

UCH-FC
Biotecnología
H 632
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACION DEL EFECTO DE LA INCORPORACION DE FAGOSOMAS
ALOGENICOS PURIFICADOS EN LA RESPUESTA INMUNE *IN VIVO***

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

INGENIERO EN BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

POR

YESSIA CESSIA HIDALGO FADIC

Director de Seminario de Título: Dra. María Rosa Bono



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

YESSIA CESSIA HIDALGO FADIC

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE FAGOSOMAS ALOGÉNICOS PURIFICADOS EN LA RESPUESTA INMUNE IN VIVO”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dra. María Rosa Bono Merino
Directora del Seminario de Título

Handwritten signature in blue ink of Dra. María Rosa Bono Merino, written over a horizontal line.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Elías Utreras Puratich
Presidente

Handwritten signature in black ink of Dr. Elías Utreras Puratich, written over a horizontal line. To the right of the signature is a circular stamp that reads "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL", and "U. DE CHILE" with stars.

Dr. Miguel Allende Connelly
Evaluador

Handwritten signature in blue ink of Dr. Miguel Allende Connelly, written over a horizontal line.

Santiago de Chile, noviembre de 2012



Nací en la “ciudad de la eterna primavera” Arica. Hija de Jorge y Yessia. Tengo tres hermanos: Aarón, Jonatán y Daniel.

De niña puedo decir que era tranquila, bastante observadora y me encantaba realizar diversas actividades, hacía gimnasia artística, ballet y cantaba en un coro.

Siempre me ha gustado la biología, la química y las matemáticas. Pero al transcurrir el tiempo mis ambiciones se enfocaron en áreas más biológicas. Cuando estaba en primero medio tenía claro que mi área sería algo científico, pero no tenía idea de las posibilidades que existían en Chile, simplemente un día me senté frente al computador y dije: hoy decido que estudiaré. Me puse a investigar y encontré que en la Universidad de Chile se impartía la carrera Ingeniería en biotecnología molecular, la cual llenaba todas mis expectativas. A lo largo de mi carrera nunca dude de la decisión que había tomado.

En estos momentos, estoy terminando mi primera etapa de estudios superiores. Estoy orgullosa de los logros obtenidos, pero a la vez ansiosa... Esto está recién comenzando...

*“La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad.”
Julio Verne*

A mi familia



Agradecimientos

Este trabajo marca el final de una etapa, la cual comencé hace ya varios años. Es por esto que quiero agradecer a las personas que me han acompañado en esta travesía.

En primer lugar agradezco a María Rosa Bono y Mario Roseblatt por permitirme entrar al laboratorio y dejar que me desarrollara como científica, así también por sus valiosos aportes y observaciones hacia mis experimentos.

En especial manera quiero agradecer a mis amigos de laboratorio a Sarah por ser mi amiga desde nuestros inicios de la carrera, a Paulina por toda su ayuda en mis experimentos y a Leonardo por toda su abnegación hacia mi y por ser su "preferida". No puedo dejar de mencionar a mis compañeros de laboratorio Ale, Paula, Gaby, Vale, Naty y Juanjo gracias por su buen humor y compañía, a Daniela por su paciencia y disposición para responder mis dudas. Pamela y Oscar muchas gracias por su trabajo, ya que con éste alivianan el nuestro.

A Cinthia agradezco todo lo que me enseñó cuando recién entraba al laboratorio. A mis amigas Katy, Mónica y Piera que con sus conversaciones hacen que mire la vida de otro modo. A Alfredo por estar siempre cuando lo necesito. A Eduardo infinitas gracias por sus consejos, su apoyo y su compañía.

Finalmente, debo agradecer a mi familia: a mi papá porque siempre me ha apoyado generosamente en todo lo que he emprendido, a mi mamá por creer en mí, a Daniel por escucharme y cambiar el mundo cada vez que podemos, a Jonatán y a Aarón porque desde lejos han estado conmigo.

A todos ustedes muchas gracias por estar en mi vida.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS	I
INDICE DE FIGURAS	IV
ABREVIATURAS	V
GLOSARIO	VII
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCION	5
3.1. Células dendríticas y tolerancia	5
3.2. Tolerancia central y periférica	8
3.3. Inmunidad en trasplante	9
3.4. Trasplante y las drogas inmunosupresoras	11
3.5. Administración de aloantígenos para la producción de tolerancia	12
4. HIPOTESIS	14
5. OBJETIVO GENERAL	14
6. OBJETIVOS ESPECIFICOS	14
7. MATERIALES Y METODOS	15
7.1. Materiales	15
7.1.1. Animales	15
7.1.2. Anticuerpos	15
7.1.3. Reactivos	15
7.2. Métodos	16
7.2.1. Citometría de flujo	16
7.2.2. Generación de células dendríticas de médula ósea	17

7.2.3. Obtención de fagosomas-PLGA	18
7.2.4. Determinación del tiempo óptimo de fagocitosis para la obtención de fagosomas	19
7.2.5. Determinación de la presencia de membrana en los fagosomas-PLGA	20
7.2.6. Determinación de la presencia de proteínas en los fagosomas-PLGA	21
7.2.7. Inyección de fagosomas-PLGA alogénicos e inmunización de ratones	21
7.2.8. Medición de niveles de aloanticuerpos en sueros	22
7.2.9. ELISPOT	23
7.2.10. Análisis estadístico	24
8. RESULTADOS	26
8.1 Producción de células dendríticas inmaduras para la generación de fagosomas	26
8.2. Comparación del shock osmótico y la lisis mecánica para generar fagosomas	29
8.3. Estandarización del tiempo óptimo de fagocitosis	31
8.4. La fagocitosis no altera el fenotipo inmaduro de las DCs	33
8.5. Los fagosomas obtenidos por shock osmótico poseen membranas y proteínas que provienen de las DCs inmaduras	35
8.6. Los fagosomas alogénicos disminuyen la respuesta inmune humoral en ratones C57BL/6	37

8.7. Los fagosomas alogénicos disminuyen la respuesta inmune celular en ratones C57BL/6	40
8.8. Efecto de la dosis de fagosomas en la producción de tolerancia inmune	42
9. DISCUSION	45
10. RESUMEN DE RESULTADOS	55
11. CONCLUSION	55
12. BIBLIOGRAFIA	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Fenotipo de células dendríticas inmaduras	28
Figura 2	Obtención de fagosomas por shock osmótico y lisis mecánica	30
Figura 3	Estandarización del tiempo óptimo de fagocitosis	32
Figura 4	La fagocitosis no altera el fenotipo inmaduro de las DCs	34
Figura 5	Los fagosomas obtenidos por shock osmótico presentan membrana y proteínas provenientes de las DCs inmaduras	36
Figura 6	Pre-tratamiento con fagosomas alogénicos disminuyen la secreción de aloanticuerpos	39
Figura 7	La administración de fagosomas alogénicos inhibe la respuesta inmune celular	41
Figura 8	Dosis respuesta de fagosomas en la respuesta inmune humoral	43
Figura 9	Dosis respuesta de fagosomas en la respuesta inmune celular	44

ABREVIATURAS

2-ME:	2-mercaptoetanol
APCs:	Células presentadoras de antígenos
APC:	Aloficocianina
ARN:	Ácido ribonucleico
BSA:	Albúmina sérica de bovino
CTLA-4:	Antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico.
DCs:	Células dendríticas
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISPOT:	<u>Enzyme-linked Immunosorbent Spot</u>
FBS:	Suero fetal bovino
FDA:	Administración de Alimentos y Medicamentos
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF:	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos
GVHD:	Enfermedad del injerto contra el huésped
HRP:	Peroxidasa de rábano
IFN- γ :	Interferón gamma
Igs:	Inmunoglobulinas
IL:	Interleuquina
IMF:	Intensidad Media de Fluorescencia
i.p:	Intraperitoneal
i.v:	Intravenosa
LB:	Linfocitos B

LT:	Linfocitos T
MHC:	Complejo mayor de histocompatibilidad
MHC-I:	Complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I
MHC-II:	Complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II
MVB:	Cuerpos multivesiculares
PBS:	Tampón fosfato salino
PD1:	Proteína de muerte celular programada de tipo 1
PD-L1:	Ligando 1 de muerte celular programada de tipo 1
PD-L2:	Ligando 2 de muerte celular programada de tipo 1
PE:	Ficoeritrina
PE-Cy7:	Ficoeritrina-Cianina 7
PI:	Yoduro de propidio
PLGA:	Ácido poliláctico-co-glicólico
RC:	Célula respondedora
RPMI 1640:	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SEM:	Error estándar de la media
SSA:	<i>Side scattered area</i>
TCR:	Receptores de linfocitos T
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral α

GLOSARIO

Aloanticuerpo: Anticuerpo que reacciona con un aloantígeno.

Aloantígeno: Molécula que proviene de otro organismo (trasplante) y que es reconocida como extraña.

Alogénico: Tejidos o células provenientes de un individuo de la misma especie, pero de distinta estirpe o cepa.

Haplotipo: Es la región genética de un cromosoma que contiene todos los genes H-2. Así, un haplotipo H-2 incluye los genes clase I y los genes clase II y otros loci situados también en esta región. Estos genes presentan un alto polimorfismo, por lo que organismos de la misma especie pueden tener haplotipos H-2 distintos.

Fagosoma: Microesfera rodeada de membrana plasmática y proteínas procedente de la célula que realizó la fagocitosis de la microesfera.

Fagosoma-PLGA: Fagosoma generado por la fagocitosis de una microesfera de PLGA.

Grey: Unidad de radiación que mide la dosis absorbida de radiaciones ionizantes por un tejido o material.

Órganos linfoides primarios: Son órganos donde se generan los linfocitos. Se constituyen por el timo y la médula ósea.

Órganos linfoides secundarios: Son lugares donde se genera una respuesta inmune contra el antígeno. Se constituyen por el bazo, los ganglios y las placas de Peyer.

Singénico: Tejidos o células provenientes de un individuo de la misma especie y de la misma estirpe o cepa.

SSA: Parámetro utilizado en citometría de flujo que se refiere a la granulosidad o complejidad interna de la muestra analizada.

Respuesta inmune celular: Respuesta inmune de tipo adaptativa mediada por células, principalmente por linfocitos T.

Respuesta inmune humoral: Respuesta inmune de tipo adaptativa mediada por anticuerpos que son secretados por linfocitos B.

1. RESUMEN

Las células dendríticas (DCs) son esenciales para el inicio de una respuesta inmune adaptativa ya que son las únicas células capaces de activar a los linfocitos T vírgenes. Además estas células tienen la capacidad de inducir inmunidad y tolerancia dependiendo de su estado de activación. Debido a esto, las DCs son ampliamente estudiadas en relación a los trasplantes, donde los procesos de inmunidad y tolerancia se encuentran estrechamente vinculados.

En la actualidad, para inducir la aceptación de órganos a largo plazo se utilizan drogas inmunosupresoras, las cuales al no ser específicas contra el trasplante generan en el paciente un estado de inmunosupresión que desencadena infecciones por patógenos oportunistas, desarrollo de neoplasias, además de la citotoxicidad que poseen muchos de ellos. Una estrategia para disminuir la respuesta inmune alogénica consiste en entregar aloantígenos en un contexto no inmunogénico. En nuestro laboratorio hemos desarrollado un protocolo de administración de aloantígenos mediante la utilización de vesículas denominadas fagosomas, provenientes de las DCs inmaduras. El objetivo de este Seminario de Título fue optimizar la producción de fagosomas para generar fracciones enriquecidas, las cuales fueron probadas en un modelo *in vivo* como pre-tratamiento a la aloinmunización. Los fagosomas fueron analizados mediante citometría de flujo y los resultados se resumen a continuación: (1) la lisis por shock osmótico de las DCs que han fagocitado microesferas de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), genera fracciones más enriquecidas de fagosomas en comparación a la lisis mecánica; (2) el tiempo óptimo para la producción de fagosomas es 2 h de fagocitosis por parte de

las DCs; (3) la fagocitosis de las microesferas de PLGA no induce la activación de las DCs y (4) los fagosomas generados presentan membrana plasmática y proteínas provenientes de las DCs inmaduras. La administración *in vivo* de fagosomas alogénicos produjo una reducción significativa de la secreción de aloanticuerpos y el número de linfocitos T aloreactivos. Por lo tanto, los fagosomas alogénicos constituyen una manera adecuada para administrar aloantígenos de forma tolerogénica, ya que disminuyen la respuesta inmune humoral y celular.

La capacidad de los fagosomas de reducir la respuesta inmune los convierte en una posible herramienta para ser utilizada en trasplante donde, en conjunto con otros mecanismos inmunosupresores como el uso de cantidades bajas de drogas inmunosupresoras, se podría regular la respuesta aloinmune y la aceptación del trasplante a largo plazo.

2. ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are essential to initiate adaptive immune responses because of their unique ability to activate naive T lymphocytes. In addition, these cells are able to induce immunity and tolerance depending of their activation state. Because of that DCs are widely studied in relation to organ transplantation, where the processes of immunity and tolerance are closely linked.

