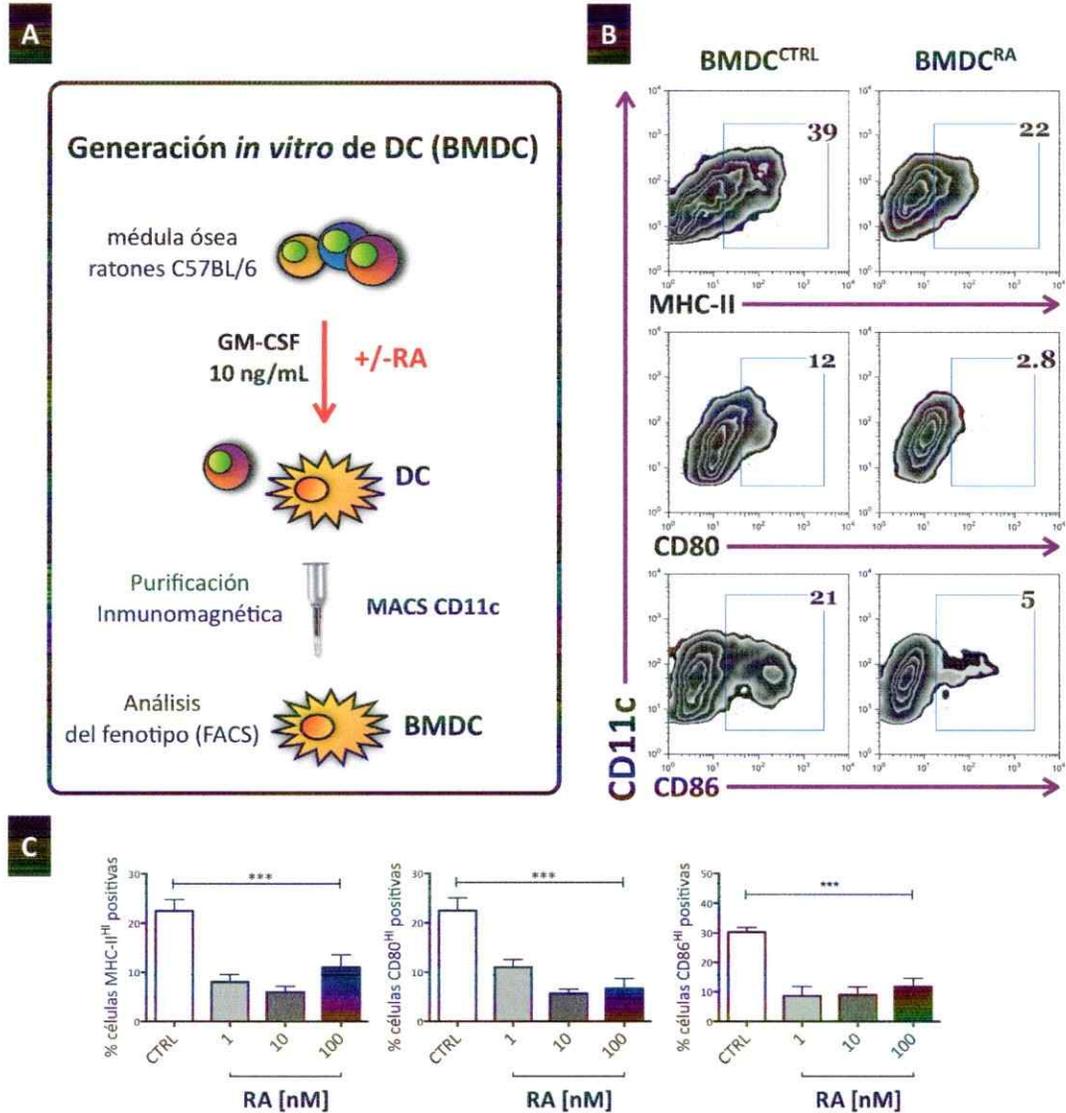


Figura 4. El RA inhibe la expresión de MHC-II, CD80 y CD86 en BMDC.

(A) BMDC generadas en ausencia (BMDC^{CTRL}) o presencia de 100 nM de RA (BMDC^{RA}) fueron purificadas mediante selección positiva (MACS® CD11c), y luego se analizó la expresión de MHC-II, CD80 y CD86 por FACS. (B) gráficos representativos del fenotipo de las BMDC luego de la purificación. (C) cuantificación de los resultados mostrados en (B), en donde se graficó el porcentaje de DC de mayor intensidad de fluorescencia para los distintos marcadores analizados ($n=5$). El análisis estadístico se realizó mediante el test de ANOVA, y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el *P value* fue < 0.05.

3.2 Células dendríticas de ratón generadas *in vitro* en presencia de ácido *all-trans* retinoico y tratadas con estímulos derivados de patógenos mantienen un fenotipo inmaduro

Las DC del intestino delgado se encuentran constantemente expuestas a diferentes agentes patogénicos derivados de bacterias. Estos estímulos modulan las propiedades funcionales de las DC induciendo cambios en el estado de maduración de ellas. En particular, el reconocimiento del LPS bacteriano por el receptor TLR-4, aumenta la expresión de las moléculas MHC-II, CD80 y CD86, e induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-1, IL-6, e IL-12 en DC. Teniendo en cuenta que el RA generó DC con una baja expresión de los marcadores de maduración analizados (Fig. 4), se evaluó entonces si este fenotipo se mantendría luego de activar las células con LPS. Para esto, las DC generadas en ausencia o presencia de RA [100 nM] se incubaron por 24 horas con LPS [100 ng/mL], y luego se analizó su fenotipo por FACS. Como se esperaba, las BMDC^{CTRL} mostraron un aumento de expresión en los marcadores de maduración analizados, evidenciado por un aumento en el porcentaje e intensidad media de fluorescencia de las poblaciones MHC-II⁺, CD80⁺ y CD86⁺ -consideradas como DC maduras- (Fig. 5B). Sorprendentemente, las BMDC^{RA} estimuladas con LPS mantuvieron el fenotipo inmaduro encontrado anteriormente (Fig. 4). Similares resultados se obtuvieron cuando se utilizó toxina del cólera para madurar a las DC (datos no mostrados), el cual es un estímulo patogénico independiente del receptor TLR-4. Estos resultados, sugieren que el RA favorece la generación de DC con un fenotipo inmaduro, el cual se mantiene luego de la activación de las DC.

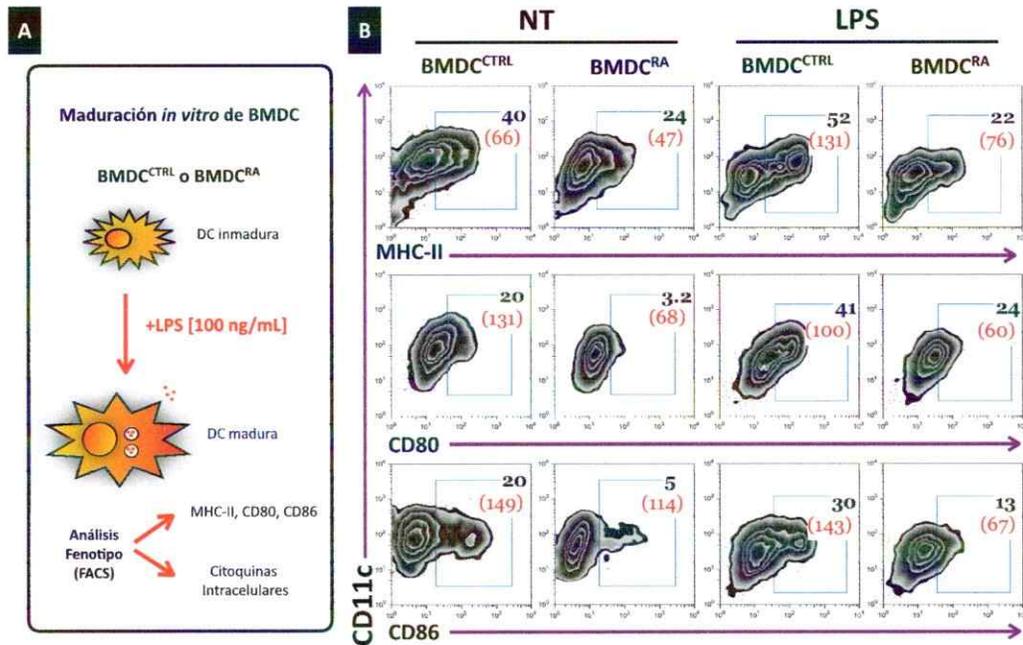


Figura 5. BMDC generadas en presencia de RA son resistentes a la maduración.

(A) BMDC^{CTRL} o BMDC^{RA} fueron incubadas por 24 horas sin (NT= no tratadas), o con LPS [100 ng/mL], y luego su fenotipo se analizó por FACS. (B) gráficos representativos del fenotipo de las BMDC^{CTRL} o BMDC^{RA} tratadas o no con LPS. Los valores en negro y rojo, corresponden al porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia de los marcadores analizados, respectivamente. Estos resultados corresponden a un ejemplo representativo de al menos 3 experimentos independientes realizados.

3.3 Células dendríticas de ratón generadas *in vitro* en presencia de ácido all-*trans* retinoico, no producen IL-12 ni IL-10, pero sí IL-6 en respuesta a estímulos derivados de patógenos

Otra de las consecuencias de la activación de las DC por estímulos patogénicos, es la producción de diversas citoquinas pro-inflamatorias las cuales están involucradas en la polarización de la respuesta inmune adquirida. Al evaluar en condiciones basales la expresión intracelular de IL-12(p40/p70) (IL-12) en las BMDC, un mayor porcentaje de las BMDC^{CTRL} produjo esta citoquina en comparación a las BMDC^{RA} -8% v/s 2%- (Fig. 6A, NT). Luego de 5 horas de incubar las BMDC con LPS [100 ng/mL], se observó un considerable aumento en el porcentaje de la población de BMDC^{CTRL} IL-12⁺. Por el contrario, las BMDC^{RA} no produjeron esta citoquina, encontrándose un porcentaje muy similar a la condición basal (Fig. 6, LPS). Las diferencias observadas, fueron estadísticamente significativas (Fig. 6B).

Similar a lo observado con la expresión de la IL-12, un menor porcentaje de BMDC^{RA} produjeron la subunidad p40 de las citoquinas IL-12 e IL-23, luego del tratamiento con LPS, o con el agonista del receptor TLR-1/2, Pam₃CSK₄ (Fig. 7A). Sin embargo, un porcentaje mayor de BMDC^{RA} produjo la citoquina IL-6 en comparación con las BMDC^{CTRL} (Fig. 7B), sugiriendo que el RA no tiene un efecto inhibitorio generalizado sobre la producción de todas las citoquinas pro-inflamatorias. Por otra parte, la expresión intracelular de IL-10 no fue detectada bajo ninguna de las condiciones estudiadas.

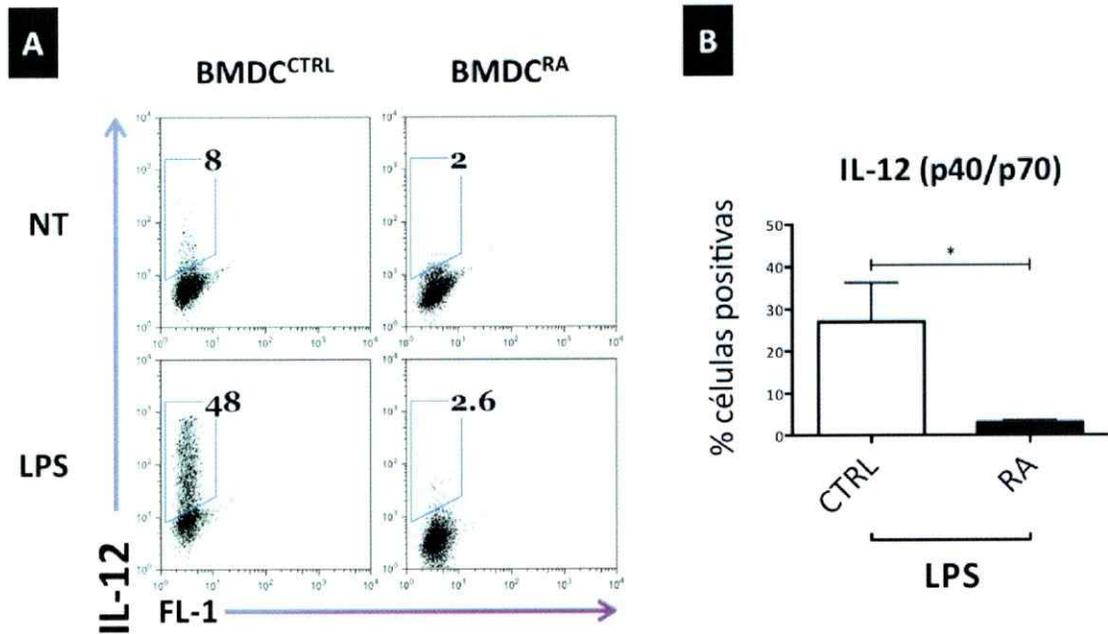


Figura 6. BMDC generadas en presencia de RA no producen IL-12 en respuesta a LPS.

(A) Se analizó la expresión intracelular de la citoquina IL-12 (p40/p70) por FACS en las BMDC^{CTRL} o BMDC^{RA} [100 nM] incubadas o no (NT: células no tratadas) por 5 horas con LPS [100 ng/mL].

(B) cuantificación de los resultados mostrados en (A) ($n=5$). El análisis estadístico se realizó mediante el test de *student*. P value < 0.05.