Current treatments to induce long-term organ acceptance require the use of immunosuppressive drugs. These drugs do not target the transplant immune response specifically but rather cause a generalized immunosuppression that, in addition to their known cytotoxic effects, render patients vulnerable to opportunistic pathogens and neoplasia. A strategy to reduce the allogeneic immune responses is the delivery of alloantigens in a non-immunogenic context. In our laboratory, we have developed a protocol of alloantigen administration using phagosomes, which are vesicles derived from immature DCs. The objective of this work was to optimize the phagosome production in order to generate enriched samples, which were tested in an *in vivo* model as an alloimmunization pretreatment. Phagosomes were analyzed by flow cytometry obtaining the following results: (1) osmotic shock lysis of DCs which have phagocytized polylactic-co-glycolic acid (PLGA) microspheres, allows better yields of phagosome-enriched samples than mechanical lysis; (2) the optimal production of phagosomes was obtained after 2 h of microsphere phagocytosis by the DCs; (3) PLGA microsphere

phagocytosis does not induce DC activation and (4) the phagosomes contain plasma membrane and proteins derived from immature DCs.

Allogeneic phagosome administration *in vivo* shows a significant reduction of secretion of alloantibodies and the number of alloreactive T lymphocytes. Because of decreased humoral and cellular immune response observed after their administration, the use of allogeneic phagosomes constitutes a suitable system for alloantigen administration in a tolerogenic context.

The capacity of phagosomes to decrease the immune response generates a possible tool that can be exploited in the transplant treatments field, because in combination with others immunosuppressive mechanisms as the use of low doses of immunosuppressive drugs, could regulate the alloimmune response and long-term acceptance.

3. INTRODUCCION

Macrófagos, linfocitos B (LB) y células dendríticas (DCs), denominadas en su conjunto células presentadoras de antígenos (APCs), poseen la capacidad de presentar antígenos extracelulares. Sin embargo, las DCs son las únicas células capaces de activar linfocitos T (LT) CD4+ y CD8+ vírgenes y por esta razón son llamadas APCs profesionales (Walseng y col., 2010). De esto se deduce que las DCs son esenciales para el inicio de la respuesta inmune adaptativa, pero además dependiendo de su estado de maduración generan inmunidad o tolerancia frente al estímulo (Ureta y col., 2007; Morelli y Thomson, 2007; Maldonado y von Andrian, 2010). Ésto es importante en la inmunología de trasplantes, tema central de este trabajo, ya que ambos procesos se encuentran estrechamente relacionados.

3.1. Células dendríticas y tolerancia

Las DCs constituyen una población heterogénea de APCs derivadas de progenitores presentes en la médula ósea. Las DCs provienen de diferentes linajes celulares (mieloides y linfoides) y se localizan en numerosos tejidos. Además, las DCs tienen la capacidad de migrar y se encuentran presentes en diferentes estados de activación o maduración (Morelli y Thomson, 2007; Watowich y Liu, 2010). Asimismo, las DCs secretan determinados patrones de citoquinas gracias a las cuales se produce la comunicación con otros tipos celulares. De esta manera, por ejemplo las DCs entregan señales que permiten direccionar los linfocitos hacia determinados tejidos (Mora y col., 2003; Sigmundsdottir y Butcher, 2008; Thaïss y col., 2011).

Los LT se generan en el órgano linfóide primario llamado timo y luego en su estado maduro circulan por los órganos linfoides secundarios tales como el bazo, las placas de Peyer y los ganglios linfáticos, lugares donde interactúan con los antígenos. Por otro lado, las DCs se encuentran en estado inmaduro en los tejidos periféricos, donde fagocitan los antígenos presentes en los tejidos, para luego migrar a los órganos linfoides secundarios donde se encuentran con los LT. Las DCs maduran en este trayecto hacia los órganos linfoides secundarios y se transforman de células con alta capacidad fagocítica a células especializadas en la presentación de antígenos. La maduración de las DCs se refleja principalmente en varios cambios fenotípicos que incluyen: 1) aumento en la producción de moléculas de presentación antigénica o moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), 2) la expresión de moléculas de coestimulación para los LT como lo son CD86 y CD40, 3) la producción de factores de crecimiento como la interleuquina 2 (IL-2), citoquinas y la expresión de varias citoquinas tales como IL-12, TNF- α , IL-1, IL-6 y quimioquinas (Lutz y Schuler, 2002; Steinman y col., 2003; Walseng y col., 2010).

La tolerancia es inducida cuando la captura y presentación de antígenos por parte de las DCs ocurre en un ambiente no inflamatorio, debido a lo cual las DCs permanecen en un estado inmaduro determinado por una baja expresión de moléculas coestimuladoras y la secreción de citoquinas inmunosupresoras como IL-10. Esta citoquina se encuentra implicada en la generación de los LT reguladores que tienen como función suprimir la respuesta inmune (Ohkura y Sakaguchi, 2010; Yamaguchi y col., 2011; Schmidt y col., 2012).

La generación de inmunidad o tolerancia es regulada importantemente por moléculas coestimuladoras presentes en las DCs las cuales entran en contacto con los LT. Las DCs expresan moléculas de coestimulación pertenecientes a la familia B7, las cuales interactúan con CD28 expresada de forma constitutiva en todos los LT. Una de las moléculas de la familia B7, CD86, se expresa en forma constitutiva pero en bajos niveles en las DCs y su expresión aumenta rápidamente cuando se une a CD28 presente en los LT produciendo de esta forma inmunidad. Por otro lado, otro miembro inducible de la familia B7, CD80, se expresa tardíamente en las APCs durante la respuesta inmune y ha sido asociado principalmente con tolerancia (Yang y col., 2011; Puliaeva y col., 2011). De esta forma, cuando la señalización a través de CD28 no supera el umbral para generar activación celular, aumenta la estabilidad del ácido ribonucleico (ARN) mensajero de la IL-2, con un subsecuente aumento de la producción de IL-2, lo que promueve la proliferación y la resistencia a la maduración en los LT, induciendo finalmente la muerte celular por apoptosis (Mueller, 2009; Wood y Goto, 2012).

Durante la respuesta inmune, los LT activan tardíamente la expresión del antígeno 4 asociado al LT citotóxico (CTLA-4 ó CD152), esta molécula que tiene una alta homología con CD28, atenúa la respuesta inmune ya que compite con CD28 con una mayor afinidad por la unión a CD80 y a CD86. Otro efecto de la señalización a través de CD28 es la regulación positiva de moléculas coestimuladoras como el ligando para CD40 (CD40L ó CD154) presente en los LT. La unión de CD40L a CD40 presente en las DCs produce un aumento en la expresión de moléculas pertenecientes a la familia B7, por lo tanto amplifica la activación de los LT (Mueller,

2010; Wood y Goto, 2012). Otra molécula de la familia B7, es el ligando 1 de muerte celular programada de tipo 1 (PD-L1) presente en las DCs, el cual se une al receptor de muerte programada de tipo 1 (PD1) que es expresado en los LT activados. Este complejo es importante en la inhibición de la respuesta aloinmune, así como en la inducción y mantención de la tolerancia periférica (Mueller, 2010; Yang y col., 2011). Existen dos ligandos para PD1, PD-L1 y PD-L2 (ligando 2 de muerte celular programada de tipo 1), pero sólo PD-L1 tiene un rol importante en la inhibición de los LT auto-reactivos y en la mantención a largo plazo del estado anérgico de los LT (Keir y col., 2006; Fife y col., 2006).

En resumen, durante la respuesta inmune, la interacción de los LT con las DCs se encuentra influenciada por varios aspectos que incluyen el balance de señales positivas (CD28, CD40L) y negativas (CTLA-4, PD-1), además de la avidéz y afinidad de las interacciones entre los receptores de los LT (TCR) y el complejo péptido-MHC de las DCs, durante la presentación antigénica (Wood y Goto, 2012).

3.2. Tolerancia central y periférica.

La tolerancia inmune se define como el estado de no respuesta inmunológica frente a un antígeno particular. Actualmente se han identificado dos tipos de tolerancia denominadas central y periférica, las cuales permiten que las células no reaccionen frente antígenos propios.

En los individuos, la discriminación de lo propio y lo ajeno la realizan los LT quienes poseen un repertorio de receptores producidos al azar para los antígenos. Este amplio repertorio permite que los LT tengan la capacidad de responder ante

cualquier potencial antígeno extraño y al mismo tiempo no responden frente a antígenos propios expresados en los diversos tejidos. Este aprendizaje se produce en el timo. Durante su desarrollo, los LT experimentan arreglos al azar en regiones específicas de genes que codifican para los receptores de antígenos, generando LT capaces de reconocer antígenos presentados en las moléculas MHC del individuo. Esta interacción permite que los LT sobrevivan, mientras que los LT que no son capaces de reconocer el complejo péptido-MHC se les induce apoptosis, proceso denominado selección positiva. Durante el proceso de arreglos génicos inevitablemente se generan LT capaces de unir el complejo péptido-MHC con alta afinidad. Estos LT son potenciales células auto-reactivas, las cuales son eliminadas mediante apoptosis durante la selección negativa (Griesemer y col., 2010; Hernandez y col., 2010). Los LT auto-reactivos que no son eliminados en el timo, son controlados en la periferia por un tipo particular de LT llamados LT reguladores, los cuales tienen como función suprimir la acción de LT efectores produciendo la tolerancia inmune (Ohkura y Sakaguchi, 2010; Yamaguchi y col., 2011; Schmidt y col., 2012).

3.3. Inmunidad en trasplante

Durante el trasplante se produce una respuesta inmune de rechazo al injerto esencialmente por el reconocimiento de moléculas del MHC que provienen del donante o aloantígenos. El reconocimiento de aloantígenos por parte de los LT del receptor ocurre principalmente por dos mecanismos: 1) la presentación directa, responsable del rechazo agudo y 2) la presentación indirecta, responsable del

rechazo crónico de los trasplantes. Durante la presentación directa, los LT del receptor reconocen como extrañas las moléculas del MHC presentes en las APCs del donante, mientras que en la presentación indirecta, las APCs del receptor capturan y procesan aloantígenos provenientes del órgano trasplantado y los presentan a los LT del receptor (Morelli y Thomson, 2007; Ezzelarab y Thomson, 2011; Wood y Goto, 2012).

La vía directa de presentación de antígenos es considerada el mecanismo principal que permite el rechazo agudo del injerto, cuya influencia disminuye con el tiempo después del trasplante. Por otro lado, la vía indirecta es el principal mecanismo de aloreconocimiento en tiempos tardíos después del trasplante, lo que está relacionado con rechazo crónico (Morelli y Thomson, 2007; Ezzelarab y Thomson, 2011).

Específicamente se han descrito 3 tipos de rechazo: 1) El rechazo hiperagudo que ocurre minutos u horas después de la realización del trasplante y es causado por anticuerpos circulantes pre-generados sobre el endotelio del injerto, lo que provoca la activación del complemento. Este tipo de rechazo raramente ocurre y en general se previene realizando trasplantes entre pacientes con el mismo grupo sanguíneo, además de descartar la presencia de aloanticuerpos contra el donante antes de realizar el trasplante a través de pruebas cruzadas. 2) El rechazo agudo ocurre en las primeras semanas o meses después del trasplante y es causado por la respuesta inmune innata y adaptativa. En general, este tipo de rechazo se previene con inmunosupresión. 3) El rechazo crónico ocurre meses o años después del trasplante y es causado por mecanismos inmunes y no inmunes. Por lo general, este

tipo de rechazo no se puede prevenir con los agentes inmunosupresores utilizados actualmente (Morelli y Larregina, 2010; Burns y Chong, 2011).

3.4. Trasplante y las drogas inmunosupresoras

El uso de drogas inmunosupresoras permite inducir la aceptación de órganos a largo plazo. El principal problema en trasplantes radica en que, tarde o temprano, la activación constante de la respuesta inmune gatillada por los antígenos del donante, termina por generar el rechazo del órgano. Esta reacción se produce porque el trasplante es reconocido como un agente extraño debido a la expresión de sus propias moléculas, principalmente moléculas del MHC, las cuales al ser procesadas por las APCs del receptor del trasplante activan las células del sistema inmune. Este problema es resuelto en parte por el tratamiento de por vida con fármacos inmunosupresores que previenen el desarrollo de respuestas inmunes.

El uso de fármacos inmunosupresores presenta varios problemas asociados a la inespecificidad del tratamiento, ya que estos fármacos producen una depresión general del sistema inmune del paciente, lo que facilita el desarrollo de enfermedades infecciosas y cáncer, además de producir neurotoxicidad, hipertensión y problemas cardiovasculares debido al uso de corticosteroides (Lechler y col., 2005; Golshayan y col., 2007; Sykes, 2007). Las desventajas de la terapia inmunosupresora han llevado a la necesidad de inventar nuevas estrategias para prescindir de los inmunosupresores. De esta manera, uno de los principales objetivos de la inmunología actual es generar una terapia que permita inducir tolerancia específica contra los aloantígenos del donante, para así evitar o disminuir

el uso los fármacos inmunosupresores y con esto expandir las aplicaciones de los trasplantes de órganos. Aprovechando los conocimientos actuales acerca de tolerancia inmune, se enmarca este Seminario de título que pretende proponer una nueva estrategia para inducir tolerancia aloantígeno-específica.

3.5. Administración de aloantígenos para la producción de tolerancia.

En la literatura se han descrito algunas estrategias para entregar aloantígenos de manera no inmunogénica. En los seres vivos las células envejecidas o aquellas que mueren para mantener la homeostasis celular, se les induce apoptosis y no son reconocidas como señales de peligro, por lo cual no generan inmunidad (Kazama y col., 2009). Se ha observado que las células apoptóticas inducen la producción de citoquinas tolerogénicas como IL-10 y además provocan una disminución en la secreción de citoquinas proinflamatorias por las APCs (Morelli y Larregina, 2010). Por otra parte, se ha demostrado que la transfusión de células apoptóticas en combinación con el bloqueo de la interacción CD40-CD154 provoca un aumento considerable en la supervivencia del trasplante, sugiriendo que la administración de células apoptóticas produce tolerancia (Gurung y col., 2010).

Otra forma de administrar aloantígenos es a través de los exosomas que son nanovesículas derivadas de la membrana celular que se forman en el compartimiento endocítico y son secretados al espacio extracelular de determinados tipos celulares. Se ha observado que los exosomas derivados de DCs presentan moléculas del MHC de tipo II (MHC-II), moléculas de adhesión y moléculas de coestimulación como CD80 y CD86, (Théry y col., 2002; Morelli, 2006).

Una última estrategia para la entrega de aloantígenos son los fagosomas. La incorporación de partículas inertes o bacterias por parte de las DCs ocurre por fagocitosis, proceso por el cual las partículas son encerradas por una membrana, generando el fagosoma (Desjardins y col., 1994a). Las DCs son células altamente fagocíticas que pueden ingerir microesferas de látex y producir fagosomas completamente equipados para el procesamiento de antígenos y la carga de estos mismos (Lennon-Dumenil y col., 2002; Ureta y col., 2007). Los estudios que demuestran que los fagosomas son organelos capacitados para la presentación de antígenos provienen del análisis de estudios de proteómica (Houde y col., 2003).

Considerando lo mencionado anteriormente, los fagosomas aislados y purificados podrían ser utilizados como vehículos de carga de antígenos en el contexto de la presentación antigénica. En nuestro laboratorio, evaluamos la generación de fagosomas utilizando microesferas de PLGA como alternativa a las partículas de látex. El PLGA tiene la ventaja de ser un polímero biodegradable aceptado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para tratamientos terapéuticos.

En este Seminario de Título se trabajó en la optimización de un protocolo para la obtención de fracciones enriquecidas de fagosomas, generados a partir de DCs inmaduras. Considerando que los fagosomas constituyen un vehículo de carga y entrega de aloantígenos de manera no inmunogénica, estos fagosomas fueron probados en un modelo *in vivo*, analizando su efecto en la respuesta inmune humoral y celular.

4. HIPOTESIS

Los fagosomas alogénicos producidos por lisis osmótica de células dendríticas inmaduras que han fagocitado partículas de PLGA, generan una disminución de la respuesta aloinmune.

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de fagosomas alogénicos en la respuesta aloinmune.

6. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Optimizar la generación de fagosomas alogénicos por lisis osmótica a partir de células dendríticas inmaduras derivadas de médula ósea.
- 2) Determinar el tiempo óptimo de fagocitosis para la generación de fagosomas alogénicos.
- 3) Evaluar la presencia de membrana y proteínas proveniente de las células dendríticas en los fagosomas alogénicos.
- 4) Evaluar el efecto de los fagosomas alogénicos en la respuesta inmune humoral en ratones C57BL/6.
- 5) Evaluar el efecto de los fagosomas alogénicos en la respuesta inmune celular en ratones C57BL/6.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. MATERIALES

7.1.1. Animales

Se usaron ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 de 2 a 4 meses de edad, los cuales poseen haplotipos H-2^d y H-2^b respectivamente. Ambas cepas se adquirieron en Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Los animales fueron mantenidos en un bioterio convencional y los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

7.1.2. Anticuerpos

Para los análisis de citometría de flujo se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales de Pharmingen (BD Biosciences) conjugados a FITC: anti-I-Ad (clon AMS-32.1); anti-CD86 (clon GL1); anti-CD80 (clon 16-10A1); anti-CD11c (clon HL3). Conjugados a PE: anti-CD11c (clon HL3); anti-H-2Kd (clon SF1-1.1); anti-PD-L1 (clon MIH5). Conjugados a PE-Cy7: anti-CD45R o anti-B220 (clon RA3-6B2). Conjugados a APC: anti-CD83 (clon Michel-19); anti-CD11c (clon HL3); anti-PD-L2 (clon TY25). El anticuerpo anti-CD40 (clon 1C10) fue adquirido de e-Bioscience. Además se usó el anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón conjugado a FITC (Dako).

7.1.3. Reactivos

General: BD ELISPOT Mouse IFN- γ Set (BD Biosciences); placas con filtro para ELISPOT (Millipore); Tween-20 (Sigma-Aldrich); agua bidestilada (Sanderson); peróxido de hidrógeno (Millipore); PKH26 (Sigma); albúmina sérica de bovino (BSA, Sigma); Cytofix Cytoperm (BD Biosciences); yoduro de propidio (PI, Sigma); microesferas de PLGA (colaboración Dr. S. Little, University of Pittsburgh, PA, USA).

Cultivo Celular: Medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco); tripsina-EDTA (Gibco); L-glutamina; penicilina/estreptomicina (Gibco); suero fetal bovino (FBS, HyClone); placas microbiológicas de 140 mm x 20 mm (Sterilin); buffer de lisis de glóbulos rojos (e-Bioscience); tampón fosfato salino (PBS, Invitrogen); 2-mercaptoetanol (2-ME, Invitrogen); etanol 95% (Lab-Tec).

7.2. MÉTODOS

7.2.1. Citometría de flujo

Para la detección de moléculas de superficie, las DCs se incubaron durante 20 min a 4°C con las correspondientes combinaciones de anticuerpos diluidos en PBS + 2% FBS. Posteriormente, las células se lavaron con PBS + 2% FBS y se centrifugaron a 450 x g durante 7 min a 4°C. Finalmente, las células se resuspendieron en PBS + 2% FBS a una concentración de 1×10^6 células/ml para luego ser analizadas en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences). Las células muertas fueron descartadas utilizando PI (1 μ g/ml por cada 1×10^6 células). Los análisis de los datos se hicieron utilizando el software FlowJo (Tree Star, Inc.).

7.2.2. Generación de células dendríticas de médula ósea

Las DCs se generaron a partir de células precursoras de médula ósea extraídas de tibias y fémures de ratones BALB/c. Los huesos fueron desinfectados con etanol al 70% por 1 min y se perfundieron con medio RPMI en campana. Luego las médulas fueron disgregadas por agitación vigorosa y los glóbulos rojos fueron lisados incubando las células durante 5 min a temperatura ambiente en 1 ml de solución hipotónica de cloruro de amonio (buffer de lisis de glóbulos rojos). Posteriormente las células se lavaron con medio RPMI completo (RPMI suplementado con 10% FBS, L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomomicina (100 µg/ml)) y luego se centrifugaron a $600 \times g$ por 7 min a 4°C. Las células se cultivaron por 12 días en placas de Petri bacteriológicas de 140 mm a una densidad de 10^7 células totales en 20 ml de medio RPMI completo + 2-ME (50 µM) + sobrenadante de la línea celular J558L al 3% (v/v). Este sobrenadante se agregó como fuente de factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos murino (GM-CSF) para lograr la diferenciación de los precursores de médula ósea a DCs. Las células precursoras de DCs fueron incubadas a 37°C en 5% de CO₂. A los días 4 y 8 de cultivo se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco completo. Las células no adherentes como las adherentes fueron recuperadas y lavadas con PBS. Posteriormente se tripsinizaron durante 6 min a 37°C, se lavaron con medio RPMI completo, se centrifugaron a $450 \times g$ por 7 min a 4°C, luego ambas fracciones de células se juntaron y se sembraron en las mismas condiciones que al inicio del cultivo. Finalmente al día 12 de cultivo, ambas fracciones de células desde las placas fueron recuperadas y con 5×10^6 células se hizo el análisis fenotípico mediante

citometría de flujo utilizando los marcadores de superficie CD11c, I-Ad, CD80, CD86, CD83, CD40, PD-L1 y PD-L2. Las DCs restantes se utilizaron para la obtención de fagosomas-PLGA.

7.2.3. Obtención de fagosomas-PLGA

Los fagosomas-PLGA se prepararon a partir de DCs provenientes de precursores de médula ósea de ratones BALB/c. Luego de 12 días de cultivo, 5×10^7 DCs adherentes y no adherentes se incubaron por 20 min a 37°C en un tubo de 50 ml con $2,5 \times 10^8$ de microesferas de PLGA en 2,6 ml de medio RPMI completo. Posteriormente, se agregaron 4 ml de medio RPMI completo tibio y se centrifugó a $400 \times g$ por 2 min a temperatura ambiente. Sin retirar el sobrenadante ni resuspender las células, las DCs junto a las microesferas se incubaron durante 100 min adicionales a 37°C para completar 2 horas de fagocitosis. La fagocitosis se detuvo con 4 lavados de 50 ml de PBS frío y centrifugación a $420 \times g$ por 7 min a 4°C entre cada lavado. Finalmente las células fueron resuspendidas en 500 μl de PBS frío y se traspasaron a dos tubos de 1,5 ml (250 μl c/u).

Para la obtención de los fagosomas-PLGA se utilizaron 2 metodologías: 1) lisis mecánica y 2) lisis por shock osmótico. La lisis mecánica consistió en pasar las células 50 veces por una jeringa con aguja de 21G. Mientras que, la lisis por shock osmótico se realizó por la adición de 250 μl de H_2O bidestilada a 250 μl de células por un min y el proceso se detuvo añadiendo un volumen de PBS 1,5x. Una vez finalizada la lisis mecánica o el shock osmótico, se centrifugó a $450 \times g$ por 7 min a

4°C recuperando el sobrenadante, fracción en la cual se encuentran los fagosomas-PLGA. Éstos se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

Para estimar la pureza de los fagosomas, se utilizaron microesferas de PLGA-Alexa 647. La pureza de los fagosomas se determinó comparando el porcentaje de partículas fluorescentes con el porcentaje de restos celulares no fluorescentes mediante citometría de flujo. La cantidad de fagosomas-PLGA obtenidos fue estimada midiendo la cantidad de proteína total en la muestra mediante fluorometría, utilizando la plataforma de cuantificación Qubit® siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.2.4. Determinación del tiempo óptimo de fagocitosis para la obtención de fagosomas

Para determinar el tiempo óptimo de fagocitosis, las DCs inmaduras obtenidas el día 12 de cultivo se marcaron con el trazador PKH26 que se intercala en la bicapa lipídica y marca la membrana celular. El protocolo de marcaje fue adaptado del procedimiento sugerido por el fabricante. Las DCs se centrifugaron a $450 \times g$ durante 7 min a 4°C, el pellet fue resuspendido en diluyente C provisto en el kit, dejando las células a 2×10^7 células/ml. Luego, se agregó un volumen de la solución PKH26 (2 μM) diluida en diluyente C, dejando las células a 10^7 células/ml y el PKH26 a 1 μM . Las células se incubaron 5 min a temperatura ambiente con agitación rotatoria y se detuvo la reacción incubando 1 min a temperatura ambiente con un volumen de 1% BSA diluido en PBS, luego se agregó un volumen de medio completo y se centrifugó a $450 \times g$ durante 7 min a 4°C. Posteriormente, se

realizaron 2 lavados más con medio completo con las células a una concentración de 10^7 células/ml. Una vez teñidas las DCs con PKH26, se procedió a generar fagosomas por shock osmótico. Siguiendo el protocolo previamente descrito (ver sección 7.2.3), después de los 20 min iniciales de incubación con las microesferas de PLGA, se modificó el tiempo de fagocitosis. Los tiempos escogidos fueron 70, 100, 130 y 160 min y luego se continuó según indica el protocolo. Los resultados fueron evaluados por medio de citometría de flujo. Como control negativo de la fagocitosis se realizó el mismo procedimiento pero realizando todas las incubaciones a 4°C.

2.2.5. Determinación de la presencia de membrana plasmática en los fagosomas-PLGA

La presencia de membrana plasmática en los fagosomas-PLGA obtenidos de DCs diferenciadas a partir de precursores de médula ósea de un ratón BALB/c, se determinó marcando 10 µg de fagosomas generados con microesferas PLGA-Alexa 647 con el trazador fluorescente PKH26. El protocolo de marcaje realizado fue adaptado del procedimiento sugerido por el fabricante. 10 µg de fagosomas-PLGA-Alexa 647 fueron centrifugados a $14.000 \times g$ durante 10 min a 4°C, y el pellet se resuspendió en 100 µl del diluyente C provisto en el kit. Luego, se agregó a los fagosomas 100 µl del colorante PKH26 disuelto en diluyente C a una concentración de 4 µM. En seguida los fagosomas se incubaron 5 min a temperatura ambiente con agitación rotatoria y se detuvo la reacción incubando 1 min a temperatura ambiente con 200 µl de 1% BSA en PBS. Posteriormente, se lavó 3 veces con 1 ml de PBS,

centrifugando a $14.000 \times g$ durante 10 min a 4°C . Los fagosomas-PLGA-Alexa 647 marcados fueron analizados por citometría de flujo.