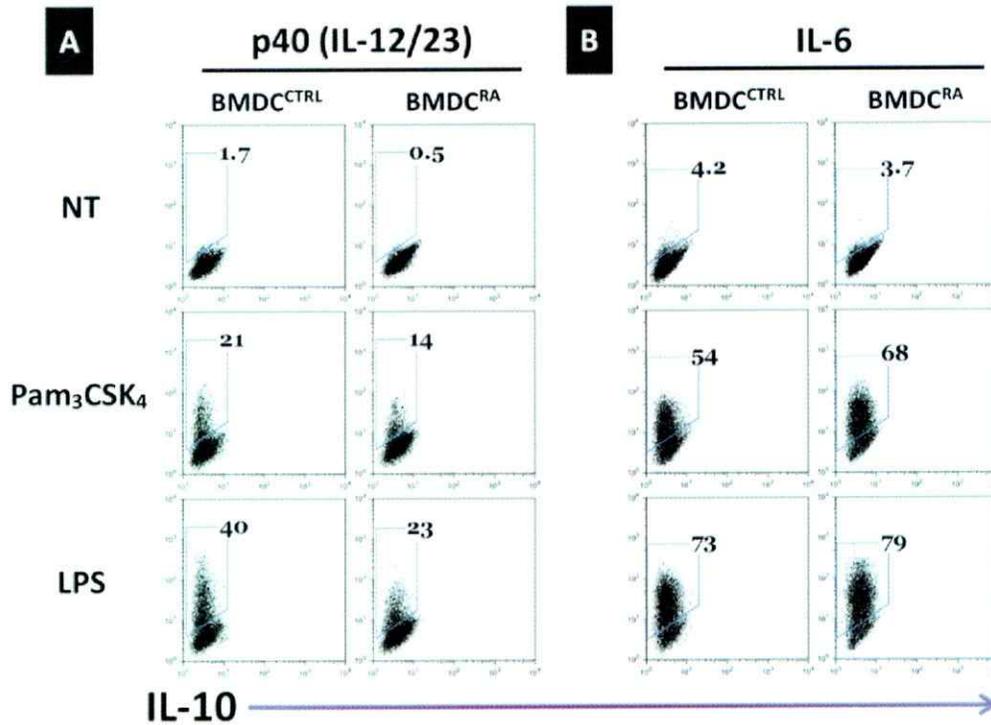


Figura 7. El RA favorece la generación de BMDC productoras de IL-6.

La expresión de la subunidad p40 (IL-12/IL-23) (A), o de la citoquina IL-6 (B) fue analizada intracelularmente por FACS en las BMDC^{CTRL} o BMDC^{RA} [100 nM] activadas por 5 horas con Pam₃CSK₄ [1 µg/mL] o LPS [100ng/mL]. NT: células no tratadas. Estos resultados corresponden a un ejemplo representativo de 2 experimentos independientes realizados.

En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que el RA modula el fenotipo y función de las DC modificando no sólo la expresión de moléculas involucradas en la presentación antigénica (tales como MHC-II, CD80 y CD86), sino que además a través del patrón de citoquinas que ellas producirían en respuesta a diferentes estímulos patogénicos.

3.4 El ácido all-*trans* retinoico induce la expresión de la enzima RALDH2 en células dendríticas de ratón

Luego de determinar la influencia del RA sobre el fenotipo de las BMDC, se evaluó si la expresión de las enzimas RALDH también podría ser modificada en estas células. Con este fin, se evaluó la expresión de los genes RALDH (*Aldh*) en DC generadas en ausencia o presencia de RA. Las BMDC generadas en presencia de 10 ó 100 nM de RA (BMDC^{RA}), mostraron un significativo aumento en la expresión del mRNA *Aldh1a2* en comparación a la condición control (Fig. 8A). En cambio, la expresión de las isoformas *Aldh1a1* y *Aldh1a3* no fueron detectadas en ninguna de las condiciones experimentales evaluadas (Figs. 8B y C).

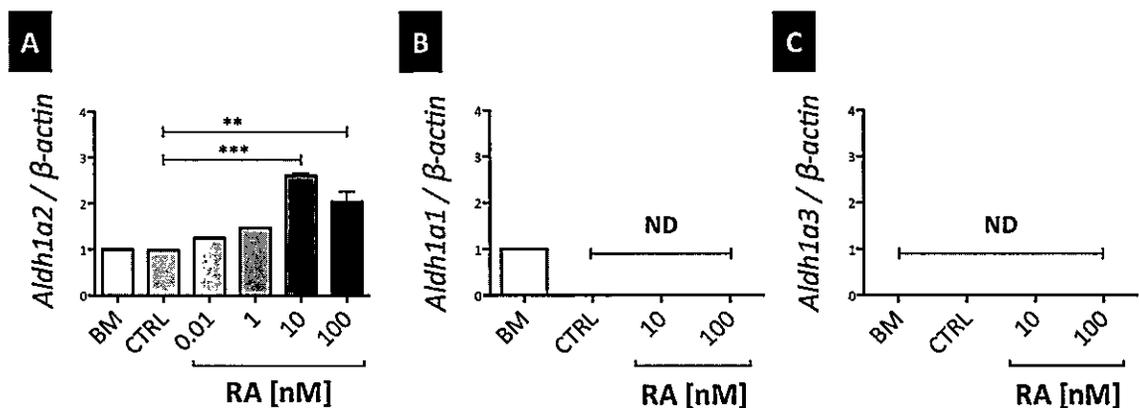


Figura 8. El RA aumenta la expresión del mRNA *Aldh1a2* en BMDC.

La expresión del mRNA *Aldh1a2* (A), *Aldh1a1* (B), o *Aldh1a3* (C) fue evaluada mediante qPCR en BMDC^{CTRL} o BMDC^{RA} ($n=3$). BM: Bone Marrow, células de médula ósea; ND: No detectado. El análisis estadístico se realizó mediante el test de ANOVA, y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el P value fue < 0.05 .

Luego de haber demostrado que el RA induce positivamente la expresión del gen *Aldh1a2* en las DC generadas *in vitro* (BMDC), se evaluó si esta expresión podría ser inducida también en DC aisladas de diferentes linfonodos secundarios. Para esto, PLN-DC y DC de bazo (Sp-DC), purificadas de ratones inyectados con el melanoma B16-Flt3L, se incubaron por 16 horas en presencia de diferentes concentraciones de RA, y luego la expresión del gen *Aldh1a2* fue evaluada mediante qPCR. Tanto PLN-DC (Fig. 9A) como Sp-DC (Fig. 9B) tratadas con 10 ó 100 nM de RA, expresaron mayores niveles del mRNA *Aldh1a2* en comparación a la condición no tratada (Fig. 9, NT). En algunos experimentos, se observó una similar tendencia para el mRNA *Aldh1a1*, la cual no siempre fue consistente (datos no mostrados). Por otra parte, no se detectó la expresión del gen *Aldh1a3* bajo ninguna de las condiciones experimentales evaluadas (datos no mostrados). Tomando juntos estos resultados, se concluye que el RA es capaz de inducir la expresión del gen *Aldh1a2* tanto durante la diferenciación de las DC (BMDC), así como en DC terminalmente diferenciadas, sugiriendo que la sola presencia de este metabolito en el medio ambiente donde se desarrollan las DC, podría ser un factor directo relacionado con la capacidad de producir RA por estas células.

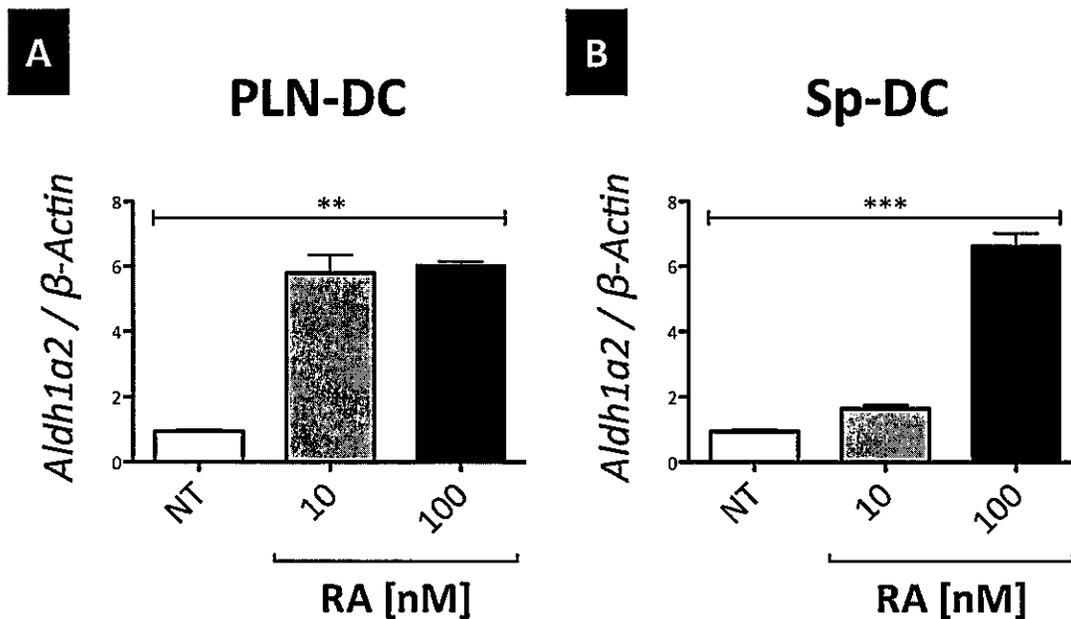


Figura 9. El RA aumenta la expresión del mRNA *Aldh1a2* en PLN-DC y Sp-DC.

Se evaluó la expresión del mRNA *Aldh1a2* mediante qPCR en DC purificadas de PLN (A) o bazo (B), incubadas por 16 horas en medio de cultivo libre de suero suplementado con 10 ó 100 nM de RA ($n=3$). NT: células no tratadas. El análisis estadístico se realizó mediante el test de ANOVA, y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el *P value* fue < 0.05.

3.5 El ácido *all-trans* retinoico aumenta la actividad enzimática RALDH en células dendríticas de ratón

La actividad enzimática RALDH puede ser detectada *in vitro* mediante el ensayo funcional Aldefluor®. Este ensayo se basa en el uso de un sustrato fluorescente el cual, luego de ser específicamente metabolizado por las enzimas RALDH, se acumula en el citoplasma de las células permitiendo su detección por FACS. Por ende, las DC que tiene actividad RALDH (RALDH⁺), son células Aldefluor positivas (Alde⁺) en el citómetro, en cambio las que no presentan actividad (RALDH⁻), son células Aldefluor negativas (Alde⁻).

Ya que el RA indujo un aumento en la expresión del mRNA *Aldh1a2* en DC diferenciadas *in vitro*, se evaluó si este fenómeno se correlacionaba con un aumento en la actividad RALDH. Consistente con los resultados anteriores que muestran un aumento del mRNA que codifica para la enzima RALDH2 (Fig. 8A), BMDC generadas en presencia de RA mostraron un mayor porcentaje de células Alde⁺ con respecto a la condición control (Fig. 10A), lo cual fue estadísticamente significativo cuando se utilizaron 10 ó 100 nM de RA durante el cultivo (Fig. 10B).

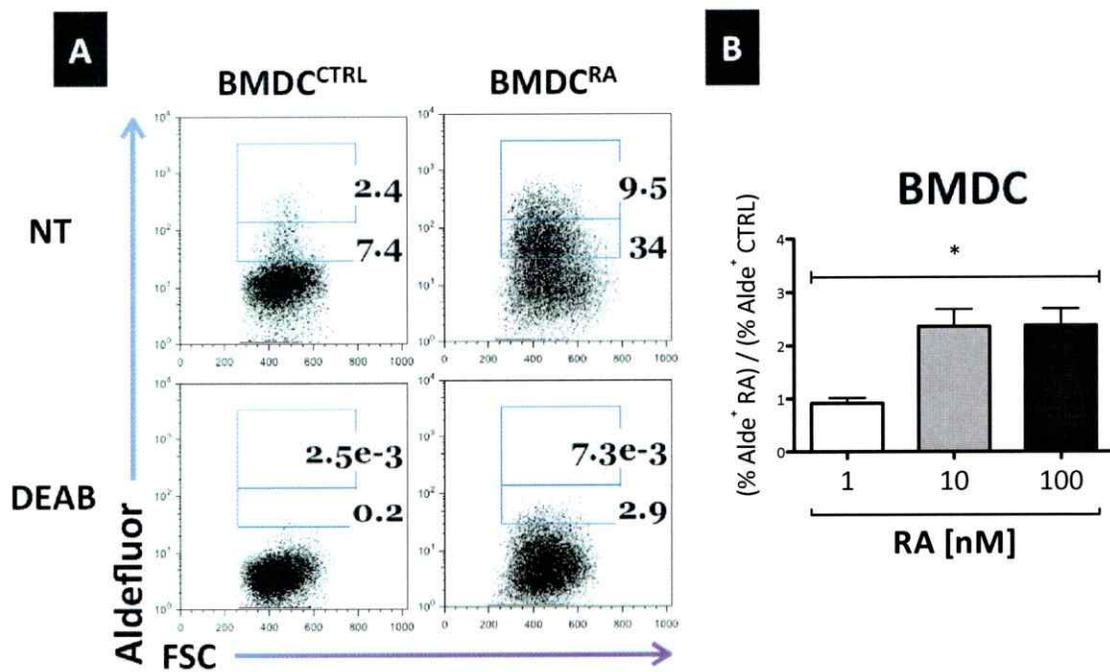


Figura 10. El RA aumenta la actividad RALDH en BMDC.

(A) la actividad RALDH se determinó mediante el ensayo de Aldefluor® en BMDC^{CTRL} o BMDC^{RA}. El reactivo DEAB fue usado como control para identificar la población de células Alde⁺. (B) cuantificación de los resultados mostrados en (A) ($n=3$). El análisis estadístico se realizó mediante el test de ANOVA, y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el P value fue < 0.05.