7.2.6. Determinación de la presencia de proteínas en los fagosomas-PLGA

La presencia de proteínas en los fagosomas-PLGA obtenidos a partir de DCs diferenciadas desde precursores de médula ósea de un ratón BALB/c, se determinó mediante citometría de flujo. Se utilizaron 10 μg de fagosomas-PLGA-Alexa-647 para estudiar las proteínas presentes en los fagosomas los cuales fueron permeabilizados con el reactivo Cytofix Cytoperm siguiendo las instrucciones del fabricante. Enseguida los fagosomas se incubaron por 30 min a 4°C con diferentes anticuerpos diluidos en buffer de permeabilización (Perm Wash) dirigidos contra proteínas de membrana presentes en las DCs, para esto se estudiaron las proteínas MHC-I, MHC-II, CD80, CD86 y PD-L1. Luego de la incubación con los anticuerpos, los fagosomas se lavaron una vez con Perm Wash y fueron resuspendidos en 200 μl de PBS para ser analizados por citometría de flujo.

7.2.7. Inyección de fagosomas-PLGA alogénicos e inmunización de ratones

Ratones C57BL/6 fueron inyectados vía intravenosa (i.v.) con 100 μg (u otras dosis señaladas en los resultados) de proteína total de fagosomas-PLGA obtenidos de DCs diferenciadas de precursores de médula ósea de ratones BALB/c en 200 μl de PBS ó con 200 μl de PBS solo como control (día 0). En el día 7 los ratones fueron inmunizados de manera intraperitoneal (i.p.) con 10^7 esplenocitos provenientes de un ratón BALB/c. Estos esplenocitos se obtuvieron perfundiendo el bazo de un

animal con 10 ml de medio RPMI completo luego de lo cual se lisaron los glóbulos rojos incubando durante 5 min a temperatura ambiente con 1 ml de una buffer de lisis de glóbulos rojos. A continuación, las células se llevaron a 10 ml con medio RPMI completo y se centrifugaron a $600 \times g$ por 7 min a $4^{\circ}C$. Finalmente, los esplenocitos se resuspendieron y se dejaron a una concentración de 10^7 células/200 μL de PBS.

Una segunda inmunización con esplenocitos provenientes de ratones BALB/c fue realizada 7 días después de la primera inmunización (día 14), utilizando la misma dosis de células. A los días 0 y 21 del experimento, se obtuvo suero de los animales inmunizados para evaluar los niveles de aloanticuerpos circulantes mediante citometría de flujo (ver sección 7.2.8). Los sueros se almacenaron en alícuotas a $-20^{\circ}C$ hasta su utilización. Al día 21, los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron los esplenocitos para determinar el número de LT alorreactivos mediante ELISPOT (ver sección 7.2.9).

7.2.8. Medición de niveles de aloanticuerpos en sueros

Los sueros de los animales inmunizados (diluidos 1:40) se incubaron durante 30 min a $4^{\circ}C$ con 5×10^5 esplenocitos obtenidos de ratones BALB/c (ver sección 7.2.7) en un volumen final de 50 μl de medio completo. A continuación, las células se lavaron 3 veces con 1 ml de PBS + 2% FBS, centrifugando a $600 \times g$ por 7 min a $4^{\circ}C$ y se incubaron con los anticuerpos anti-B220 y anti-Igs de ratón durante 20 min a $4^{\circ}C$. Finalmente, las células se lavaron con 1 ml de PBS + 2% FBS y se analizaron los

niveles de aloanticuerpos circulantes presentes en los sueros mediante citometría de flujo.

7.2.9 ELISPOT

Se determinó mediante ELISPOT el número de LTs alorreactivos que producen IFN- γ (kit BD ELISPOT Mouse IFN- γ Set). Para esto, se agregó 100 μ L/pocillo de anticuerpo de captura diluido 1:200 en Coating Buffer (incluido en el kit) en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 4°C por 16 hrs sobre papel absorbente húmedo. Posteriormente, los pocillos fueron lavados y se dejaron bloqueando durante 3 h a temperatura ambiente con 200 μ l/pocillo de medio RPMI completo. Como células respondedoras (RC), se usaron 10^5 esplenocitos de los ratones C57BL/6 inmunizados y como APCs se utilizaron 10^5 esplenocitos irradiados (30 Gy) obtenidos de un ratón BALB/c, las cuales se cultivaron en 200 μ L de medio RPMI completo por triplicado. La utilización de APCs irradiadas permite a las células cumplir con su función presentadora sin secretar citoquinas, así la medición obtenida corresponde sólo a secreción de las RC. Como controles negativos, se cultivaron RC y APCs por separado y además se cultivaron RC de los animales inmunizados con APCs irradiadas de un ratón de la misma cepa (C57BL/6). Luego de 20 h de incubación a 37°C en 5% de CO₂, las placas se lavaron 3 veces con la solución de lavado (PBS + 0,05% Tween-20) esperando 3 min entre cada lavado. Después, se agregaron 100 μ l/pocillo de anticuerpo de detección anti-IFN- γ biotinilado diluido 1:200 Assay Diluent 1x (provisto en el kit 5x, diluido con agua desionizada) y se incubó a 4°C por 16 h, sobre papel absorbente húmedo. Al

día siguiente, las placas se lavaron 4 veces con solución de lavado, esperando 3 min entre cada lavado, luego se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente en ausencia de luz con 100 µl/pocillo de la proteína estreptavidina conjugada a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) diluida 1:200 en Assay Diluent 1x. Posteriormente, las placas se lavaron 3 veces con la solución de lavado, 2 veces con PBS y se incubaron en ausencia de luz con 100 µl/pocillo de la solución con el sustrato final (3-amino-9-etilcarbazol + H₂O₂). Las placas se lavaron 3 veces con agua bidestilada y se dejaron secar destapadas durante 3 h a 37°C. Finalmente, se determinó el número de spots utilizando el escáner A.EL.VIS ELISPOT y el software Eli.Analyse V6.0. Los resultados representan el promedio de spots de los triplicados de los cultivos (RC + APCs) restando la suma de spots de las RC y APCs cultivadas por separado.

7.2.10. Análisis estadístico

Para determinar la distribución normal de los datos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Cuando se compararon dos variables, se utilizó la prueba estadística de t-test para distribuciones normales y la prueba no paramétrica Mann-Whitney en datos de distribución no normal. Para análisis multiparámétricos de datos con distribución normal se utilizó la prueba de análisis de varianzas de ANOVA de una vía con post test de comparación múltiple de Tukey, mientras que para el análisis de datos con distribución no normal se utilizó la prueba de Kruskal Wallis con post test de comparación múltiple de Dunns. Los datos son presentados como el promedio ± error estándar. Las diferencias fueron consideradas

significativas si el valor de $p < 0,05$. Para el análisis estadístico y la confección de los gráficos se utilizó el software GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc.).

8. RESULTADOS

8.1. Producción de células dendríticas inmaduras para la generación de fagosomas.

Trabajos anteriores en nuestro laboratorio demostraron que precursores de médula ósea cultivados 12 días con el sobrenadante de la línea celular J558L, que contiene GM-CSF e IL-10, generan DCs (Pino, 2005). En este cultivo se generan dos tipos celulares: uno adherente y otro en suspensión. A lo largo del cultivo, las células de ambas fracciones van presentando variaciones en la expresión de moléculas de coestimulación y del MHC. Así, las células en suspensión presentan un estado mayor de maduración que las células adherentes. El análisis de la capacidad de las dos subpoblaciones de DCs de estimular LT, mediante una reacción linfocitaria mixta, demostró que se necesitan cuatro DCs por cada LT para lograr un 70% de proliferación. De este trabajo se concluyó que el estado de maduración de ambos tipos de DCs es insuficiente para estimular a los LT, por lo tanto, ambas fracciones pueden ser consideradas como DCs inmaduras (Pino, 2005).

Para efectos de este Seminario, se cultivaron células precursoras de médula ósea en presencia del sobrenadante de la línea celular J558L, durante 12 días y luego determinamos el fenotipo (células en suspensión y adherentes en su conjunto), mediante citometría de flujo. En la Figura 1 se observa que el cultivo celular contiene aproximadamente un 75% de DCs, definido por la expresión del marcador CD11c y determinado por la sumatoria de los cuadrantes superiores derecho e izquierdo de los gráficos. Respecto de la expresión de moléculas del MHC-

II (I-Ad), observamos que existen proporciones similares de DCs con baja (40,5%) y alta expresión (30,2%) de moléculas del MHC-II, determinado por los cuadrantes superiores izquierdo y derecho respectivamente del gráfico CD11c versus I-Ad. La expresión de las moléculas de coestimulación CD80, CD83, CD86 y CD40 en general es muy baja existiendo una pequeña fracción (<6%) de células positivas para estos marcadores, determinado por el cuadrante superior derecho de los respectivos gráficos. La baja expresión de las moléculas de coestimulación indica la incapacidad de estas células para activar a los LT, sugiriendo que desencadenarán mecanismos de tolerancia en vez de inmunidad. Con respecto a los ligandos para PD1 la expresión de PD-L2 es heterogénea (49,3% y 21,7%, para alta y baja expresión respectivamente) similar a lo que ocurre para las moléculas MHC-II, mientras que PD-L1 se encuentra fuertemente expresado en la mayoría de las DCs (57,1%), determinado por el cuadrante superior derecho de este gráfico. Estos resultados confirman el fenotipo inmaduro de las DCs utilizadas para la generación de fagosomas.

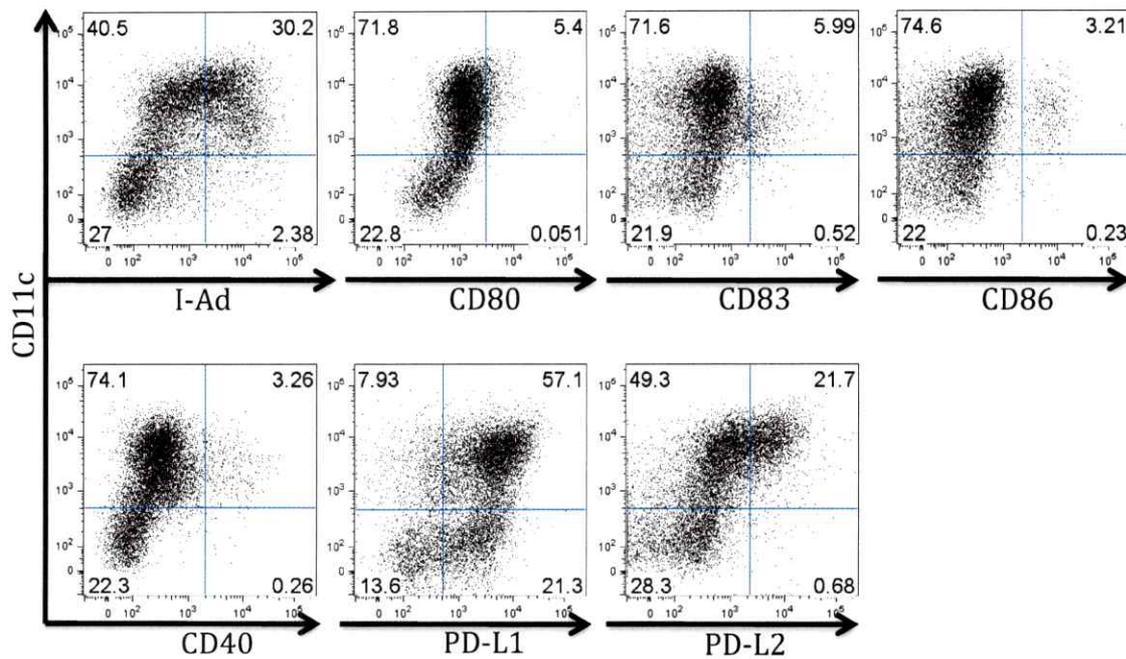


Figura 1. Fenotipo de células dendríticas inmaduras. Células precursoras de médula ósea de ratones BALB/c fueron cultivadas en presencia del sobrenadante de la línea celular J558L durante 12 días. Luego se determinó el fenotipo de las DCs por citometría de flujo descartando las células muertas por tinción con el colorante vital PI. Se analizó la expresión de moléculas MHC-II (I-Ad), moléculas de coestimulación (CD80, CD83, CD86 y CD40) y ligandos para PD1 (PD-L1 y PD-L2). Fenotipo representativo de todos los cultivos de DCs obtenidos.

8.2. Comparación del shock osmótico y la lisis mecánica para generar fagosomas.

Después que las DCs inmaduras fagocitaron las microesferas de PLGA se probaron 2 protocolos para la obtención de los fagosomas: shock osmótico y lisis mecánica de las células. La obtención de fagosomas mediante shock osmótico consiste en disminuir a la mitad los solutos del medio para generar un shock hiposmótico, liberando los fagosomas al medio. La lisis mecánica consiste en pasar las células varias veces por una aguja, de modo de ir rompiendo las células y liberando los fagosomas al medio. Finalmente, independiente del método de lisis utilizado, los fagosomas son separados de los restos celulares por centrifugación.