Luego, se evaluó si el aumento del mRNA *Aldh1a2* encontrado en PLN-DC y Sp-DC tratadas con RA exógeno (Fig. 9), se correlacionaba con un aumento en la actividad RALDH de estas células. Al igual que las BMDC^{RA}, el tratamiento con RA indujo un aumento en el porcentaje de DC Alde⁺ (Fig. 11). Además, y consistente con su reconocida capacidad para sintetizar RA, MLN-DC mostraron un mayor porcentaje de células Alde⁺ que PLN-DC y Sp-DC en condiciones basales (Fig. 11, NT), el cual también aumentó luego de la incubación con RA, indicando que el RA es suficiente, al menos *in vitro*, para inducir la actividad RALDH en las DC de linfonodos secundarios.

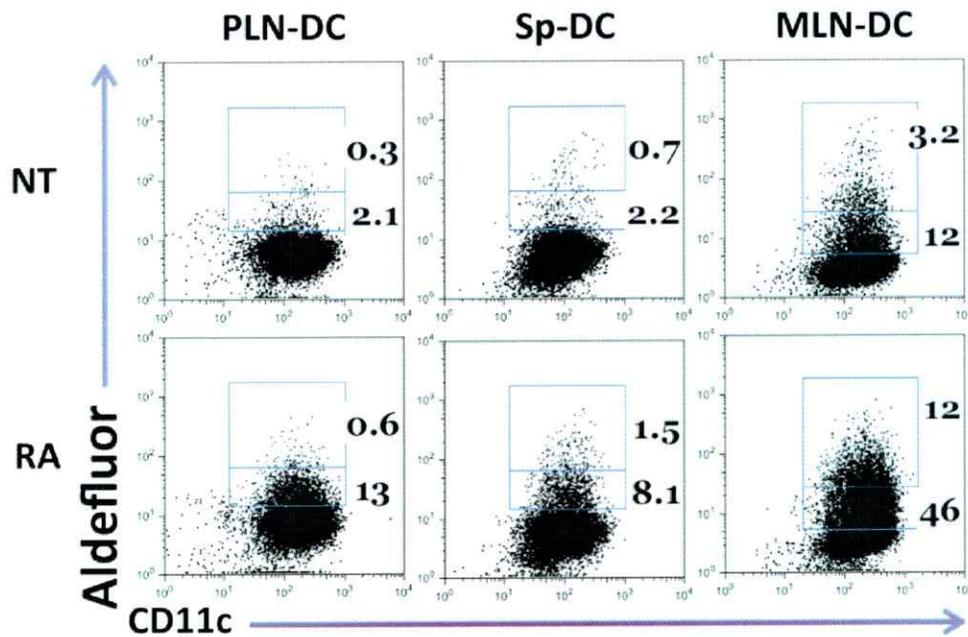


Figura 11. El RA aumenta la actividad RALDH en las DC de linfonodos secundarios.

La actividad RALDH fue determinada mediante el ensayo de Aldefluor® en DC aisladas de PLN, bazo, o MLN incubadas por 16 horas en medio de cultivo libre de suero, suplementado con 100 nM de RA. Las regiones de análisis fueron ajustadas de acuerdo al control con el reactivo DEAB (datos no mostrados). Gráficos representativos de al menos 3 experimentos independientes realizados.

3.6 El tratamiento oral con ácido all-*trans* retinoico aumenta la actividad enzimática RALDH en células dendríticas de ratón de linfonodos subcutáneos

Para evaluar si el RA puede inducir *in vivo*, la expresión de las enzimas RALDH en DC, ratones B6 fueron tratados por 5 días con RA por vía oral (500 $\mu\text{g}/\text{día}$), y luego la actividad de las enzimas RALDH fue ensayada por FACS (ensayo de Aldefluor®). Al igual que en los experimentos *in vitro* (Fig. 11), se observó un aumento en el porcentaje de las células $\text{CD11c}^+\text{Alde}^+$ tanto en PLN (Fig. 12A) como bazo (datos no mostrados) luego del tratamiento oral con RA. Sin embargo, y a diferencia de lo observado anteriormente (Fig. 11), los porcentajes de MLN-DC Alde^+ no variaron después del tratamiento oral con RA (datos no mostrados y Figs. 12B y C).

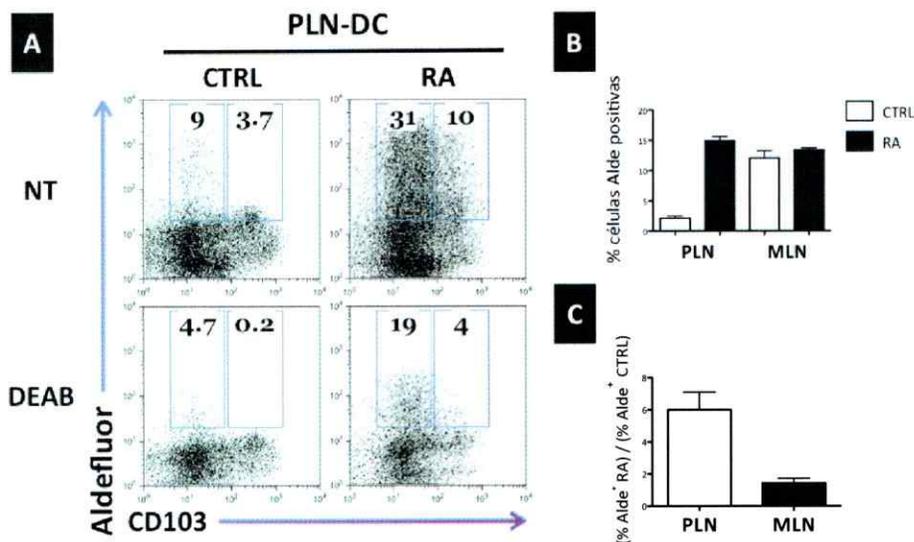


Figura 12. La administración oral de RA es suficiente para inducir la actividad RALDH en PLN-DC.

(A) ratones B6 fueron alimentados por 5 días con RA [500 $\mu\text{g}/\text{dosis}$], o con aceite de oliva virgen (CTRL). Al final de este periodo, se evaluó la actividad RALDH por FACS en DC de diferentes linfonodos. El inhibidor DEAB fue usado como control para identificar la población de células Alde^+ . (B) y (C) cuantificación de los resultados mostrados en (A). En (C) se incluye el porcentaje de DC Alde^+ determinadas en MLN luego del tratamiento con RA ($n=2$). Los gráficos muestran un resultado representativo de 3 experimentos independientes realizados, en el que se combinaron DC aisladas de 2 ratones distintos.

Además, y para complementar los experimentos de ganancia de función realizados previamente (Fig. 12), se usaron ratones con una deficiencia aguda de vitamina A para evaluar esta vez, si la síntesis *in vivo* de RA era necesaria para la expresión normal de las enzimas RALDH en MLN-DC. Sin embargo, debido a que los precursores del RA (retinol y retinil ésteres) son almacenados en el hígado de los ratones, una dieta deficiente en vitamina A no es suficiente para disminuir significativamente los niveles sistémicos de RA. Por esta razón, para estos experimentos se usaron ratones deficientes en la enzima LRAT (LRAT^{-/-}), los cuales tienen una deficiencia en el almacenamiento de retinoides en el hígado. Estos ratones, luego de ser alimentados por 1 ó 2 meses con una dieta deficiente en vitamina A (dieta VAD), presentaron bajos niveles de retinoides en el suero y diferentes tejidos (datos no mostrados). Consistente con un rol fisiológico del RA sobre la expresión génica y actividad de las enzimas RALDH en GALT-DC, las MLN-DC provenientes de los ratones LRAT^{-/-} VAD mostraron una disminución en ambos parámetros con respecto a ratones LRAT^{-/-} mantenidos en una dieta normal (Fig. 13). Importantemente, cuando los ratones LRAT^{-/-} VAD se suplementaron oralmente con RA, el porcentaje de células CD11c⁺Alde⁺ detectadas en MLN y PLN aumentó considerablemente. Llegando incluso a niveles similares a los encontrados en ratones LRAT^{-/-} mantenidos en una dieta control (Figs. 13B y C). Estos resultados demuestran que el RA es necesario y suficiente para la expresión *in vitro* e *in vivo* de las enzimas RALDH en las DC de ratón.

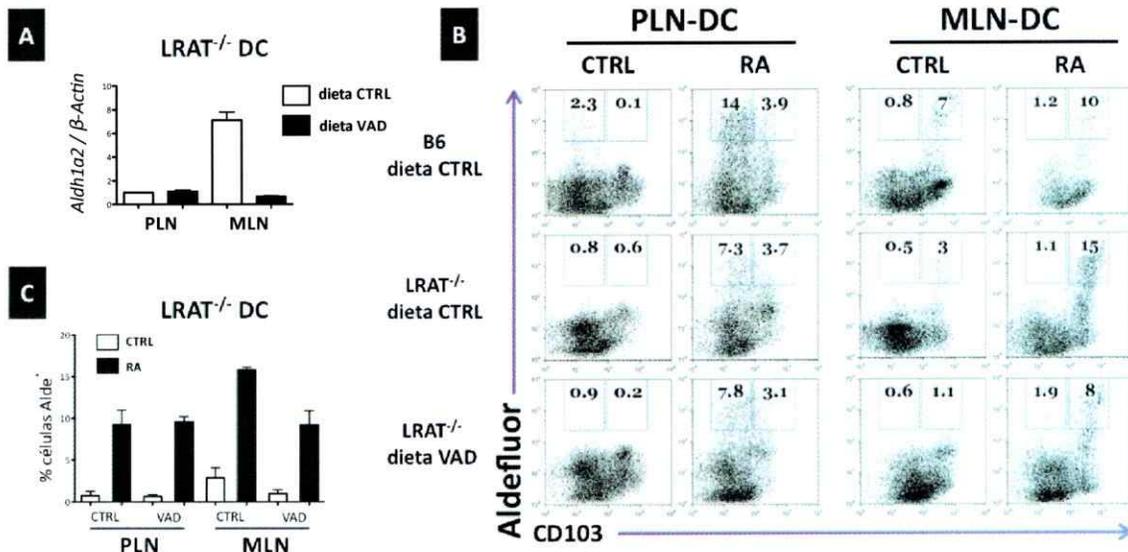


Figura 13. El RA es necesario y suficiente para la expresión *in vivo* de RALDH2 en MLN-DC.

(A) la expresión del mRNA *Aldh1a2* fue evaluada por qPCR en DC de ratones LRAT^{-/-} alimentados por 2 meses con una dieta deficiente en vitamina A (dieta VAD), o con una dieta control (dieta CTRL) ($n=2$). (B) la actividad RALDH fue evaluada por FACS en DC de PLN y MLN aisladas de ratones B6, LRAT^{-/-} (dieta CTRL) o LRAT^{-/-} (dieta VAD), que fueron alimentados por 5 días con RA [500 $\mu\text{g}/\text{dosis}$], o con aceite de oliva virgen (CTRL). Las regiones de análisis fueron ajustadas de acuerdo al control con el inhibidor DEAB (datos no mostrados). (C) cuantificación de los resultados mostrado en (B) ($n=2$). Los gráficos muestran un resultado representativo de 2 experimentos independientes realizados, en el que se combinaron DC aisladas de 2 ratones distintos.

3.7 La actividad enzimática RALDH en células dendríticas se correlaciona directamente con la capacidad para inducir los receptores de *homing* a intestino ($\alpha 4\beta 7$ y CCR9) en linfocitos T

Con el objetivo de correlacionar si las DC Alde⁺ (RALDH⁺) efectivamente producen RA, se evaluó si estas células inducían la expresión de los receptores de *homing* $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en LT, ya que se sabe que esta inducción es dependiente de la producción de RA por parte de las DC (Eksteen y col, 2009). En condiciones no inflamatorias, la expresión del gen *Aldh1a2* esta restringida principalmente a la fracción CD11c⁺CD103⁺ en MLN. Además, esta es la única población de DC que produce RA *in vitro* (del Rio y col, 2010b). Consistente con estas observaciones, la expresión del mRNA *Aldh1a2* fue mayor en las MLN-DC CD103⁺Alde⁺ que en la fracción CD103⁺Alde⁻ (Fig. 14B). Interesantemente, las únicas células que indujeron la expresión de los receptores de *homing* a intestino $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en los LT CD8⁺, fue la población de DC CD103⁺Alde⁺ (Fig. 14C), sugiriendo que la expresión de la integrina CD103⁺, no es un marcador específico de células DC dotadas con la capacidad de producir RA, ya que MLN-DC CD103⁺Alde⁻ no indujeron estos receptores. Esto también ocurrió cuando se usaron LT CD4⁺ (datos no mostrados). Cabe destacar, que la inducción de los receptores de *homing* en los LT CD8⁺ fue totalmente dependiente de la síntesis *de novo* de RA, ya que al utilizar un medio de cultivo libre de retinol (Fig. 15A), o bien al inhibir la actividad de las enzimas RALDH durante el co-cultivo con DEAB (Fig. 15C), este fenómeno no ocurrió. Estos resultados muestran por primera vez que la actividad RALDH (evaluada mediante el ensayo de Aldefluor®) se correlaciona directamente tanto con la expresión del mRNA *Aldh1a2* como también con la capacidad de las MLN-DC de producir RA, determinado por la inducción de receptores de *homing* a intestino en LT.

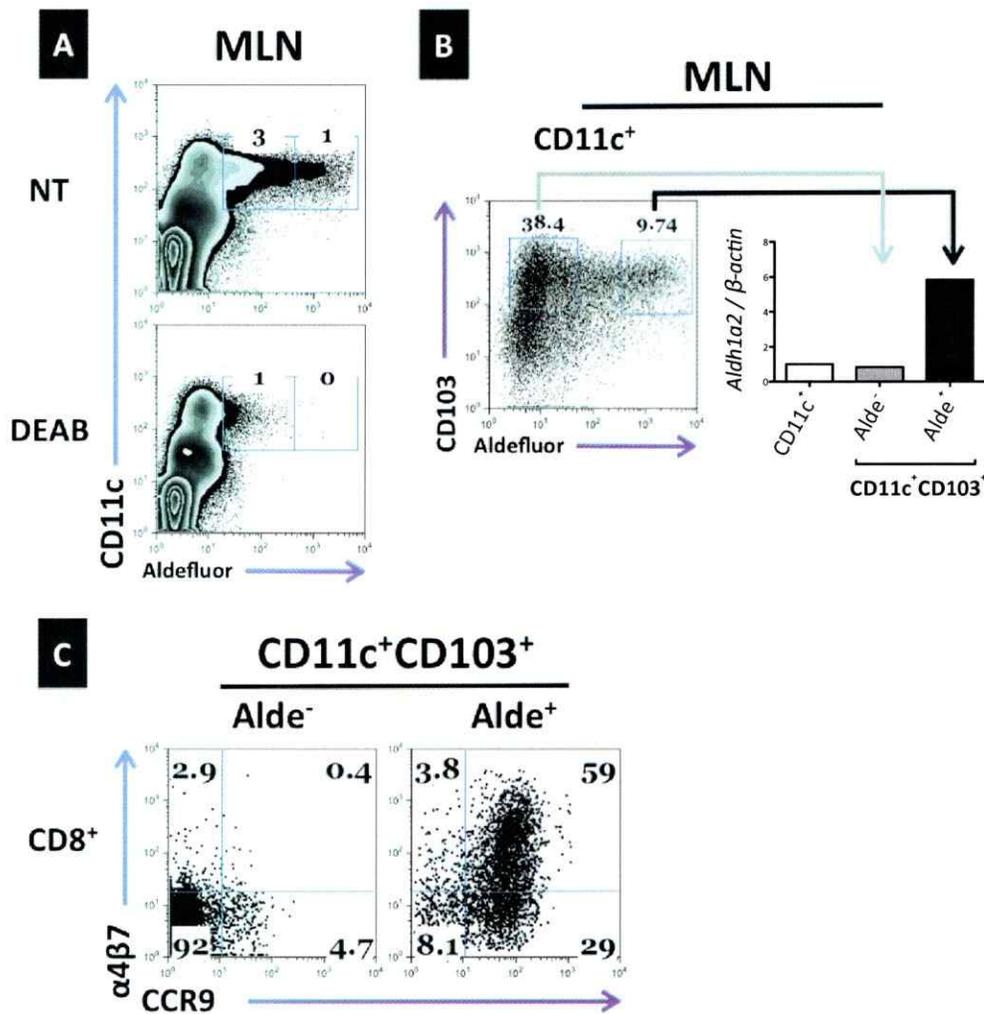


Figura 14. La actividad enzimática RALDH en MLN-DC se correlaciona directamente con la expresión del mRNA *Aldh1a2* y la capacidad para inducir los receptores de *homing* a intestino α 4 β 7 y CCR9 en los LT.

(A) la actividad RALDH fue evaluada en células totales de MLN de ratones B6 mediante el ensayo de Aldefluor®. El inhibidor DEAB se usó como control para identificar la población de células Alde⁺. (B) la población de MLN-DC CD11c^{HI} fue separada mediante *cell sorting* en las fracciones CD103⁺Alde⁻ y CD103⁺Alde⁺, y luego se determinó la expresión del mRNA *Aldh1a2* por qPCR ($n=2$). (C) la producción de RA por las MLN-DC CD103⁺Alde⁻ y CD103⁺Alde⁺, fue evaluada mediante la inducción de α 4 β 7 y CCR9 en LT CD8⁺ luego de 5 días de co-cultivo en un medio libre de suero suplementado con 50 nM de retinol. Las figuras (A) y (B) muestran un experimento representativo en el que se combinaron células de MLN de 5 ratones distintos. En la figura (C), los gráficos muestran un resultado representativo de 3 experimentos independientes realizados.

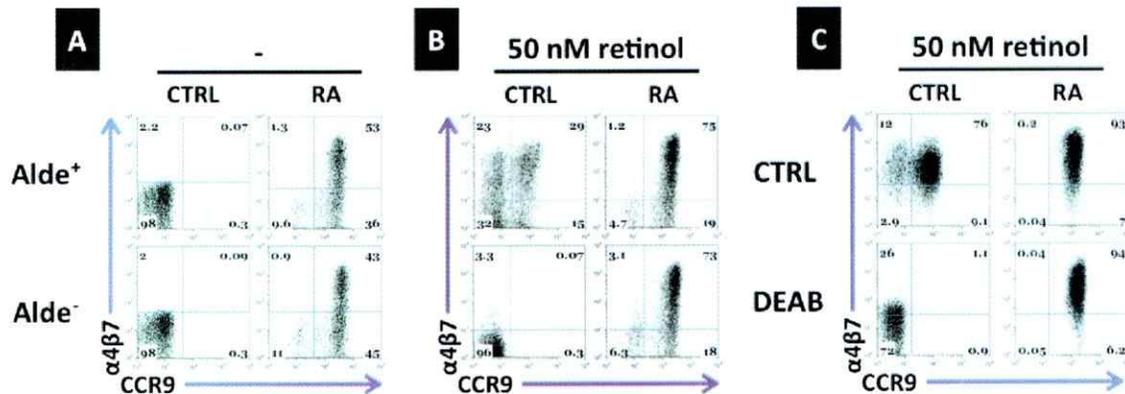


Figura 15. La inducción *in vitro* de los receptores de homing $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en LT, depende de la síntesis *de novo* de RA por parte de las MLN-DC.

MLN-DC CD103⁺Alde⁺ y CD103⁺Alde⁻ fueron co-cultivadas durante 5 días con LT CD8⁺ en un medio libre de suero (A), o suplementado con 50 nM de retinol (B) y (C) en presencia de 100 nM de péptido OVA. Al final del co-cultivo, se evaluó en los LT CD8⁺ la expresión de $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 por FACS. (C) expresión de $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en los LT CD8⁺ luego del co-cultivo con MLN-DC CD103⁺Alde⁺. El inhibidor DEAB fue usado como control para identificar la población de células Alde⁺. Como control positivo se agregó RA [10 nM] durante el co-cultivo. Los gráficos muestran un resultado representativo de al menos 3 experimentos independientes realizados

3.8 Células dendríticas generadas *in vitro* en presencia de ácido all-*trans* retinoico, inducen los receptores de *homing* a intestino $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en linfocitos T

Finalmente, se investigó si las DC generadas *in vitro* en presencia de RA (BMDC^{RA}) inducían en los LT, al igual que las MLN-DC CD103⁺Alde⁺ (Fig. 14C), los receptores de *homing* a intestino $\alpha 4\beta 7$ y CCR9. Con este fin, BMDC^{CTRL} o BMDC^{RA} se co-cultivaron con LT CD4⁺ OT-II/RAG1^{-/-} en presencia de péptido OVA [2.5 μ M], y luego de 5 días se determinó la expresión de los receptores de *homing* a intestino en los linfocitos mediante FACS. Similar al efecto de las MLN-DC CD103⁺Alde⁺ sobre los LT CD4⁺, las BMDC^{RA} indujeron un mayor porcentaje de LT CD4⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺ y CCR9⁺ que las BMDC^{CTRL}, ya sea cuando se usaron LT CD4⁺ de bazo (OT-II/RAG1^{-/-}) (Fig. 16A), o timo (OT-II) (Fig. 16B). Sugiriendo que el RA, mediante un mecanismo de retroalimentación positiva sobre las enzimas RALDH, puede inducir su propia síntesis en BMDC.

Luego, se evaluó si la administración oral de RA era suficiente *in vivo* para conferir a las DC de PLN la capacidad de inducir los receptores de *homing* a intestino en LT CD8⁺ (producir RA). Para esto, se purificaron PLN-DC y MLN-DC a partir de ratones B6 que fueron alimentados por 5 días con RA [500 μ g/dosis] o aceite de oliva virgen como control del vehículo del RA. Luego, las DC se co-cultivaron con LT CD8⁺ OT-I/RAG1^{-/-} en un medio libre de suero suplementado con 50 nM de retinol. Como se esperaba, las MLN-DC purificadas de ratones CTRL, o las de ratones alimentados con RA, indujeron eficientemente la expresión de $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en los LT CD8⁺ (Fig. 17A). Importantemente, y en acuerdo con los resultados del ensayo de Aldefluor[®] obtenidos previamente (Fig. 12), las PLN-DC provenientes de ratones alimentados con RA, indujeron un mayor porcentaje de los receptores de *homing* a intestino en los LT CD8⁺ con respecto a las PLN-DC provenientes de ratones CTRL. Efecto que fue totalmente inhibido por la adición de DEAB durante el cultivo (Fig. 17B). Lo anterior sugiere que la inducción de los receptores de *homing* es consecuencia de la síntesis *de novo* de RA por parte de las DC, y no por un simple "transporte" del RA exógeno.

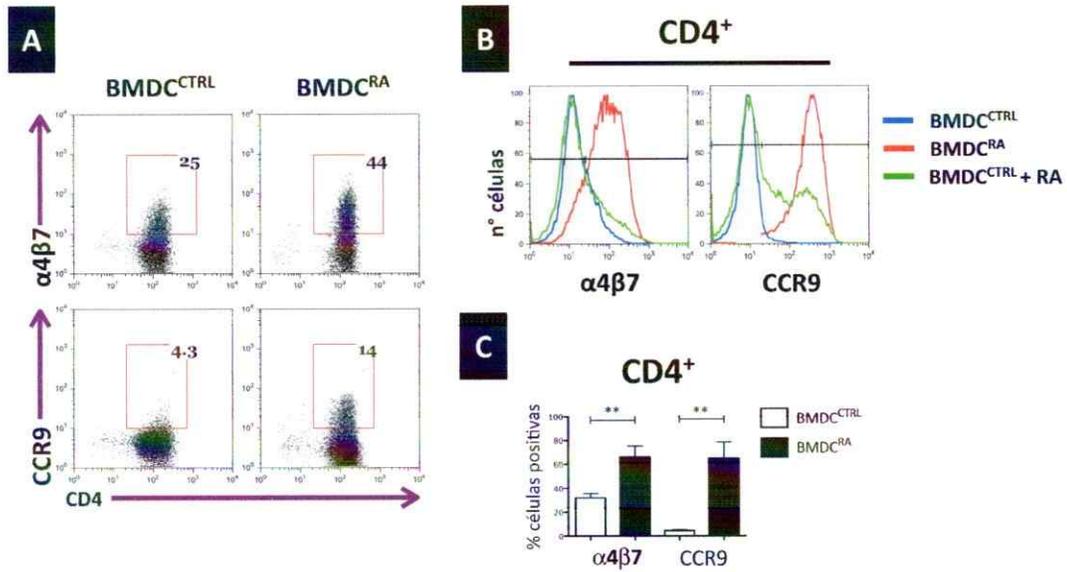


Figura 16. BMDC generadas en presencia de RA inducen los receptores de *homíng* a intestino $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en LT CD4⁺.

BMDCA^{CTRL} o BMDC^{RA} fueron co-cultivadas durante 5 días con LT CD4⁺ de bazo ($n=2$) (A) o timo ($n=5$) (B) en presencia de 2,5 μ M de péptido OVA. Al final del co-cultivo, se evaluó en los LT CD4⁺ la expresión de $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 por FACS. En (B), se agregó RA [10 nM] como control positivo líneas verdes. (C) cuantificación de los resultados mostrados en (B) ($n=5$). El análisis estadístico se realizó mediante el test t de *student*. P value < 0.05.

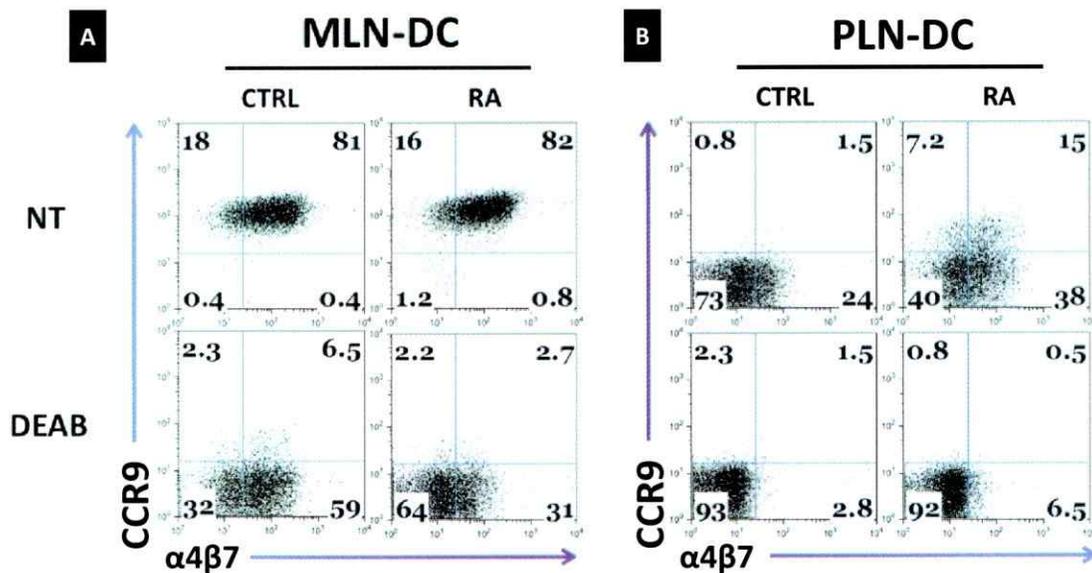


Figura 17. La suministración exógena de RA por vía oral, promueve que PLN-DC adquieran la capacidad de inducir en LT CD8⁺ los receptores de *homing* a intestino $\alpha 4\beta 7$ y CCR9.

DC purificadas de MLN (A) o PLN (B) de ratones que fueron alimentados por 5 días con RA [500 $\mu\text{g}/\text{dosis}$] o con aceite de oliva virgen (CTRL), se co-cultivaron durante 4 días con LT CD8⁺ en presencia de 100 nM de péptido OVA. Al final del co-cultivo, se evaluó en los LT CD8⁺ la expresión de $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 por FACS. El reactivo DEAB fue agregado como control durante el co-cultivo para inhibir la actividad de las enzimas RALDH. Los gráficos muestran un resultado representativo de 2 experimentos realizados, en el que se combinaron DC aisladas de 2 ratones distintos.