El nivel de pureza de las fracciones de fagosomas obtenidas por medio de los dos métodos se analizó por citometría de flujo. Para esto, en la generación de fagosomas se utilizaron microesferas de PLGA acopladas al fluoróforo Alexa 647. La Figura 2 muestra una comparación de los dos métodos de obtención de fagosomas. Claramente la lisis por shock osmótico (Figura 2A) genera una fracción de fagosomas considerablemente más enriquecida comparada a la lisis mecánica (Figura 2B), determinado por un 75,9% versus un 19,5%, respectivamente, lo que se traduce en una fracción de 3,9 veces más pura. Por lo tanto, las siguientes preparaciones de fagosomas fueron generadas utilizando el protocolo por shock osmótico.

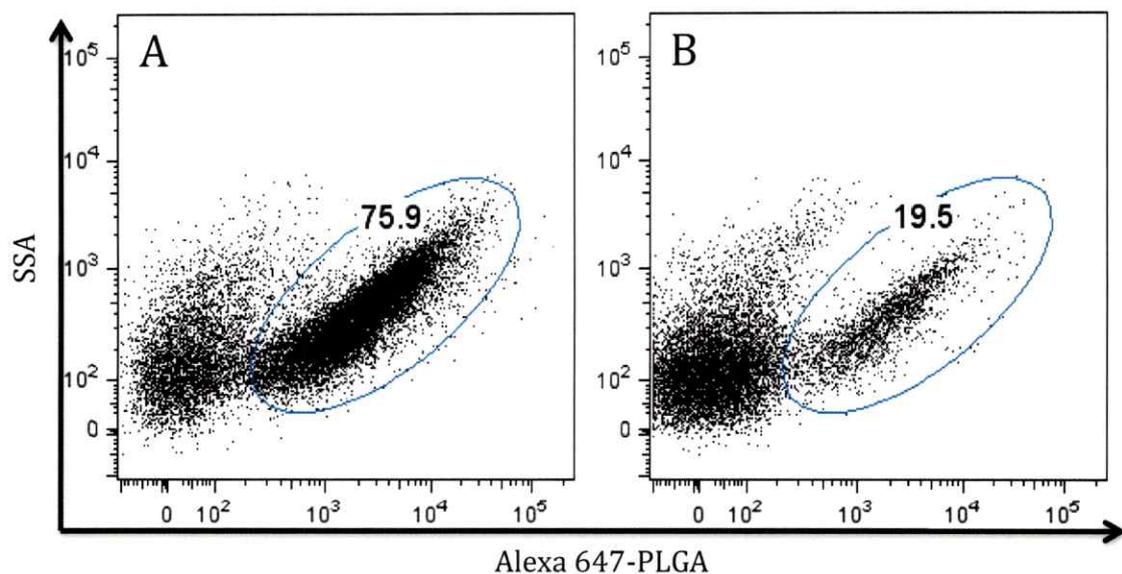


Figura 2. Obtención de fagosomas por shock osmótico y lisis mecánica. DCs inmaduras se incubaron con microesferas de PLGA por 90 min, luego se lisaron por ambos métodos: lisis por shock osmótico (A) y lisis mecánica (B). Se utilizaron microesferas de PLGA-Alexa 647, lo cual permite un análisis directo por citometría de flujo. SSA: *side scattered area*. Análisis representativo de todas las preparaciones de fagosomas realizadas.

8.3. Estandarización del tiempo óptimo de fagocitosis.

Dado que los fagosomas son obtenidos a partir de las DCs inmaduras después de la fagocitosis de partículas de PLGA, determinamos el tiempo óptimo de fagocitosis en el cual se obtiene el mayor porcentaje de fagosomas. Para esto marcamos las DCs inmaduras con el colorante fluorescente PKH26, previo a la fagocitosis de microesferas de PLGA. Luego, las DCs marcadas fueron incubadas con microesferas de PLGA-Alexa-647 utilizando diferentes tiempos de fagocitosis a 37°C (90, 120, 150 y 180 min). Luego de la incubación por diferentes tiempos, las DCs fueron lisadas por shock osmótico y posteriormente se analizó el porcentaje de partículas doble positivas para Alexa-647 y PKH26 por medio de citometría de flujo. Como control negativo de la fagocitosis se realizó el mismo experimento a 4°C, donde se espera que las DCs no fagociten microesferas de PLGA, obteniéndose no mas de 2,5% de partículas dobles positivas. En la Figura 3 se observa que la mayor producción de fagosomas se obtuvo con 120 min de fagocitosis (33%), siendo mayor que el porcentaje de fagosomas obtenidos con 90, 150 y 180 min de fagocitosis (aproximadamente 21% en todos los casos). En base a estos resultados la fagocitosis de las partículas de PLGA se realizó durante 120 min para la producción de fagosomas.

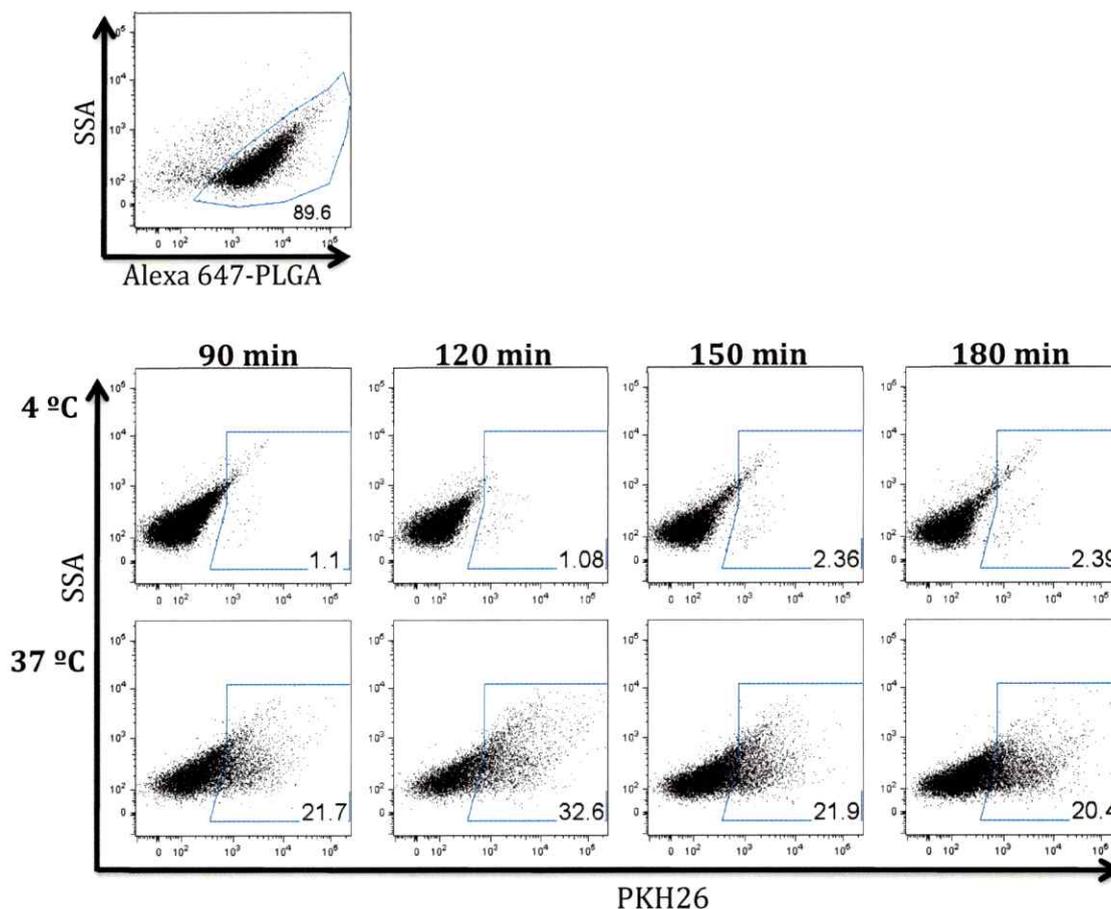


Figura 3. Estandarización del tiempo óptimo de fagocitosis. Las DCs inmaduras obtenidas después de 12 días de cultivo, fueron marcadas con PKH26 e incubadas a 37°C o 4°C con microesferas de PLGA Alexa-647 por los tiempos señalados. Después de la incubación, las células fueron lisadas por shock osmótico y se evaluó por citometría de flujo, el porcentaje de partículas doble positivas para Alexa-647 y PKH26. El análisis fue realizado a partir de la región determinada en el gráfico superior. SSA: *side scattered area*. Experimento representativo de dos experimentos independientes.

8.4. La fagocitosis no altera el fenotipo inmaduro de las DCs.

Nuestra hipótesis plantea que los fagosomas obtenidos a partir de DCs inmaduras serán capaces de disminuir la respuesta inmune. Por lo que es importante demostrar si las DCs que han fagocitado las microesferas de PLGA durante 120 min y con las cuales se producen los fagosomas siguen manteniendo sus propiedades tolerogénicas, determinado por su fenotipo inmaduro. Por lo tanto, incubamos las DCs con las microesferas de PLGA siguiendo el protocolo para la generación de fagosomas y una vez terminado el período de la fagocitosis, las células fueron lavadas para eliminar el exceso de microesferas de PLGA no fagocitadas. Luego las DCs se incubaron con anticuerpos para la detección de moléculas del MHC-II (I-Ad), moléculas de coestimulación (CD86) y ligandos para PD1 (PD-L1). Posteriormente, se analizó por citometría de flujo el estado de maduración de las DCs. Como fenotipo control de este experimento, DCs inmaduras provenientes del mismo cultivo fueron sometidas al tratamiento de incubaciones y lavados, pero sin las microesferas de PLGA. Se espera que el fenotipo de las DCs que han fagocitado microesferas sea similar al control (Figura 4A). Analizando el cuadrante superior derecho de los gráficos (Figura 4A y 4B) se observa que el proceso de fagocitosis de microesferas de PLGA (Figura 4B) no produce ningún cambio en la expresión de las moléculas del MHC-II (25,7% sin microesferas y 27,9% con microesferas), de las moléculas coestimuladoras CD86 (3,6% sin microesferas y 3,3% con microesferas), ni del ligando para PD-1, PD-L1 (34,4% sin microesferas y 33,4% con microesferas). Estas observaciones nos permiten concluir que los fagosomas son efectivamente generados a partir de DCs inmaduras.

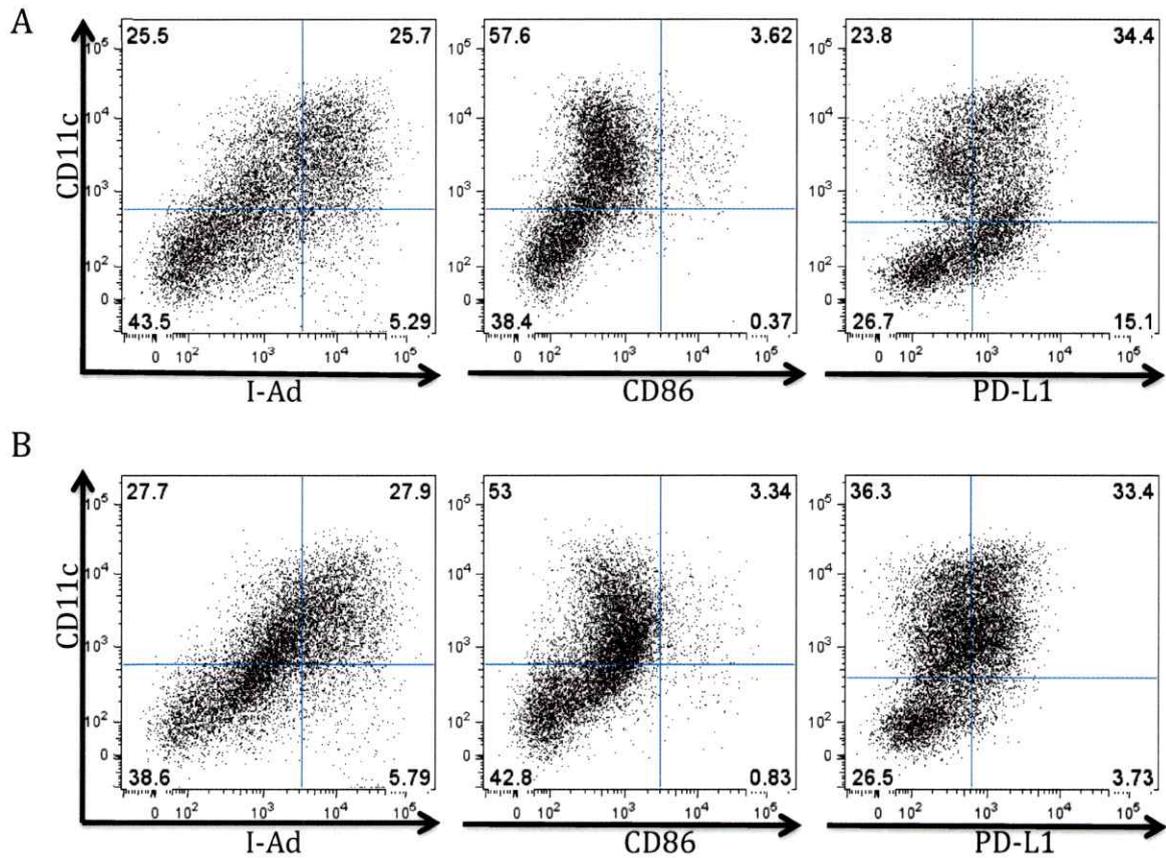


Figura 4. La fagocitosis no altera el fenotipo inmaduro de las DCs. Las DCs inmaduras obtenidas después de 12 días de cultivo, fueron incubadas a 37°C por 120 min en ausencia (A) o presencia (B) de microesferas de PLGA. El exceso de microesferas de PLGA fue eliminado por centrifugación y el fenotipo de maduración de las DCs fue evaluado por citometría de flujo. Experimento representativo de dos experimentos independientes.