4. DISCUSIÓN

El sistema inmune asociado a la mucosa intestinal, ha desarrollado diversos mecanismos para mantener un estado de tolerancia frente a la flora comensal y antígenos presentes en la dieta alimenticia. Bajo condiciones no inflamatorias, se ha descrito que las LP-DC CD103⁺ capturan antígenos presentes en el lumen del intestino delgado (Niess y col, 2005; Vallon-Eberhard y col, 2006) para transportarlos a través de la linfa hacia el linfonodo mesentérico (Huang y col, 2000; Schulz y col, 2009), lugar en el cual favorecen la generación de LTreg Foxp3⁺ gracias a su capacidad de producir RA (Matteoli y col, 2010). Sin embargo, recientemente se reportó que como consecuencia de una inflamación intestinal, esta vez las MLN-DC CD103⁺ derivadas de la LP del intestino delgado favorecen una respuesta inflamatoria de tipo Th1 en desmedro de la generación de LTreg. Este fenómeno se asoció a una disminución en la expresión del mRNA de la enzima RALDH2 y de la actividad de la misma en estas DC (Laffont y col, 2010). Lo anterior, apoya la idea de que las propiedades funcionales de las GALT-DC, y en particular la capacidad de producir RA, pueden ser moduladas por factores presentes en el entorno de estas células durante el curso de una respuesta inmune.

4.1 Vitamina A y el sistema inmune

Se estima que en más de 50 países del continente Africano y Asiático, alrededor de un 20% de la población en edad pre-escolar y un 10% de las madres embarazadas, sufre de algún tipo de deficiencia de vitamina A (WHO, 2009). Esta condición, tiene como consecuencia una multitud de malformaciones en el feto durante su desarrollo embrionario, así como también un aumento de la susceptibilidad a infecciones por bacterias, virus y hongos en el individuo adulto (Smith & Hayes 1987).

En el sistema inmune de los vertebrados, la deficiencia de vitamina A causa un desbalance en las respuestas de tipo Th1 y Th2, favoreciendo la producción de IFN γ por parte de los LT CD4⁺ efectores y disminuyendo a la vez la producción de las inmunoglobulinas IgA, IgG₁ e IgE (Cantorna y col, 1994; Stephensen y col, 2002). Recíprocamente, altas dosis de vitamina A en la dieta aumentan la producción de citoquinas de tipo Th2 y la producción de IgA (Cui y col, 2000; Racke y col, 1995).

4.2 Efecto del ácido retinoico sobre las células dendríticas

Consistente con las observaciones en que el RA modula una respuesta inmune adquirida, se reportó que los macrófagos de ratón tratados con RA (tanto *in vivo* como *in vitro*) disminuyen la producción de IL-12 (citoquina polarizante hacia respuestas de tipo Th1) en respuesta a LPS, lo cual favoreció además a respuestas de tipo Th2 (Cantorna y col, 1995; Kang y col, 2000). La misma tendencia fue observada en una línea celular de monocitos/macrófagos humanos y en células mononucleares derivadas de sangre de cordón umbilical de recién nacidos tratadas con RA (Wang y col, 2007). Consistente con todos estos resultados, en este trabajo se demostró que las DC de ratón generadas *in vitro* con rmGM-CSF en presencia de RA (BMDC^{RA}), producen cantidades significativamente menores de IL-12(p40/p70) en respuesta a LPS (Fig. 6), lo cual también disminuyó a la mitad el porcentaje de LT CD4⁺IFN γ ⁺ obtenidos luego de 5 días de co-cultivo con estas BMDC^{RA} (datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con un reporte reciente en el que se usaron DC humanas diferenciadas *in vitro* en presencia de RA (Jin y col, 2010; Wada y col, 2009). El efecto del RA sobre el fenotipo de las DC humanas diferenciadas *in vitro*, ha sido intensamente estudiado en los últimos años. Lamentablemente, se han encontrado resultados contradictorios con respecto a la expresión de algunos marcadores de maduración expresados por las DC. Por una parte, se reportó que el RA incrementa la expresión de HLA-DR (MHC-II) y de la molécula co-estimuladora CD86 en DC humanas generadas a partir de sangre periférica

(Zapata-Gonzalez y col, 2007). En cambio, y similar a lo reportado en este trabajo (Fig. 4), existen antecedentes en la literatura que muestran que el RA influye negativamente en la expresión de estas moléculas (Jin y col, 2010; Sousa-Canavez y col, 2009; Tao y col, 2006; Wada y col, 2009). Lo anterior, puede ser explicado por el uso de metodologías diferentes en la obtención y generación de las DC, como por ejemplo, el uso de MACS[®] CD14⁺ para el enriquecimiento de los monocitos, o el uso de un gradiente de densidad (*ficoll-hypaque*) para aislar las células mononucleares. Además, es posible que el fenotipo de las DC (o su diferenciación a partir de progenitores hematopoyéticos) sea diferencialmente influenciado por concentraciones bajas, intermedias o altas de RA dependiendo de cómo estas células hayan sido obtenidas. En nuestras manos, las BMDC generadas en presencia de 1, 10 ó 100 nM de RA, mantuvieron el mismo fenotipo inmaduro, sin observarse un efecto dosis-respuesta frente a este metabolito. Por otra parte, y al igual que lo reportado en otros trabajos (Altucci y col, 2001; Donato & Noy 2005; Engedal y col, 2008; Geissmann y col, 2003; Vuillaume y col, 2001; Watabe y col, 2002), concentraciones altas de RA (>500 nM) influyeron negativamente en la viabilidad de los cultivos y número total de células obtenidas, probablemente por la inducción de apoptosis en las DC inmaduras (Geissmann y col, 2003). Por esta razón, es que todos los experimentos descritos en esta tesis, fueron llevados a cabo utilizando un rango menor de concentraciones.

Interesantemente, la ausencia de maduración observada en las BMDC^{RA} estimuladas con LPS (Fig. 5), podría explicar algunas de las propiedades tolerogénicas de las GALT-DC reportadas previamente en la literatura (Tisch 2010). Bajo condiciones inflamatorias, las LP-DC diferenciadas en presencia de RA -ya sea de manera autocrina o paracrina (Iliev y col, 2009a; Lampen y col, 2000)- podrían inducir en los LT de MLN un estado de anergia, ya que estas MLN-DC tendrían bajos niveles de expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 (resultados de esta tesis) (Rutella y col, 2006; Thomson 2010; Tisch 2010). Además, en apoyo con la idea de que el RA favorece la generación de DC inmaduras, se encontró un menor porcentaje de células CD11c⁺MHC-

II⁺ y CD11c⁺CD86⁺ en PLN y MLN de ratones LRAT^{-/-} VAD tratados por 5 días con RA (Fig. 18, fila de abajo). Cabe destacar, que las PLN-DC y MLN-DC de los ratones LRAT^{-/-} VAD alimentados con el vehículo del RA (aceite de oliva virgen) presentaron un fenotipo más maduro que las DC de ratones B6 (Fig. 18, histogramas rojos), sugiriendo que la falta de RA -debido a la deficiencia de vitamina A- favorece la maduración de las DC *in vivo*. No obstante, el tratamiento oral con RA de los ratones B6 alimentados con una dieta control, resultó en un aumento del porcentaje de las DC MHC-II⁺ y CD86⁺ en PLN y MLN (Fig. 18). Ya que la administración sistémica de RA (tratamiento oral), pudo haber modulado de manera indirecta el fenotipo de las DC, no se puede concluir categóricamente acerca del efecto *in vivo* del RA sobre la maduración de las DC con este tipo de experimentos. Más bien, estos resultados refuerzan la idea de que el fenotipo de estas células es susceptible a los cambios en la concentración de este metabolito.

Por otra parte, las MLN-DC de los ratones LRAT^{-/-} alimentados con una dieta VAD, expresaron con menor intensidad la molécula CD1d -glicoproteína de membrana expresada en DC involucrada en la presentación de antígenos lipídicos a células NKT- que las MLN-DC de ratones LRAT^{-/-} alimentados con una dieta suplementada con vitamina A. Además, cuando los ratones LRAT^{-/-} VAD se trataron oralmente con RA durante 5 días, los niveles de expresión de CD1d aumentaron significativamente, llegando a ser incluso similares a los encontrados en los ratones *wild type* (datos no mostrados). Estos resultados confirman las observaciones realizadas por Sztatmari y col. (2006), en el cual, utilizando un sistema *in vitro*, los autores del trabajo propusieron una regulación positiva de CD1d en DC mediada por el RA.

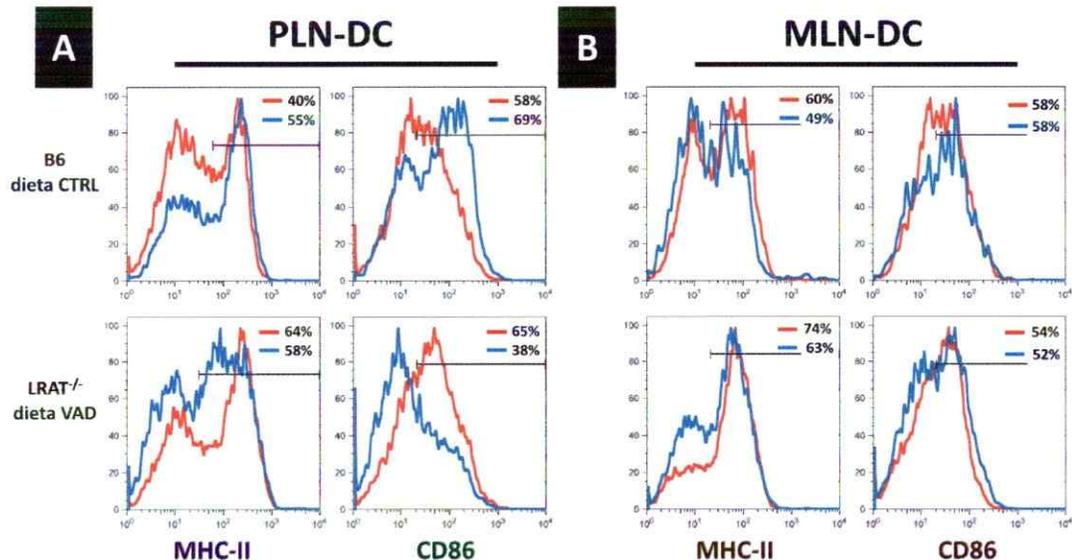


Figura 18. Efecto *in vivo* del RA sobre el fenotipo de las DC de PLN y MLN

La expresión de MHC-II y CD86 fue evaluada por FACS en DC de PLN (A) y MLN (B) aisladas de ratones B6 (dieta CTRL) o LRAT^{-/-} (dieta VAD), que fueron alimentados por 5 días con RA [500 µg/dosis] (histogramas de color azul), o con aceite de oliva virgen (histogramas de color rojo) (n=2). Los histogramas muestran un resultado representativo de 2 experimentos independientes realizados.

Se ha descrito que el RA favorece la migración de las DC hacia los linfonodos mediante la inducción de la metaloproteínasa 9 (Darmanin y col, 2007; Lackey y col, 2008; Zaragoza y col, 2007), por lo que recíprocamente, es posible que una falta o disminución en la concentración del RA resultará en una mayor permanencia de estas células en el intestino. No obstante, en ninguno de los experimentos realizados en este trabajo se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de MLN-DC CD103⁺ (datos no mostrados), sugiriendo que la migración de las LP-DC hacia el MLN, no se vio afectada por la ausencia de RA (ratones LRAT^{-/-} VAD), o el tratamiento oral con RA.

4.3 Ácido retinoico y retroalimentación positiva de las enzimas RALDH en DC

La capacidad de producir RA por las GALT-DC, dada por la expresión de las enzimas RALDH, es probablemente una de las características que mejor define funcionalmente a estas DC. A pesar de que no existe evidencia *in vivo* de que las GALT-DC produzcan RA, es claro que este metabolito cumple un rol fundamental para la homeostasis del sistema inmune. A la fecha, se desconoce cómo y en qué lugar las GALT-DC, específicamente LP-DC CD103⁺ y MLN-DC CD103⁺, adquieren la capacidad para sintetizar RA. Probablemente, factores presentes en el intestino -donde los progenitores de las LP-DC terminan su diferenciación- regulen positivamente la expresión de estas enzimas. En acuerdo con este planteamiento, nuestro laboratorio previamente demostró que la IL-4 -una citoquina que históricamente ha sido asociada a la mucosa intestinal (Alpan y col, 2004; Everson y col, 1998; Iwasaki & Kelsall 1999)- induce un aumento en la expresión del mRNA *Aldh1a2* en MLN-DC, lo cual resultó en una mayor inducción del receptor de *homing* a intestino CCR9 en LT CD4⁺ (Elgueta y col, 2008). Probablemente, esto se deba a un aumento de la producción de RA por parte de las MLN-DC tratadas con IL-4. Asimismo, se reportó un aumento en la expresión del mRNA *Aldh1a2* y en la actividad RALDH cuando Sp-DC fueron incubadas con el factor de crecimiento GM-CSF, lo cual además, tuvo un efecto sinérgico cuando las Sp-DC fueron tratadas con IL-4 y/o LPS (Yokota y col, 2009b). Por otra parte, un modesto aumento en la expresión de *Aldh1a2* se obtuvo cuando LP-DC CD103⁺CD11b^{hi} fueron activadas *in vitro* con flagelina, un ligando de TLR-5 (Uematsu y col, 2008), sugiriendo que la flora comensal y/o estímulos patogénicos también podrían contribuir a la inducción de las enzimas RALDH en las GALT-DC.

A pesar de que en otros modelos experimentales el tratamiento con RA produjo una inhibición en la expresión de las enzimas RALDH (Elizondo y col, 2009; Niederreither y col, 1997), los resultados reportados en esta tesis muestran una significativa inducción de estas enzimas mediado por este metabolito (Figs. 8-13).