8.5. Los fagosomas obtenidos por shock osmótico poseen membranas y proteínas que provienen de las DCs inmaduras.

Los fagosomas son definidos como vesículas en las cuales se internalizan microorganismos, pero en este caso los fagosomas corresponden a microesferas de PLGA rodeada de membrana plasmática que proviene de las DCs inmaduras. Con el objetivo de confirmar estas características en los fagosomas producidos con las microesferas de PLGA, se demostró la presencia de membrana plasmática y de proteínas proveniente de las DCs. La presencia de membrana se analizó marcando los fagosomas con PKH26. Mientras que, para estudiar la presencia de proteínas específicas en los fagosomas, éstos fueron permeabilizados y luego incubados con diferentes anticuerpos dirigidos contra moléculas de superficie presentes en las DCs como las moléculas del MHC-I y MHC-II (H-2Kd e I-Ad, respectivamente), moléculas coestimuladoras (CD80, CD86) y ligando para PD1 (PD-L1), para luego analizarlos por citometría de flujo. En la Figura 5 se puede observar que los fagosomas generados por shock osmótico presentan membrana (Figura 5A), moléculas del MHC-I (H-2Kd) y MHC-II (I-Ad) (Figura 5B), moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y moléculas ligandos para PD1, PD-L1 (Figura 5C) proveniente de las DCs inmaduras, confirmando la naturaleza y características de los fagosomas generados.

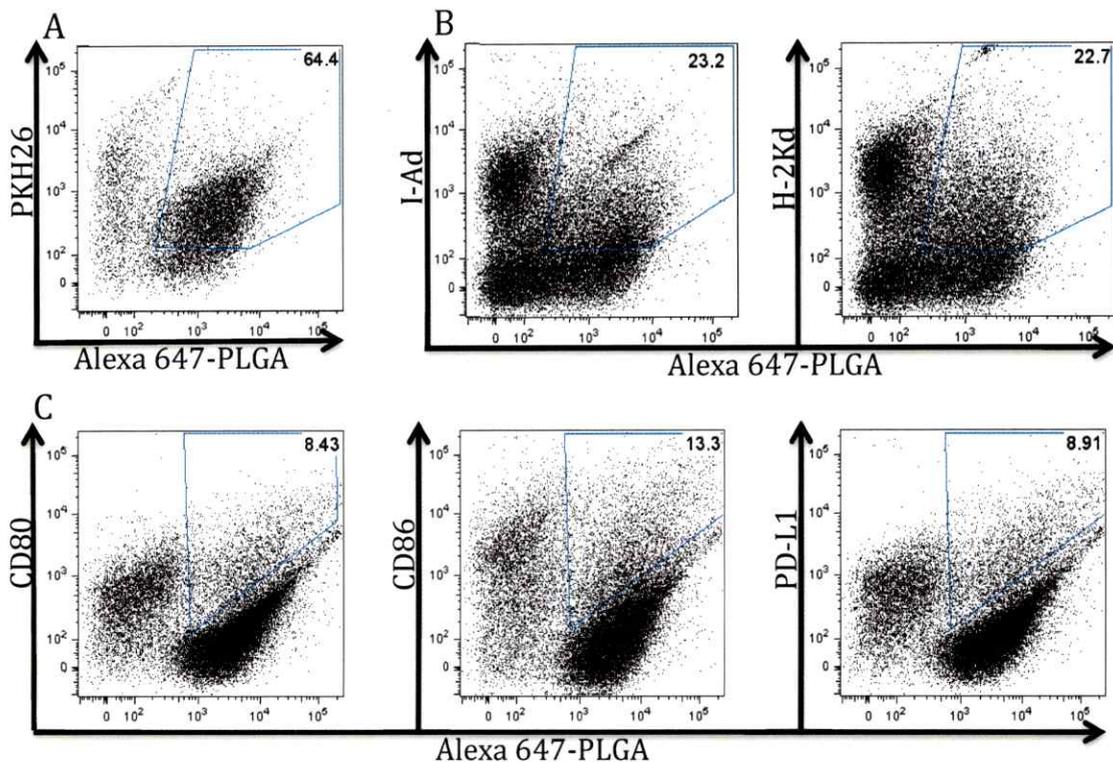


Figura 5. Los fagosomas obtenidos por shock osmótico presentan membrana plasmática y proteínas provenientes de las DCs inmaduras. Los fagosomas fueron generados por shock osmótico de DCs inmaduras, obtenidas después de 12 días de cultivo, que fagocitaron microesferas de PLGA Alexa 647+. Los fagosomas generados fueron analizados para la presencia de membrana plasmática mediante la tinción con PKH26 (A) y para la presencia de proteínas proveniente de las DCs con anticuerpos dirigidos contra moléculas del MHC (B), así como también moléculas de coestimulación y ligando para PD1 (C). Experimento representativo de 3 experimentos.

8.6. Los fagosomas alogénicos disminuyen la respuesta inmune humoral en ratones C57BL/6.

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que los fagosomas tienen propiedades tolerógenicas, lo cual fue observado en experimentos *in vitro* e *in vivo* (Ramírez, 2009; Silva, 2011). En uno de estos experimentos se estudió el efecto de la incorporación de fagosomas en las DCs *in vitro* y los resultados indicaron que la administración de aloantígenos en forma de fagosomas no inducía la activación de las DCs y además no producía cambios en el patrón de secreción de citoquinas (Ramírez, 2009). Por otro lado, se estudió la distribución de los fagosomas en diferentes órganos al ser inyectados vía i.v. y se observó que la incorporación de fagosomas-PLGA alogénicos *in vivo* no indujo la activación de las células CD11c⁺ que los fagocitan (Silva, 2011). Estos resultados fueron obtenidos con fracciones de fagosomas producidas por lisis mecánica, donde solo un 20% de las partículas son efectivamente fagosomas, siendo el resto en gran parte desechos celulares (ver Figura 2). Se sabe que los desechos celulares producen atracción de células inmunes y en consecuencia de esto se genera inflamación. Por lo tanto, los fagosomas puros podrían producir un efecto supresor de la respuesta inmune más potente *in vivo*.

La respuesta inmune humoral alogénica se evalúa por la cantidad de aloanticuerpos circulantes en el suero. Para esto, los fagosomas fueron utilizados para administrar aloantígenos a ratones de un haplotipo diferente para las moléculas MHC. Los fagosomas obtenidos en este Seminario fueron administrados 7 días antes de inmunizar los ratones con esplenocitos alogénicos. Para esto, 100 µg

de fagosomas-PLGA obtenidos a partir de DCs diferenciadas de precursores de médula ósea provenientes de un ratón BALB/c, fueron inyectados a ratones C57BL/6 (día 0) de manera i.v. A los días 7 y 14 los ratones C57BL/6 fueron inmunizados con esplenocitos de ratones BALB/c. Siete días después de la última inmunización se midieron los niveles de aloanticuerpos circulantes en suero por citometría de flujo. Los resultados indican que el pre-tratamiento con fagosomas-PLGA alogénicos disminuyó de manera significativa los niveles de aloanticuerpos en el suero de los ratones C57BL/6 tratados. Así, el grupo de ratones que recibió pre-tratamiento con fagosomas alogénicos posee una intensidad media de fluorescencia (IMF) que alcanza un valor promedio de $808,1 \pm 159,7$, mientras que en el grupo de ratones inmunizados sin tratamiento previo con fagosomas-PLGA, posee una IMF de $1.733,0 \pm 242,2$ (Figura 6). Estos valores representan un 53% de reducción de los niveles de aloanticuerpos circulantes y demuestran que los fagosomas alogénicos producen *in vivo* una disminución de la respuesta inmune alogénica humoral.

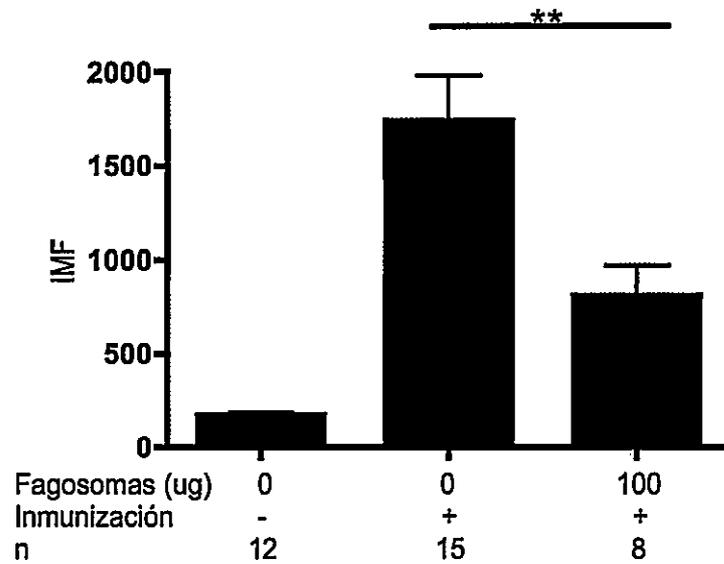


Figura 6. Pre-tratamiento con fagosomas alogénicos disminuyen la secreción de aloanticuerpos. Análisis por citometría de flujo de los sueros de ratones C57BL/6. Estos ratones fueron tratados con y sin fagosomas-PLGA obtenidos de DCs diferenciadas a partir de precursores de médula ósea de ratones BALB/c e inmunizados dos veces con esplenocitos de ratones BALB/c. n: número de ratones por grupo. IMF: Intensidad media de fluorescencia. Los resultados representan el promedio de los datos \pm SEM. (Mann Withney test: $**p=0,0061$).

8.7. Los fagosomas alogénicos disminuyen la respuesta inmune celular en ratones C57BL/6.

Con el objetivo de determinar el efecto de la administración de fagosomas alogénicos en la respuesta inmune celular, determinamos mediante ELISPOT para IFN- γ el número de LT aloreactivos presentes en el bazo de los ratones que recibieron o no fagosomas alogénicos como pre-tratamiento. El protocolo de incorporación de fagosomas e inmunización es el mismo utilizado anteriormente para determinar el efecto en la respuesta inmune humoral. El mismo día que se evaluó la respuesta humoral, los ratones fueron sacrificados y los esplenocitos de los ratones C57BL/6 tratados con o sin fagosomas se co-cultivaron en presencia de APCs previamente irradiadas de un ratón BALB/c. Los resultados muestran que el pre-tratamiento con fagosomas alogénicos disminuyó de manera significativa el número de LT aloreactivos al compararlo con el grupo experimental en el cual no se administraron fagosomas previo a la inmunización (Figura 8). El número de spots promedio fue de $50,8 \pm 15,1$ en el grupo de ratones tratados con fagosomas previo a la inmunización comparado con $148,4 \pm 21,3$ spots en el grupo sin pre-tratamiento. Por lo tanto, el pre-tratamiento con fagosomas disminuye en un 66% el número de LT aloreactivos. Estos resultados sugieren que el pre-tratamiento con fagosomas-PLGA alogénicos, obtenidos por shock osmótico, disminuye tanto la respuesta inmune humoral como celular.

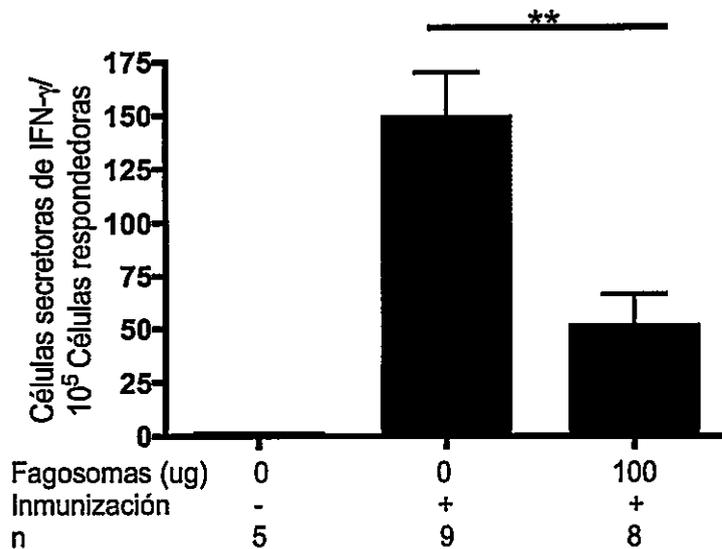


Figura 7. La administración de fagosomas alogénicos inhibe la respuesta inmune celular. Cuantificación mediante ELISPOT de LT secretoras de IFN- γ en esplenocitos de ratones C57BL/6. Estos ratones fueron tratados con y sin fagosomas-PLGA obtenidos de DCs diferenciadas a partir de precursores de médula ósea de ratones BALB/c e inmunizados dos veces con esplenocitos de ratones BALB/c. n: número de ratones por grupo. Los resultados representan los valores promedio de spots de pocillos en triplicado \pm SEM luego de la sustracción de la producción espontánea de IFN- γ . (t-test no pareado: **p=0,0023).

8.8. Efecto de la dosis de fagosomas en la producción de tolerancia inmune.

Con el objetivo de determinar si es necesaria una dosis específica de fagosomas para generar tolerancia, se estudió el efecto de diferentes dosis de fagosomas. Se utilizó el mismo protocolo de pre-tratamiento con los fagosomas e inmunización con esplenocitos para evaluar la respuesta inmune humoral y celular. Se analizaron 3 dosis de fagosomas: 1, 10 y 100 μg . Las Figuras 8 y 9 muestran que dosis menores a 100 μg de fagosomas-PLGA alogénicos no producen una disminución significativa de la respuesta inmune humoral ni celular. No se estudiaron cantidades superiores a 100 μg de fagosomas ya que en un trabajo anterior (Silva, 2011) se demostró que al duplicar la cantidad de fagosomas, se produce inmunidad en vez de tolerancia. Debido a lo complejo de la realización de este experimento y al alto número de animales requeridos, sólo se analizaron las cantidades de fagosomas descritas anteriormente.

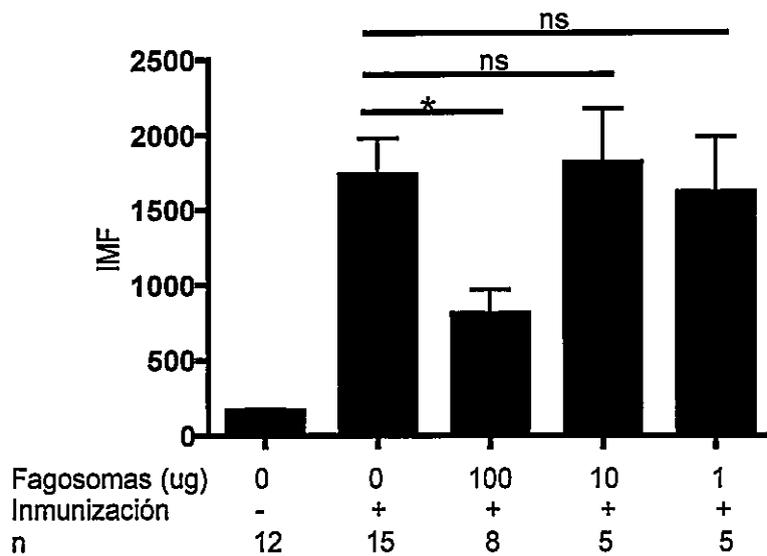


Figura 8. Dosis respuesta de fagosomas en la respuesta inmune humoral. Análisis realizado mediante citometría de flujo de sueros de ratones C57BL/6. Estos ratones fueron tratados con o sin fagosomas-PLGA obtenidos de DCs diferenciadas a partir de precursores de médula ósea de ratones BALB/c e inmunizados dos veces con esplenocitos de ratones BALB/c. n: número de ratones por grupo, IMF: Intensidad media de fluorescencia, ns: no significativo. Los resultados representan el promedio de los datos \pm SEM. (Kruskal Wallis, Dunns post-test: * $p=0,0294$).

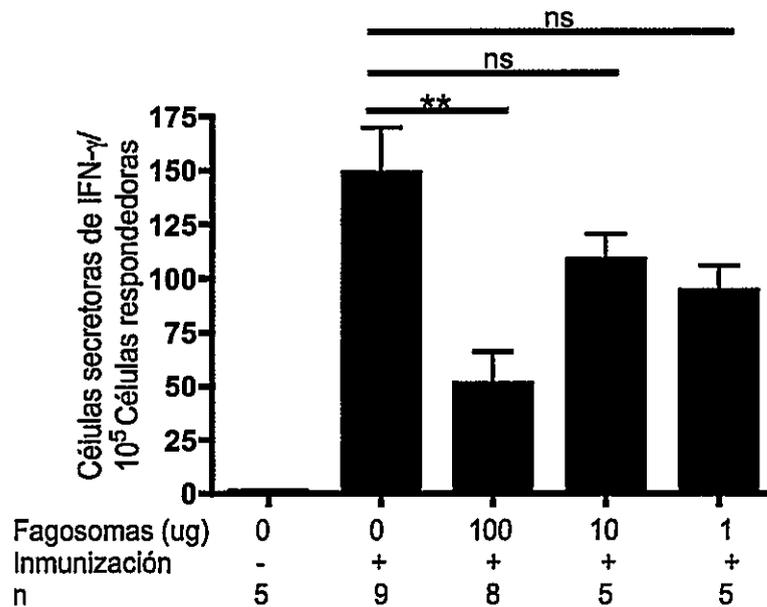


Figura 9. Dosis respuesta de fagosomas en la respuesta inmune celular. Cuantificación de células secretoras de IFN- γ mediante ELISPOT en esplenocitos de ratones C57BL/6. Estos ratones fueron tratados con o sin fagosomas-PLGA obtenidos de DCs diferenciadas a partir de precursores de médula ósea de ratones BALB/c e inmunizados dos veces con esplenocitos de ratones BALB/c. n: número de ratones por grupo, ns: no significativo. Los resultados representan los valores promedio de spots de pocillos en triplicado \pm SEM luego de la sustracción de la producción espontánea de IFN- γ . (ANOVA una vía, Tukey post-test: ** $p < 0,01$).

9. DISCUSION

Las DCs son importantes para el sistema inmune ya que son las únicas células capaces de activar LT vírgenes y, por lo tanto, iniciar una respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, en este evento pueden inducir dos procesos completamente opuestos como lo son la inmunidad y la tolerancia. La generación de inmunidad o de tolerancia depende del estado de activación de las DCs. Así, cuando las DCs presentan alta expresión de moléculas del MHC, de moléculas coestimuladoras y secretan citoquinas inflamatorias, éstas generan inmunidad. Mientras tanto la tolerancia se genera en un ambiente no inflamatorio, el cual se traduce en un fenotipo inmaduro que se caracteriza por la baja expresión de moléculas del MHC, de moléculas coestimuladoras y secreción de un patrón de citoquinas tolerogénicas (Ureta y col., 2007; Mueller, 2010).

Debido a estas importantes propiedades de las DCs, ellas constituyen un blanco importante para desarrollar terapias celulares que permitan disminuir o prevenir el rechazo de un injerto, limitar la enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD) o para tratar desórdenes autoinmunes (Morelli y Thomson, 2007). En todos estos casos se espera que las DCs sean capaces de desplazar la respuesta inmune hacia la producción de tolerancia antígeno-específica, contra los aloantígenos del donante en el caso de trasplante.

Los LT vírgenes necesitan reconocer el complejo péptido-MHC presente en las DCs para ser activados. Este proceso debe ser acompañado por la interacción de moléculas coestimuladoras presentes en las DCs con ligandos presentes en los LT (Wood y Goto, 2012). Por su parte, las DCs tolerogénicas se caracterizan por tener

menores niveles de expresión de moléculas coestimuladoras. Debido a esto, las DCs tolerogénicas presentan antígenos en sus moléculas del MHC a LT específicos, pero no liberan adecuadamente las señales coestimuladoras para que se activen y proliferen los LT. Como consecuencia de esta presentación antigénica “incompleta” esta interacción puede generar tres procesos: 1) la eliminación de los LT por la activación de un programa de muerte celular programada o apoptosis, 2) anergia en los LT, estado caracterizado por la no respuesta ante la estimulación con antígenos, o 3) la generación de LT reguladores (Morelli y Thomson, 2007) que tienen por función controlar a los LT auto-reactivos que escapan a la selección tímica (Moser y Animale, 2003; Sykes, 2007).

Se ha reportado que en un individuo existe aproximadamente un 10% de LT aloreactivos de la población total de LT, capaces de reconocer aloantígenos y que son responsables del rechazo del trasplante. Una estrategia efectiva para controlar los LT alogénicos es la producción de LT reguladores alogénicos. Por lo tanto, en este Seminario de Título desarrollamos una estrategia de entrega de aloantígenos en un contexto no inmunogénico, de modo que el antígeno sea procesado y presentado en un ambiente que genere tolerancia.

Para realizar esto utilizamos DCs inmaduras caracterizadas previamente en el laboratorio (Pino, 2005). Las DCs son generadas a partir de células precursoras de médula ósea y son diferenciadas con el sobrenadante de la línea celular J558L que contiene GM-CSF e IL-10. Así, estas células sólo son capaces de estimular LT alogénicos cuando la proporción de DCs en relación a los LT es muy alta (Pino, 2005). Las características de estas células se muestran en la Figura 1. Las DCs tienen

baja expresión de moléculas del MHC-II, baja expresión de las moléculas coestimuladoras (CD80, CD83, CD86 y CD40) y además expresan ligandos para PD1 como PD-L1 y PD-L2.

Se ha demostrado que la depleción de PD1 resulta en una profunda y compleja destrucción autoinmune, mientras que el bloqueo de la interacción PD1-PD-L1 acelera el desarrollo de la diabetes autoinmune (Fife y col., 2009). Estos resultados sugieren un papel único para PD1 en la mantención del estado anérgico de los LT (Fife y col., 2006). Por lo tanto, la alta expresión de PD-L1 presente en la mayoría de las DCs utilizadas en este trabajo, junto a la baja expresión de las moléculas de coestimulación (CD80, CD83, CD86 y CD40) (Figura 1) sugieren que las DCs liberarán mecanismos de tolerancia en vez de inmunidad.

La estrategia para entregar antígenos consistió en generar vesículas que llevaran proteínas de las DCs tolerogénicas. Para esto, DCs inmaduras fagocitaron microesferas de PLGA y por medio de shock osmótico fueron liberadas vesículas fagocíticas, que denominamos fagosomas. Los fagosomas purificados se utilizaron como vehículos de carga de antígenos en el contexto de la presentación antigénica. Existen algunos trabajos donde generan fagosomas utilizando partículas de látex, en vez de microesferas de PLGA (Griffith, 2003; Ackerman y col., 2003; Ureta 2007). La ventaja de las microesferas de PLGA es que éstas se encuentran aprobadas por la FDA para uso en humanos en la liberación de drogas. El PLGA es un co-polímero sintetizado por la unión, mediante enlaces éster, de dos monómeros distintos: ácido glicólico y ácido láctico. Este co-polímero es un material biodegradable ya que en el organismo se rompen las uniones éster en presencia de agua y se liberan los

monómeros originales, los cuales son subproductos de varias vías metabólicas del organismo bajo condiciones fisiológicas normales (Jain, 2000; Bhardwaj y col., 2008; Jhunjhunwala y col., 2009).

En este trabajo comparamos la obtención de fagosomas por shock osmótico o por lisis mecánica. Nuestros resultados demostraron que el shock osmótico genera fracciones de fagosomas aproximadamente cuatro veces más enriquecidas comparado a la lisis mecánica (Figura 2). Además la lisis por shock osmótico mejora la reproducibilidad de los resultados ya que el protocolo no depende del manipulador.

Por otro lado, el protocolo de obtención de fagosomas fue optimizado logrando un mayor porcentaje de fagosomas al aumentar el tiempo de fagocitosis a 120 min (Figura 3). Asimismo, observamos que la incubación de las DCs con las microesferas durante 150 min y 180 min no mejora la producción de fagosomas. Es posible que estos tiempos de fagocitosis sean suficientes para que las DCs comiencen a morir una vez que han fagocitado las microesferas, generando finalmente una cantidad inferior de fagosomas a la obtenida con un menor tiempo de fagocitosis.

De manera importante, comprobamos que el fenotipo inmaduro de las células se mantuviera después de la fagocitosis, asegurando que los fagosomas son derivados de células con características tolerogénicas. Este aspecto fue importante evidenciarlo, ya que la alta capacidad fagocítica esta relacionada con las DCs inmaduras, pero se ha demostrado que estas se activan cuando el péptido fagocitado

es reconocido como extraño (Figura 4) (Ezzelarab y Thomson, 2011; Griffith y col., 2007; Guermonprez y col., 2002; Meijerink y col., 2012).

En la caracterización de los fagosomas comprobamos que estos correspondieran a microesferas de PLGA rodeadas de membranas con proteínas provenientes de las células que las fagocitaron. Para esto evaluamos la presencia de membrana plasmática y proteínas específicas relacionadas con la presentación de antígenos (Figura 5). Con esto, confirmamos la descripción de los fagosomas como vehículos de carga de antígenos (Ureta y col., 2007; Ramírez, 2009; Silva, 2011).

El efecto de los fagosomas previamente caracterizados fue evaluado en la respuesta inmune *in vivo*. Para esto, los fagosomas fueron aplicados como pre-tratamiento a la inmunización con esplenocitos alogénicos. La respuesta humoral y celular fue medida en ratones que fueron pre-tratados con fagosomas alogénicos. Nuestros resultados demuestran que los fagosomas son capaces de disminuir significativamente la respuesta inmune humoral y celular en más de un 50% (Figuras 6 y 7). Esta disminución en la respuesta inmune sugiere que los fagosomas generados mediante este protocolo pueden servir como una herramienta apropiada para ayudar a disminuir la respuesta inmune. Esta estrategia utilizada en conjunto con otras que produzcan inmunosupresión podría generar cambios aún más considerables en la tolerancia a los trasplantes.