Todos estos resultados sugieren que, mediante un mecanismo de retroalimentación positiva en las GALT-DC, la expresión del mRNA para las enzimas RALDH podría mantenerse en el tiempo. Lo cual favorecería la producción de RA. Un mecanismo similar fue propuesto por Lampen y col. (2000) para la síntesis del RA en la línea celular epitelial de intestino humano Caco-2, en donde la expresión del mRNA *Aldh1a2* aumentó significativamente luego del tratamiento con RA (Lampen y col, 2000). Es posible por tanto, que el RA -actuando de manera autocrina en las GALT-DC- mantenga en el tiempo la expresión de las enzimas RALDH. Lo anterior implicaría, que la producción de RA se conservaría incluso una vez que las DC han emigrado de la LP hacia el MLN. Recíprocamente, la disminución del mRNA *Aldh1a2* y el porcentaje de células CD11c⁺Alde⁺ encontrado en las MLN-DC de los ratones LRAT^{-/-} VAD (Fig. 13), sugiere fuertemente que los retinoides cumplen un rol modulador sobre su propia síntesis, a través del control de la expresión de las enzimas RALDH, y que la vitamina A (y probablemente el RA) es necesaria para la expresión de estas enzimas en las MLN-DC. Además, el aumento en el porcentaje de las células CD11c⁺Alde⁺ encontrado tanto *in vitro* (Figs. 10 y 11) como *in vivo* (Figs. 12 y 13) luego del tratamiento con RA, refuerza la idea de que esta molécula es suficiente para la expresión y funcionalidad de las enzimas RALDH en DC.

4.4 Células dendríticas CD103⁺ y expresión de las enzimas RALDH

A la fecha, el único marcador de superficie utilizado para identificar GALT-DC capaces de producir RA, es la integrina CD103⁺. Los resultados obtenidos en este trabajo, mediante la separación por *cell sorting* de las poblaciones de MLN-DC CD103⁺Alde⁻ y CD103⁺Alde⁺, permitió establecer claramente que el marcador CD103⁺ no define a una población de DC funcionalmente homogénea, tal y como fue propuesto previamente (Jaensson y col, 2008). Por otra parte, la expresión del mRNA *Aldh1a2* se

correlacionó directamente con la actividad de las células Alde⁺, y con la capacidad de inducir $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en LT CD4⁺ (Fig. 14).

Es importante destacar que en el MLN, la población de DC que mayoritariamente mostró la actividad enzimática RALDH (CD11c⁺Alde⁺), fue la población de DC CD103⁺ (Fig. 13B). Sin embargo, en PLN se observó la situación totalmente opuesta, en donde las células CD11c⁺Alde⁺ no expresaron la integrina CD103 (Fig. 13A). Independientemente de la expresión de CD103, ambas poblaciones de DC aumentaron su actividad RALDH luego del tratamiento oral con RA (Fig. 13), lo cual sugiere que no existiría un alto grado de especialización en las DC para producir RA, o dicho de otra manera, bajo ciertas condiciones cualquier DC sería capaz de producir RA. Recientemente, resultados similares se obtuvieron al analizar una población de DC CD103⁻ derivada de la piel de las orejas de ratones B6 (Guilliams y col, 2010).

4.5 Producción de ácido retinoico por GALT-DC, e inducción de receptores de *homing* a intestino en linfocitos T

Experimentos realizados *in vitro*, han demostrado que tanto la forma 9-*cis* como la all-*trans* del RA inducen directamente en linfocitos T la expresión de los receptores de *homing* a intestino $\alpha 4\beta 7$ y CCR9, tanto en LT CD4⁺ (Iwata y col, 2004), como en LT CD8⁺ (Svensson y col, 2008). Sin embargo, la producción específica de estos isómeros por parte de las GALT-DC tanto *in vivo* como *in vitro*, aún no ha sido determinada (Svensson y col, 2008). Lo anterior, probablemente se debe a las pequeñas cantidades de RA producidas por las GALT-DC en cultivo, por lo que la producción de esta molécula por las GALT-DC, ha sido históricamente evaluada a través de la inducción de los receptores de *homing* a intestino en linfocitos T después de un co-cultivo, metodología que fue empleada también en este trabajo (Figs. 14-17). El aumento en la actividad RALDH observado en las DC tratadas con RA (Figs. 10-13), se correlacionó directamente

con la habilidad de estas células para inducir las moléculas $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$. El uso del inhibidor de las enzimas RALDH durante el co-cultivo -DEAB-, sugiere fuertemente que la inducción de los receptores de *homing* en los linfocitos T, se debe a una síntesis *de novo* del RA, y no a un mero transporte del RA que se agregó exógenamente durante el experimento. Además, al realizar el co-cultivo en un medio libre de retinol -el precursor de la vitamina A-, la inducción de los receptores de *homing* a intestino tampoco ocurrió (Figs. 14 y 17). En este sentido, es importante destacar que el tratamiento por vía oral con RA fue suficiente para inducir la actividad de las enzimas RALDH en PLN-DC (Figs. 12 y 13), lo cual además permitió que estas DC, las cuales fisiológicamente no producen RA, indujeran *ex vivo* los receptores de *homing* a intestino $\alpha 4\beta 7$ y CCR9 en LT $CD8^+$. Estos resultados, podrían ser de gran ayuda para inducir de manera artificial una respuesta inmune dirigida a la mucosa intestinal, ya que la administración de RA (y eventualmente de vitamina A), podría ser utilizada como terapia para combatir ciertas infecciones o patologías que afecten a la mucosa intestinal.

4.6 Modelo propuesto para la inducción de las enzimas RALDH en GALT-DC

En resumen, los resultados de este trabajo permiten proponer el siguiente modelo ilustrado en la Fig. 19.

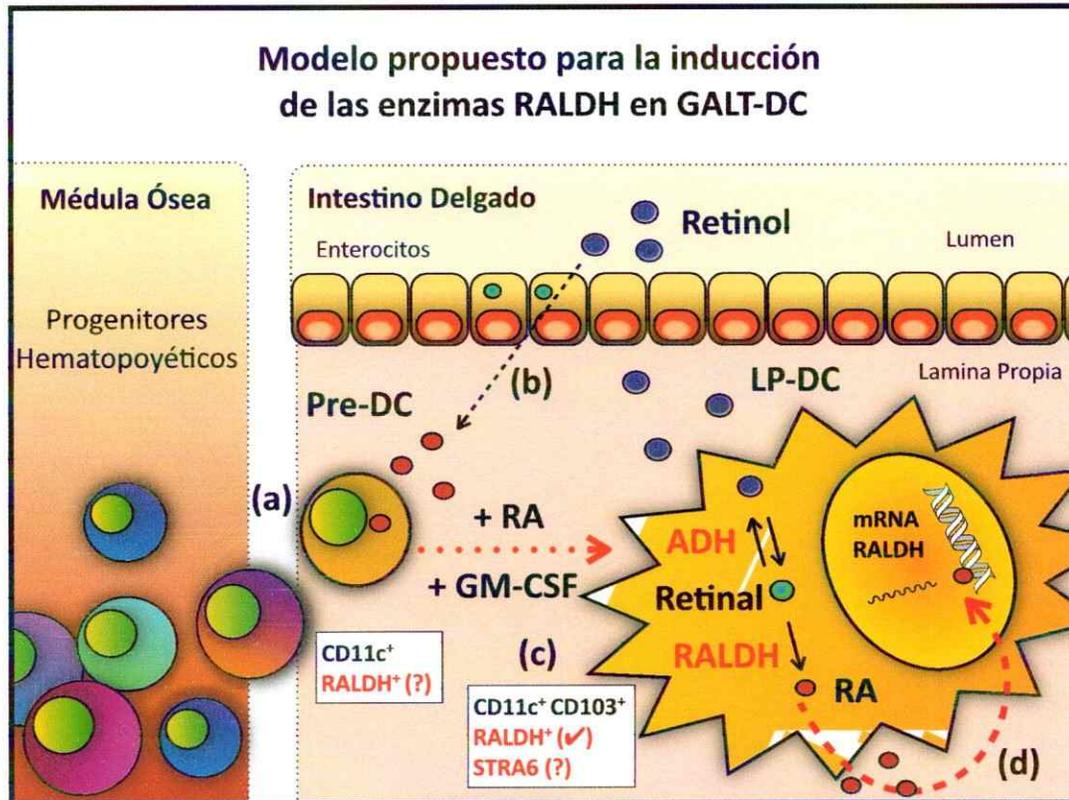


Figura 19. Las enzimas RALDH son inducidas por RA en las DC de lamina propia

Una vez que los precursores de las DC (**Pre-DC**) colonizan la lamina propia del intestino delgado (**Fig. 19, a**), la producción local de ácido retinoico (**RA**) por los enterocitos (**Fig. 19, b**), induce la expresión de la enzimas RALDH durante la diferenciación de las DC (**Fig. 19, c**). Más tarde, mediante un mecanismo de retro-alimentación positiva, el RA de manera autocrina (**Fig.19, d**) mantiene la expresión de las enzimas RALDH. Este modelo, permite explicar cómo se mantendría la producción de RA en las DC una vez que estas han migrado hacia el linfonodo mesentérico.

5. CONCLUSIONES

1. El ácido *all-trans* retinoico inhibe la expresión de MHC-II, CD80 y CD86 en células dendríticas de ratón generadas *in vitro* con rmGM-CSF.
2. Células dendríticas generadas en presencia de ácido *all-trans* retinoico son resistentes a la maduración inducida por LPS, y mantienen un fenotipo inmaduro.
3. Células dendríticas generadas en presencia de ácido *all-trans* retinoico, no producen la citoquina IL-12(p40/p70) en respuesta a LPS. Sin embargo, estas células producen mayores cantidades de la citoquina IL-6.
4. El ácido *all-trans* retinoico aumenta la expresión del mRNA *Aldh1a2* en células dendríticas generadas *in vitro* con rmGM-CSF.
5. El ácido *all-trans* retinoico induce *in vitro* la expresión del mRNA *Aldh1a2* en células dendríticas de linfonodo periférico asociado a piel, bazo y linfonodo mesentérico.
6. El aumento del mRNA *Aldh1a2* en células dendríticas diferenciadas o tratadas *in vitro* con ácido *all-trans* retinoico, se correlaciona directamente proporcional con un aumento en la actividad de las enzimas RALDH (ensayo de Aldefluor®).
7. La separación de las células dendríticas CD103⁺Alde⁺ mediante *cell sorting*, permitió la identificación de una población productora de ácido retinoico, lo cual no se correlacionó con la expresión de la integrina CD103 por estas células dendríticas.
8. El tratamiento *in vitro* o *in vivo* con ácido *all-trans* retinoico, permitió que células dendríticas no asociadas a la mucosa intestinal (PLN-DC) adquirieran la capacidad para sintetizar *de novo* este metabolito.
9. La vitamina A, y probablemente el ácido retinoico, son fundamentales para la expresión de las enzimas RALDH en células dendríticas aisladas de linfonodo mesentérico.

ANEXO

A continuación, se entrega un lista de las posibles publicaciones que los resultados de esta tesis generarían en el futuro cercano:

1. *Integrin and Cell Adhesion Molecules: Methods and Protocols, Chapter: "T cell homing to the gut mucosa: General concepts and methodological considerations.* **Jaime De Calisto**, Eduardo J. Villablanca, Sen Wang, Maria R. Bono, Mario Roseblatt & J. Rodrigo Mora. *Methods in Molecular Biolog.*
2. *Vitamin A Deficiency Impairs Vaccine-Elicited Mucosal Cellular Immunity.* David R. Kaufman, **Jaime De Calisto**, Nathaniel L. Simmons, Ashley N. Cruz, Eduardo J. Villablanca, J. Rodrigo Mora and Dan H. Barouch.
3. *Crosstalk between MyD88 and retinoic acid pathways controls gut dendritic cell specialization.* Eduardo J. Villablanca, Sen Wang, **Jaime De Calisto**, Daniel C. O. Gomes, Maureen A. Kane, Joseph L. Napoli, William S. Blaner, Hiroyuki Kagechika, Rune Blomhoff, Mario Roseblatt, Maria Rosa Bono, Ulrich H. von Andrian & J. Rodrigo Mora.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, C. & Cho, J. (2009). "Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease." *Inflamm Bowel Dis* **15**(7): 1090-1100.
- Agace, W.W. (2008). "T-cell recruitment to the intestinal mucosa." *Trends Immunol* **29**(11): 514-522.
- Alpan, O., Bachelder, E., Isil, E., Arnheiter, H. y Matzinger, P. (2004). "'Educated' dendritic cells act as messengers from memory to naive T helper cells." *Nat Immunol* **5**(6): 615-622.
- Altucci, L., Rossin, A., Raffelsberger, W., Reitmair, A., Chomienne, C. y Gronemeyer, H. (2001). "Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL." *Nature Medicine* **7**(6): 680-686.
- Arseneau, K.O., Tamagawa, H., Pizarro, T.T. y Cominelli, F. (2007). "Innate and adaptive immune responses related to IBD pathogenesis." *Curr Gastroenterol Rep* **9**(6): 508-512.
- Artis, D. (2008). "Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut." *Nat Rev Immunol* **8**(6): 411-420.
- Bai, A., Lu, N., Guo, Y., Liu, Z., Chen, J. y Peng, Z. (2009). "All-trans retinoic acid down-regulates inflammatory responses by shifting the Treg/Th17 profile in human ulcerative and murine colitis." *J Leukoc Biol* **86**(4): 959-969.
- Balmer, J.E. & Blomhoff, R. (2002). "Gene expression regulation by retinoic acid." *J Lipid Res* **43**(11): 1773-1808.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B. y Palucka, K. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- Banchereau, J. & Steinman, R.M. (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* **392**(6673): 245-252.
- Barnes, M.J. & Powrie, F. (2009). "Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis." *Immunity* **31**(3): 401-411.
- Blaner, W.S., O'Byrne, S.M., Wongsiriroj, N., Kluwe, J., D'Ambrosio, D.M., Jiang, H., Schwabe, R.F., Hillman, E.M., Piantedosi, R. y Libien, J. (2009). "Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage." *Biochim Biophys Acta* **1791**(6): 467-473.
- Blomhoff, R., Green, M.H., Berg, T. y Norum, K.R. (1990). "Transport and storage of vitamin A." *Science* **250**(4979): 399-404.
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., Stanley, E.R., Nussenzweig, M., Lira, S.A., Randolph, G.J. y Merad, M. (2009). "Origin of the lamina propria dendritic cell network." *Immunity* **31**(3): 513-525.
- Cantorna, M.T., Nashold, F.E. y Hayes, C.E. (1994). "In vitamin A deficiency multiple mechanisms establish a regulatory T helper cell imbalance with excess Th1 and insufficient Th2 function." *J Immunol* **152**(4): 1515-1522.
- Cantorna, M.T., Nashold, F.E. y Hayes, C.E. (1995). "Vitamin A deficiency results in a priming environment conducive for Th1 cell development." *Eur J Immunol* **25**(6): 1673-1679.
- Chambon, P. (2005). "The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades." *Mol Endocrinol* **19**(6): 1418-1428.

- Coombes, J.L. & Powrie, F. (2008). "Dendritic cells in intestinal immune regulation." *Nat Rev Immunol* **8**(6): 435-446.
- Cui, D., Moldoveanu, Z. y Stephensen, C.B. (2000). "High-level dietary vitamin A enhances T-helper type 2 cytokine production and secretory immunoglobulin A response to influenza A virus infection in BALB/c mice." *J Nutr* **130**(5): 1132-1139.
- Darmanin, S., Chen, J., Zhao, S., Cui, H., Shirkoohi, R., Kubo, N., Kuge, Y., Tamaki, N., Nakagawa, K., Hamada, J.-i., Moriuchi, T. y Kobayashi, M. (2007). "All-trans retinoic acid enhances murine dendritic cell migration to draining lymph nodes via the balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors." *J Immunol* **179**(7): 4616-4625.
- del Rio, M.-L., Bernhardt, G., Rodriguez-Barbosa, J.-I. y Förster, R. (2010a). "Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells." *Immunol Rev* **234**(1): 268-281.
- del Rio, M.L., Bernhardt, G., Rodriguez-Barbosa, J.I. y Forster, R. (2010b). "Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells." *Immunol Rev* **234**(1): 268-281.
- Domínguez, P.M. & Ardavín, C. (2010). "Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation." *Immunol Rev* **234**(1): 90-104.
- Donato, L.J. & Noy, N. (2005). "Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling." *Cancer Res* **65**(18): 8193-8199.
- Dudda, J.C., Lembo, A., Bachtanian, E., Huehn, J., Siewert, C., Hamann, A., Kremmer, E., Förster, R. y Martin, S.F. (2005). "Dendritic cells govern induction and reprogramming of polarized tissue-selective homing receptor patterns of T cells: important roles for soluble factors and tissue microenvironments." *Eur. J. Immunol.* **35**(4): 1056-1065.
- Dudda, J.C. & Martin, S.F. (2004). "Tissue targeting of T cells by DCs and microenvironments." *Trends Immunol* **25**(8): 417-421.
- Dudda, J.C., Simon, J.C. y Martin, S. (2004). "Dendritic cell immunization route determines CD8+ T cell trafficking to inflamed skin: role for tissue microenvironment and dendritic cells in establishment of T cell-homing subsets." *J Immunol* **172**(2): 857-863.
- Duester, G., Mic, F.A. y Molotkov, A. (2003). "Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid." *Chem Biol Interact* **143-144**: 201-210.
- Eastaff-Leung, N., Mabarrack, N., Barbour, A., Cummins, A. y Barry, S. (2010). "Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease." *J Clin Immunol* **30**(1): 80-89.
- Edele, F., Molenaar, R., Gutle, D., Dudda, J.C., Jakob, T., Homey, B., Mebius, R., Hornef, M. y Martin, S.F. (2008a). "Cutting edge: instructive role of peripheral tissue cells in the imprinting of T cell homing receptor patterns." *J Immunol* **181**(6): 3745-3749.
- Edele, F., Molenaar, R., Gütle, D., Dudda, J.C., Jakob, T., Homey, B., Mebius, R., Hornef, M. y Martin, S.F. (2008b). "Cutting edge: instructive role of peripheral tissue cells in the imprinting of T cell homing receptor patterns." *The Journal of Immunology* **181**(6): 3745-3749.
- Eksteen, B., Miles, A.E., Grant, A.J. y Adams, D.H. (2004). "Lymphocyte homing in the pathogenesis of extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease." *Clin Med* **4**(2): 173-180.

- Eksteen, B., Mora, J.R., Haughton, E.L., Henderson, N.C., Lee-Turner, L., Villablanca, E.J., Curbishley, S.M., Aspinall, A.I., Von Andrian, U.H. y Adams, D.H. (2009). "*Gut homing receptors on CD8 T cells are retinoic acid dependent and not maintained by liver dendritic or stellate cells.*" *Gastroenterology* **137**(1): 320-329.
- Elgueta, R., Sepulveda, F.E., Vilches, F., Vargas, L., Mora, J.R., Bono, M.R. y Roseblatt, M. (2008). "*Imprinting of CCR9 on CD4 T cells requires IL-4 signaling on mesenteric lymph node dendritic cells.*" *J Immunol* **180**(10): 6501-6507.
- Elizondo, G., Medina-Díaz, I.M., Cruz, R., Gonzalez, F.J. y Vega, L. (2009). "*Retinoic acid modulates retinaldehyde dehydrogenase 1 gene expression through the induction of GADD153-C/EBPbeta interaction.*" *Biochem Pharmacol* **77**(2): 248-257.
- Engedal, N., Auberger, P. y Blomhoff, H.K. (2008). "*Retinoic acid regulates Fas-induced apoptosis in Jurkat T cells: reversal of mitogen-mediated repression of Fas DISC assembly.*" *Journal of Leukocyte Biology* **85**(3): 469-480.
- Everson, M.P., Lemak, D.G., McDuffie, D.S., Koopman, W.J., McGhee, J.R. y Beagley, K.W. (1998). "*Dendritic cells from Peyer's patch and spleen induce different T helper cell responses.*" *J Interferon Cytokine Res* **18**(2): 103-115.
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M. y O'garra, A. (1991a). "*IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.*" *J Immunol* **147**(11): 3815-3822.
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T.R., Howard, M., Moore, K.W. y O'garra, A. (1991b). "*IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells.*" *J Immunol* **146**(10): 3444-3451.
- Fritsche, J., Stonehouse, T.J., Katz, D.R., Andreessen, R. y Kreutz, M. (2000). "*Expression of retinoid receptors during human monocyte differentiation in vitro.*" *Biochem Biophys Res Commun* **270**(1): 17-22.
- Geissmann, F., Revy, P., Brousse, N., Lepelletier, Y., Folli, C., Durandy, A., Chambon, P. y Dy, M. (2003). "*Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells.*" *J Exp Med* **198**(4): 623-634.
- Guani-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S.O. y Teran, L.M. (2010). "*Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease.*" *Clin Immunol* **135**(1): 1-11.
- Guilliams, M., Crozat, K., Henri, S., Tamoutounour, S., Grenot, P., Devilard, E., de Bovis, B., Alexopoulou, L., Dalod, M. y Malissen, B. (2010). "*Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells.*" *Blood* **115**(10): 1958-1968.
- Hamann, A., Andrew, D.P., Jablonski-Westrich, D., Holzmann, B. y Butcher, E.C. (1994). "*Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo.*" *J Immunol* **152**(7): 3282-3293.
- Helft, J., Ginhoux, F., Bogunovic, M. y Merad, M. (2010). "*Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice.*" *Immunol Rev* **234**(1): 55-75.
- Hess, D.A., Meyerrose, T.E., Wirthlin, L., Craft, T.P., Herrbrich, P.E., Creer, M.H. y Nolte, J.A. (2004). "*Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity.*" *Blood* **104**(6): 1648-1655.
- Hooper, L.V. & Macpherson, A.J. (2010). "*Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota.*" *Nat Rev Immunol* **10**(3): 159-169.
- Huang, F.P., Platt, N., Wykes, M., Major, J.R., Powell, T.J., Jenkins, C.D. y MacPherson, G.G. (2000). "*A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal*

- epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes.*" J Exp Med **191**(3): 435-444.
- Iliev, I.D., Mileti, E., Matteoli, G., Chieppa, M. y Rescigno, M. (2009a). "*Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning.*" Mucosal immunology **2**(4): 340-350.
- Iliev, I.D., Spadoni, I., Mileti, E., Matteoli, G., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Foschi, D., Caprioli, F., Viale, G. y Rescigno, M. (2009b). "*Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells.*" Gut **58**(11): 1481-1489.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. y Steinman, R.M. (1992a). "*Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor.*" J Exp Med **176**(6): 1693-1702.
- Inaba, K., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. y Steinman, R.M. (1992b). "*Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor.*" J Exp Med **176**(6): 1693-1702.
- Iwasaki, A. & Kelsall, B. (1999). "*Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells.*" J Exp Med **190**(2): 229-239.
- Iwata, M. (2009). "*Retinoic acid production by intestinal dendritic cells and its role in T-cell trafficking.*" Semin Immunol **21**(1): 8-13.
- Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C. y Song, S.-Y. (2004). "*Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells.*" Immunity **21**(4): 527-538.
- Jaensson, E., Uronen-Hansson, H., Pabst, O., Eksteen, B., Tian, J., Coombes, J.L., Berg, P.-L., Davidsson, T., Powrie, F., Johansson-Lindbom, B. y Agace, W.W. (2008). "*Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans.*" Journal of Experimental Medicine **205**(9): 2139-2149.
- Jin, C.-J., Hong, C.Y., Takei, M., Chung, S.-Y., Park, J.-S., Pham, T.-N.N., Choi, S.-J.-N., Nam, J.-H., Chung, I.-J., Kim, H.-J. y Lee, J.-J. (2010). "*All-trans retinoic acid inhibits the differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells.*" Leuk Res **34**(4): 513-520.
- Johansson, M.E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L. y Hansson, G.C. (2008). "*The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria.*" Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 15064-15069.
- Johansson-Lindbom, B. & Agace, W.W. (2007). "*Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa.*" Immunol Rev **215**: 226-242.
- Kane, M.A., Folias, A.E., Wang, C. y Napoli, J.L. (2008). "*Quantitative profiling of endogenous retinoic acid in vivo and in vitro by tandem mass spectrometry.*" Anal Chem **80**(5): 1702-1708.
- Kang, B.Y., Chung, S.W., Kim, S.H., Kang, S.N., Choe, Y.K. y Kim, T.S. (2000). "*Retinoid-mediated inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages suppresses Th1 cytokine profile in CD4(+) T cells.*" British Journal of Pharmacology **130**(3): 581-586.
- Kantele, A., Zivny, J., Hakkinen, M., Elson, C.O. y Mestecky, J. (1999). "*Differential homing commitments of antigen-specific T cells after oral or parenteral immunization in humans.*" J Immunol **162**(9): 5173-5177.

- Kapsenberg, M.L. (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." *Nat Rev Immunol* **3**(12): 984-993.
- Kawaguchi, R., Yu, J., Honda, J., Hu, J., Whitelegge, J., Ping, P., Wiita, P., Bok, D. y Sun, H. (2007). "A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A." *Science* **315**(5813): 820-825.
- Kelsall, B. (2008). "Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages." *Mucosal Immunol* **1**(6): 460-469.
- Kitani, A. & Xu, L. (2008). "Regulatory T cells and the induction of IL-17." *Mucosal Immunol* **1 Suppl 1**: S43-46.
- Lackey, D.E., Ashley, S.L., Davis, A.L. y Hoag, K.A. (2008). "Retinoic acid decreases adherence of murine myeloid dendritic cells and increases production of matrix metalloproteinase-9." *J Nutr* **138**(8): 1512-1519.
- Laffont, S., Siddiqui, K.R.R. y Powrie, F. (2010). "Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103(+) dendritic cells." *European Journal of Immunology*.
- Lampen, A., Meyer, S., Arnhold, T. y Nau, H. (2000). "Metabolism of vitamin A and its active metabolite all-trans-retinoic acid in small intestinal enterocytes." *J Pharmacol Exp Ther* **295**(3): 979-985.
- Ley, R.E., Peterson, D.A. y Gordon, J.I. (2006). "Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine." *Cell* **124**(4): 837-848.
- Littman, D.R. & Rudensky, A.Y. (2010). "Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation." *Cell* **140**(6): 845-858.
- Liu, K. & Nussenzweig, M.C. (2010). "Origin and development of dendritic cells." *Immunol Rev* **234**(1): 45-54.
- Liu, Y.-J. (2009). "TSLP in epithelial cell and dendritic cell cross talk." *Adv Immunol* **101**: 1-25.
- Macfarlane, G.T. & Macfarlane, L.E. (2009). "Acquisition, evolution and maintenance of the normal gut microbiota." *Dig Dis* **27 Suppl 1**: 90-98.
- Magalhaes, J.G., Tattoli, I. y Girardin, S.E. (2007). "The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens." *Semin Immunol* **19**(2): 106-115.
- Mahmoud, M.I., Potter, J.J., Colvin, O.M., Hilton, J. y Mezey, E. (1993). "Effect of 4-(diethylamino)benzaldehyde on ethanol metabolism in mice." *Alcohol Clin Exp Res* **17**(6): 1223-1227.
- Manicassamy, S. & Pulendran, B. (2009). "Retinoic acid-dependent regulation of immune responses by dendritic cells and macrophages." *Semin Immunol* **21**(1): 22-27.
- Maraskovsky, E., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E.R., Lyman, S.D., Shortman, K. y McKenna, H.J. (1996). "Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified." *J Exp Med* **184**(5): 1953-1962.
- Matteoli, G., Mazzini, E., Iliev, I.D., Mileti, E., Fallarino, F., Puccetti, P., Chieppa, M. y Rescigno, M. (2010). "Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction." *Gut* **59**(5): 595-604.
- Merad, M. & Manz, M.G. (2009). "Dendritic cell homeostasis." *Blood* **113**(15): 3418-3427.
- Meyer-Hoffert, U., Hornef, M.W., Henriques-Normark, B., Axelsson, L.G., Midtvedt, T., Putsep, K. y Andersson, M. (2008). "Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer." *Gut* **57**(6): 764-771.

- Monteleone, I., Platt, A.M., Jaensson, E., Agace, W.W. y Mowat, A.M. (2008). "*IL-10-dependent partial refractoriness to Toll-like receptor stimulation modulates gut mucosal dendritic cell function.*" *Eur. J. Immunol.* **38**(6): 1533-1547.
- Mora, J.R. (2008). "*Homing imprinting and immunomodulation in the gut: role of dendritic cells and retinoids.*" *Inflamm Bowel Dis* **14**(2): 275-289.
- Mora, J.R., Bono, M.R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L.L., Roseblatt, M. y Von Andrian, U.H. (2003). "*Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells.*" *Nature* **424**(6944): 88-93.
- Mora, J.R. & von Andrian, U.H. (2006). "*T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges.*" *Trends Immunol* **27**(5): 235-243.
- Nell, S., Suerbaum, S. y Josenhans, C. (2010). "*The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models.*" *Nat Rev Microbiol* **8**(8): 564-577.
- Neutra, M.R., Mantis, N.J. y Kraehenbuhl, J.P. (2001). "*Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues.*" *Nat Immunol* **2**(11): 1004-1009.
- Ng, S.C., Kamm, M.A., Stagg, A.J. y Knight, S.C. (2010a). "*Intestinal dendritic cells: Their role in bacterial recognition, lymphocyte homing, and intestinal inflammation.*" *Inflammatory bowel diseases.*
- Ng, S.C., Kamm, M.A., Stagg, A.J. y Knight, S.C. (2010b). "*Intestinal dendritic cells: Their role in bacterial recognition, lymphocyte homing, and intestinal inflammation.*" *Inflamm Bowel Dis.*
- Niederreither, K., Mccaffery, P., Dräger, U.C., Chambon, P. y Dollé, P. (1997). "*Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development.*" *Mech Dev* **62**(1): 67-78.
- Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B.A., Vyas, J.M., Boes, M., Ploegh, H.L., Fox, J.G., Littman, D.R. y Reinecker, H.-C. (2005). "*CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance.*" *Science* **307**(5707): 254-258.
- O'Byrne, S.M., Wongsiriroj, N., Libien, J., Vogel, S., Goldberg, I.J., Baehr, W., Palczewski, K. y Blaner, W.S. (2005). "*Retinoid absorption and storage is impaired in mice lacking lecithin:retinol acyltransferase (LRAT).*" *J Biol Chem* **280**(42): 35647-35657.
- Pedron, T. & Sansonetti, P. (2008). "*Commensals, bacterial pathogens and intestinal inflammation: an intriguing menage a trois.*" *Cell Host Microbe* **3**(6): 344-347.
- Pino-Lagos, K., Benson, M.J. y Noelle, R.J. (2008a). "*Retinoic acid in the immune system.*" *Annals of the New York Academy of Sciences* **1143**: 170-187.
- Pino-Lagos, K., Benson, M.J. y Noelle, R.J. (2008b). "*Retinoic Acid in the Immune System.*" *Annals of the New York Academy of Sciences* **1143**(1): 170-187.
- Quadro, L., Hamberger, L., Colantuoni, V., Gottesman, M.E. y Blaner, W.S. (2003). "*Understanding the physiological role of retinol-binding protein in vitamin A metabolism using transgenic and knockout mouse models.*" *Mol Aspects Med* **24**(6): 421-430.
- Racke, M.K., Burnett, D., Pak, S.H., Albert, P.S., Cannella, B., Raine, C.S., McFarlin, D.E. y Scott, D.E. (1995). "*Retinoid treatment of experimental allergic encephalomyelitis. IL-4 production correlates with improved disease course.*" *J Immunol* **154**(1): 450-458.
- Rochette-Egly, C. & Germain, P. (2009). "*Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs).*" *Nucl Recept Signal* **7**: e005.

- Russo, J.E., Haugwitz, D. y Hilton, J. (1988). "Inhibition of mouse cytosolic aldehyde dehydrogenase by 4-(diethylamino)benzaldehyde." *Biochem Pharmacol* **37**(8): 1639-1642.
- Rutella, S., Danese, S. y Leone, G. (2006). "Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age." *Blood* **108**(5): 1435-1440.
- Salmi, M. & Jalkanen, S. (2005). "Lymphocyte homing to the gut: attraction, adhesion, and commitment." *Immunol Rev* **206**: 100-113.
- Sauma, D., Michea, P., Lennon-Dumenil, A.M., Fierro, A., Morales, J., Roseblatt, M. y Bono, M.R. (2004). "Interleukin-4 selectively inhibits interleukin-2 secretion by lipopolysaccharide-activated dendritic cells." *Scand J Immunol* **59**(2): 183-189.
- Saurer, L., McCullough, K.C. y Summerfield, A. (2007). "In vitro induction of mucosa-type dendritic cells by all-trans retinoic acid." *J Immunol* **179**(6): 3504-3514.
- Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E.K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W.W. y Pabst, O. (2009). "Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions." *J Exp Med* **206**(13): 3101-3114.
- Seiderer, J., Elben, I., Diegelmann, J., Glas, J., Stallhofer, J., Tillack, C., Pfennig, S., Jurgens, M., Schmechel, S., Konrad, A., Goke, B., Ochsenkuhn, T., Muller-Myhsok, B., Lohse, P. y Brand, S. (2008). "Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD." *Inflamm Bowel Dis* **14**(4): 437-445.
- Sheasley-O'Neill, S.L., Brinkman, C.C., Ferguson, A.R., Dispenza, M.C. y Engelhard, V.H. (2007). "Dendritic cell immunization route determines integrin expression and lymphoid and nonlymphoid tissue distribution of CD8 T cells." *J Immunol* **178**(3): 1512-1522.
- Sigmundsdottir, H. & Butcher, E.C. (2008). "Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking." *Nat Immunol* **9**(9): 981-987.
- Smith, S.M. & Hayes, C.E. (1987). "Contrasting impairments in IgM and IgG responses of vitamin A-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(16): 5878-5882.
- Sousa-Canavez, J.M.d., Massoco, C.d.O., Moraes-Vasconcelos, D.d., Corneta, E.C., Leite, K.R.M. y Camara-Lopes, L.H. (2009). "Retinoic acid inhibits dendritic cell differentiation driven by interleukin-4." *CELLULAR IMMUNOLOGY*: 1-8.
- Stagg, A.J., Kamm, M.A. y Knight, S.C. (2002). "Intestinal dendritic cells increase T cell expression of alpha4beta7 integrin." *Eur J Immunol* **32**(5): 1445-1454.
- Steinman, R.M., Hawiger, D. y Nussenzweig, M.C. (2003). "Tolerogenic dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **21**: 685-711.
- Stephensen, C.B., Rasooly, R., Jiang, X., Ceddia, M.A., Weaver, C.T., Chandraratna, R.A.S. y Bucy, R.P. (2002). "Vitamin A enhances in vitro Th2 development via retinoid X receptor pathway." *J Immunol* **168**(9): 4495-4503.
- Svensson, M., Johansson-Lindbom, B., Zapata, F., Jaensson, E., Austenaa, L.M., Blomhoff, R. y Agace, W.W. (2008). "Retinoic acid receptor signaling levels and antigen dose regulate gut homing receptor expression on CD8+ T cells." *Mucosal immunology* **1**(1): 38-48.
- Svensson, M., Marsal, J., Ericsson, A., Carramolino, L., Brodén, T., Márquez, G. y Agace, W.W. (2002). "CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alpha-beta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa." *J Clin Invest* **110**(8): 1113-1121.

- Swiecki, M. & Colonna, M. (2010). "Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance." *Immunol Rev* 234(1): 142-162.
- Szatmari, I., Pap, A., Rühl, R., Ma, J.-X., Illarionov, P.A., Besra, G.S., Rajnavolgyi, E., Dezsó, B. y Nagy, L. (2006). "PPAR γ controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells." *J Exp Med* 203(10): 2351-2362.
- Tao, Y., Yang, Y. y Wang, W. (2006). "Effect of all-trans-retinoic acid on the differentiation, maturation and functions of dendritic cells derived from cord blood monocytes." *FEMS Immunol Med Microbiol* 47(3): 444-450.
- Tezuka, H. & Ohteki, T. (2010). "Regulation of intestinal homeostasis by dendritic cells." *Immunol Rev* 234(1): 247-258.
- Theodosiou, M., Laudet, V. y Schubert, M. (2010a). "From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway." *Cell. Mol. Life Sci.* 67(9): 1423-1445.
- Theodosiou, M., Laudet, V. y Schubert, M. (2010b). "From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway." *Cell Mol Life Sci* 67(9): 1423-1445.
- Thomson, A.W. (2010). "Tolerogenic dendritic cells: all present and correct?" *Am J Transplant* 10(2): 214-219.
- Tietz, W., Allemand, Y., Borges, E., von Laer, D., Hallmann, R., Vestweber, D. y Hamann, A. (1998). "CD4⁺ T cells migrate into inflamed skin only if they express ligands for E- and P-selectin." *J Immunol* 161(2): 963-970.
- Tisch, R. (2010). "Immunogenic versus tolerogenic dendritic cells: a matter of maturation." *Int Rev Immunol* 29(2): 111-118.
- Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M.H., Yang, B.G., Jung, Y.J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., Kiyono, H., Miyasaka, M., Ishii, K.J. y Akira, S. (2008). "Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5." *Nat Immunol* 9(7): 769-776.
- Vallon-Eberhard, A., Landsman, L., Yogev, N., Verrier, B. y Jung, S. (2006). "Transepithelial pathogen uptake into the small intestinal lamina propria." *J Immunol* 176(4): 2465-2469.
- Verginis, P., Li, H.S. y Carayanniotis, G. (2005). "Tolerogenic semimature dendritic cells suppress experimental autoimmune thyroiditis by activation of thyroglobulin-specific CD4⁺CD25⁺ T cells." *J Immunol* 174(11): 7433-7439.
- von Boehmer, H. (2007). "Oral tolerance: is it all retinoic acid?" *J Exp Med* 204(8): 1737-1739.
- Vuillaume, I., Schraen-Maschke, S., Formstecher, P. y Sablonnière, B. (2001). "Real time RT-PCR shows correlation between retinoid-induced apoptosis and NGF-R mRNA levels." *Biochem Biophys Res Commun* 289(3): 647-652.
- Wada, Y., Hisamatsu, T., Kamada, N., Okamoto, S. y Hibi, T. (2009). "Retinoic acid contributes to the induction of IL-12-hypoproducing dendritic cells." *Inflamm Bowel Dis* 15(10): 1548-1556.
- Wang, C., Kang, S.G., Hogenesch, H., Love, P.E. y Kim, C.H. (2010). "Retinoic Acid Determines the Precise Tissue Tropism of Inflammatory Th17 Cells in the Intestine." *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950).
- Wang, X., Allen, C. y Ballow, M. (2007). "Retinoic acid enhances the production of IL-10 while reducing the synthesis of IL-12 and TNF-alpha from LPS-stimulated monocytes/macrophages." *J Clin Immunol* 27(2): 193-200.

- Watabe, H., Soma, Y., Ito, M., Kawa, Y. y Mizoguchi, M. (2002). "All-trans retinoic acid induces differentiation and apoptosis of murine melanocyte precursors with induction of the microphthalmia-associated transcription factor." *J Invest Dermatol* **118**(1): 35-42.
- WHO (2009). "Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005: WHO global database on vitamin A deficiency." World Health Organization, Geneva.
- Xavier, R.J. & Podolsky, D.K. (2007). "Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease." *Nature* **448**(7152): 427-434.
- Xu, L., Kitani, A. y Strober, W. (2010). "Molecular mechanisms regulating TGF-beta-induced *Foxp3* expression." *Mucosal immunology* **3**(3): 230-238.
- Yamazaki, S. & Steinman, R.M. (2009). "Dendritic cells as controllers of antigen-specific *Foxp3*+ regulatory T cells." *J Dermatol Sci* **54**(2): 69-75.
- Yokota, A., Takeuchi, H., Maeda, N., Ohoka, Y., Kato, C., Song, S.-Y. y Iwata, M. (2009a). "GM-CSF and IL-4 synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid-producing capacity." *International Immunology* **21**(4): 361-377.
- Yokota, A., Takeuchi, H., Maeda, N., Ohoka, Y., Kato, C., Song, S.-Y. y Iwata, M. (2009b). "GM-CSF and IL-4 synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid-producing capacity." *International Immunology* **21**(4): 361-377.
- Yokota, A., Takeuchi, H., Maeda, N., Ohoka, Y., Kato, C., Song, S.Y. y Iwata, M. (2009c). "GM-CSF and IL-4 synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid-producing capacity." *Int Immunol* **21**(4): 361-377.
- Zapata-Gonzalez, F., Rueda, F., Petriz, J., Domingo, P., Villarroya, F., De Madariaga, A. y Domingo, J.C. (2007). "9-cis-Retinoic acid (9cRA), a retinoid X receptor (RXR) ligand, exerts immunosuppressive effects on dendritic cells by RXR-dependent activation: inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks some of the 9cRA activities, and precludes them to mature phenotype development." *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) **178**(10): 6130-6139.
- Zaragozá, R., Gimeno, A., Miralles, V.J., García-Trevijano, E.R., Carmena, R., García, C., Mata, M., Puertes, I.R., Torres, L. y Viña, J.R. (2007). "Retinoids induce MMP-9 expression through RARalpha during mammary gland remodeling." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**(4): E1140-1148.