Por otra parte, no fue posible demostrar un efecto *in vivo* de dosis-respuesta a las dosis de fagosomas estudiadas (Figuras 8 y 9). Problemas en la disponibilidad de ratones impidieron la realización de los experimentos con dosis entre 10 y 100

μg de fagosomas, la utilización de este rango en la cantidad de fagosomas permitiría obtener un efecto dosis respuesta como ocurre con otros estudios donde se utilizan exosomas o células apoptóticas (Théry y col., 2002; Shofner y col., 2007).

Con respecto al potencial clínico de los fagosomas-PLGA podemos mencionar que la utilización de fagosomas-PLGA presenta una gran ventaja, ya que estos pueden ser mantenidos por un tiempo prolongado a 4°C (aprox. 4 meses) hasta su utilización, sin perder sus propiedades.

En relación a los cultivos de las DCs inmaduras con las cuales se generan los fagosomas, es importante mencionar que su pureza fue entre 75-80 % (Figura 1). Es probable que si se pudieran enriquecer las DCs inmaduras podríamos mejorar la eficiencia del tratamiento. Un método para purificar las células son las microesferas magnéticas, que consiste en incubar las células con microesferas magnéticas específicas, por ejemplo anti-CD11c, para luego adherirlas a la columna que contiene un imán y finalmente eluir las células. En general, con este método se logran purificaciones de hasta un 95%.

A pesar de que en este trabajo se mejoraron varias condiciones para la obtención de fagosomas, sería interesante concentrar los fagosomas para estudiar mayores dosis a las analizadas. En general, los fagosomas son generados con partículas de látex que tienen el mismo tamaño, por lo que es posible concentrar las muestras de fagosomas utilizando gradientes de sacarosa (Desjardins y col., 1994b; Ureta y col., 2007). Sin embargo, en el caso de las microesferas de PLGA estas son de tamaños heterogéneos, por lo tanto este método no es aplicable. Debido a la falta de

muestras de fagosomas concentradas, en este trabajo no fue posible estudiar el efecto de los fagosomas con dosis mayores a 100 μg debido a que el volumen a inyectar superaba el indicado para los ratones.

Algunas estrategias usadas para entregar antígenos son la utilización de exosomas y células apoptóticas. Los exosomas son nanovesículas que miden entre 50 a 100 nm derivadas de la membrana celular. Los exosomas son formados dentro del compartimiento endocítico llamados cuerpos multivesiculares (MVB) y son secretados al espacio extracelular por la fusión de los MVB y la membrana plasmática. Estas vesículas son generadas a partir de diferentes tipos celulares como mastocitos, LT, LB, DCs, macrófagos y células tumorales (Théry y col., 2002; Morelli, 2006). Se ha observado, que ciertos exosomas permiten la generación de LT reguladores indicando su participación en tolerancia (Wang y col., 2008). Otro estudio muestra que una inyección de exosomas obtenidos a partir de DCs inmaduras prolonga la supervivencia del injerto de corazón en ratas acompañado de una disminución de la respuesta de los LT CD4⁺ anti-donante (Pêche y col., 2003; Morelli y col., 2006).

Por otro lado, la eliminación de células envejecidas ocurre mediante apoptosis, proceso normal durante la embriogénesis, morfogénesis y mantención de la homeostasis en los tejidos (Morelli, 2006). Este proceso está asociado a la ausencia de inflamación y a la liberación de señales inhibitorias de las células fagocíticas del sistema inmune. Se ha demostrado además que células apoptóticas inyectadas en forma i.v. son rápidamente internalizadas por las DCs del bazo las

cuales presentan antígenos a LT, de manera importante en este proceso no se induce la maduración de las DCs (Iyoda, 2002; Morelli y col., 2003; Morelli, 2006).

A pesar de las evidencias sobre la funciones de los exosomas y células apoptóticas en tolerancia, existen otros trabajos que muestran la capacidad de éstos de estimular la respuesta inmune. Así, se ha observado que exosomas derivados de DCs pueden activar LT (Théry y col., 2002). Además los exosomas inducen una potente respuesta antitumoral permitiendo la erradicación del tumor (Andre y col., 2002; Guermonprez y col., 2002; Morelli, 2006). Por otro lado, se ha observado que DCs inmaduras que fagocitan células apoptóticas estresadas resulta en un aumento de la expresión de las moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40) en la superficie de las DCs, aumentando sus funciones inmunoestimuladoras y permitiendo la activación de los LT (Feng y col., 2002).

En relación a la presentación de antígenos, en este estudio no se analizaron los mecanismos moleculares asociados a la producción de tolerancia inducidos por la fagocitosis de los fagosomas. Sería importante investigar el tipo de presentación antigénica que resulta de la incorporación de los fagosomas. Asimismo, determinar si las proteínas de los fagosomas son presentadas por las DCs del receptor que han fagocitado los fagosomas y/o si existe transferencia de membrana desde los fagosomas hacia las DCs del receptor. La transferencia directa de membrana es un mecanismo que recientemente se ha estudiado y propone que fragmentos de membrana pueden ser directamente incorporados por otras células, incluyendo el conjunto de proteínas que contenga este fragmento de membrana. Esto se podría estudiar realizando un co-cultivo de DCs que no expresen moléculas del MHC-II y LT

vírgenes del mismo haplotipo, junto con fagosomas de haplotipo diferente. Analizando la activación de los LT se puede comprobar que la presentación antigénica ha sido por transferencia de membrana desde los fagosomas hacia las DCs, ya que constituyen la única posibilidad de presentación del complejo péptido-MHC hacia los LT. Se ha observado que los exosomas son capaces de transferir fragmentos de membrana a las DCs, de presentar péptidos a los LT y estimular la proliferación de los LT (Théry y col., 2002).

Considerando que los fagosomas son los vehículos de carga de antígenos provenientes de las DCs inmaduras, surge la interrogante de por qué no usar las DCs directamente, ya que estas llevaran los antígenos que estamos considerando. Hay trabajos donde se logra la inducir tolerancia cuando las DCs tolerogénicas son inyectadas en animales junto a drogas inmunosupresores (Mirenda y col, 2004). Por el contrario, existen evidencias donde muestran que las DCs una vez inyectadas pueden madurar y presentar antígenos a LT del receptor provocando inmunidad (van Kooten y col., 2011). Debido a esto, no existe la seguridad de que las DCs inyectadas mantengan su fenotipo inicial.

Finalmente, pensando en una aplicación de este seminario en relación a los trasplantes, será necesario complementar este trabajo con ensayos en animales donde se demuestre que los fagosomas ayudan en la aceptación de trasplante de piel.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que los fagosomas alogénicos derivados de DCs inmaduras constituyen una forma adecuada de liberar aloantígenos de manera tolerogénica.

10. RESUMEN DE RESULTADOS

1. Las células dendríticas derivadas de precursores de la médula ósea, diferenciadas en presencia del sobrenadante de la línea celular J558L, poseen un fenotipo inmaduro y tienen la capacidad de fagocitar microesferas de PLGA.
2. La lisis osmótica de las células dendríticas, que fagocitaron las microesferas de PLGA, genera fracciones más enriquecidas en fagosomas comparado a la lisis mecánica.
3. La fagocitosis de microesferas de PLGA por las células dendríticas inmaduras no altera su estado de maduración.
4. Los fagosomas generados a partir de células dendríticas inmaduras presentan membrana plasmática y proteínas provenientes de estas mismas células.
5. El tratamiento con fagosomas-PLGA alogénicos previo a la inmunización disminuye la respuesta inmune humoral y celular *in vivo*.

11. CONCLUSION

En este trabajo se obtuvo un protocolo para la generación de fagosomas alogénicos que inhiben significativamente la respuesta inmune humoral y celular. Este tipo de reactivo podría ser usado en trasplante como un complemento para producir tolerancia antígeno-específica.

12. BIBLIOGRAFIA

- Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampé, R., Cresswell, P., 2003. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100, 12889-94.
- Andre, F., Scharz, N.E.C., Movassagh, M., Flament, C., Pautier, P., Morice, P., Pomel, C., Lhomme, C., Escudier, B., Chevalier, T.L., Tursz, T., Amigorena, S., Raposo, G., Angevin, E., Zitvogel, L., 2002. Mechanisms of disease Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *The Lancet*. 360, 295-305.
- Bhardwaj, U., Papadimitrakopoulos, F., Burgess, D.J., 2008. A Review of the Development of a Vehicle for Localized and Controlled Drug Delivery for Implantable Biosensors. *Society*. 2, 1016-1029.
- Burns, A.M., Chong, A.S., 2011. Alloantibodies prevent the induction of transplantation tolerance by enhancing alloreactive T cell priming. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 186, 214-21.
- Desjardins, M., Celis, J.E., van Meer, G., Dieplinger, H., Jahraus, A., Griffiths, G., Huber, L. a, 1994a. Molecular characterization of phagosomes. *The Journal of biological chemistry*. 269, 32194-200.
- Desjardins, M., Huber, L. a, Parton, R.G., Griffiths, G., 1994b. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *The Journal of cell biology*. 124, 677-88.
- Ezzelarab, M., Thomson, A.W., 2011. Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation. *Seminars in immunology*. 23, 252-63.
- Feng, H., Zeng, Y., Graner, M.W., Katsanis, E., 2002. Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells. *Blood*. 100, 4108-15.
- Fife, B.T., Guleria, I., Gubbels Bupp, M., Eagar, T.N., Tang, Q., Bour-Jordan, H., Yagita, H., Azuma, M., Sayegh, M.H., Bluestone, J. a, 2006. Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway. *The Journal of experimental medicine*. 203, 2737-47.
- Fife, B.T., Pauken, K.E., Eagar, T.N., Obu, T., Wu, J., Tang, Q., Azuma, M., Krummel, M.F., Bluestone, J. a, 2009. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nature immunology*. 10, 1185-92.

- Golshayan, D., Jiang, S., Tsang, J., Garin, M.I., Mottet, C., Lechler, R.I., 2007. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood*. 109, 827-35.
- Griesemer, A.D., Sorenson, E.C., Hardy, M. a, 2010. The role of the thymus in tolerance. *Transplantation*. 90, 465-74.
- Guermontprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., Amigorena, S., 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology*. 20, 621-67.
- Gurung, P., Kucaba, T.A., Ferguson, T.A., Griffith, T.S., 2010. NIH Public Access. *Journal Of Immunology*. 183, 319-335.
- Hernandez, J.B., Newton, R.H., Walsh, C.M., 2010. Life and death in the thymus--cell death signaling during T cell development. *Current opinion in cell biology*. 22, 865-71.
- Houde, M. Bertholet, S. Gagnon, E. Brunet, S. Goyette, G. Laplante, A. Princiotta, M.F. Thibault, P. Sacks, D. Desjardins, M., 2003. Phagosomes are competent organelles for antigen. *Nature*. 425, 402-406.
- Iyoda, T., 2002. The CD8+ Dendritic Cell Subset Selectively Endocytoses Dying Cells in Culture and In Vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 195, 1289-1302.
- Jain, R.A., 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Most*. 21, 2475-2490.
- Jhunjhunwala, S., Raimondi, G., Thomson, a W., Little, S.R., 2009. Delivery of rapamycin to dendritic cells using degradable microparticles. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. 133, 191-7.
- Kazama, H., Ricci, J.-ehrland, Herndon, J.M., Hoppe, G., Douglas, R., Ferguson, T.A., 2009. Immune tolerance induction by apoptotic cells. 29, 21-32.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology*. 26, 677-704.
- Lechler, R.I., Sykes, M., Thomson, A.W., Turka, L. a, 2005. Organ transplantation: how much of the promise has been realized? *Nature medicine*. 11, 605-13.
- Lennon-Dumenil, a.-M., Bakker, a. H., Maehr, R., Fiebiger, E., Overkleeft, H.S., Roseblatt, M., Ploegh, H.L., Lagaudriere-Gesbert, C., 2002. Analysis of Protease Activity in Live Antigen-presenting Cells Shows Regulation of the Phagosomal Proteolytic Contents During Dendritic Cell Activation. *Journal of Experimental Medicine*. 196, 529-540.

- Lutz, M.B., Schuler, G., 2002. semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in Immunology*. 23, 445-449.
- Maldonado, R.A., von Andrian, U.H., 2010. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Advances in immunology*, first ed. Elsevier Inc, pp. 111-65.
- Meijerink, M., Ferrando, M. L., Lammers, G., Taverne, N., Smith, H. E., Wells, J. M. 2012. Immunomodulatory effects of *Streptococcus suis* capsule type on human dendritic cell responses, phagocytosis and intracellular survival. *PloS one*. 7(4), e35849.
- Mirenda, V. Berton I, Read J. Cook. T. Smith, J. Dorling, A. Lechler, R., 2004. Modified Dendritic Cells Coexpressing Self and Allogeneic Major Histocompatibility Complex Molecules, pp. 987-997.
- Mora, J.R., Bono, M.R., Manjunath, N., 2003. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer ' s patch dendritic cells. *Nature*. 424, 7-12.
- Morelli, a E., 2006. The immune regulatory effect of apoptotic cells and exosomes on dendritic cells: its impact on transplantation. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 6, 254-61.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., 2010. Apoptotic cell-based therapies against transplant rejection: role of recipient's dendritic cells. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*. 15, 1083-97.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Papworth, G.D., Wang, Z., Watkins, S.C., Falo, L.D., Thomson, A.W., 2003. Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood*. 101, 611-20.
- Morelli, A.E., Thomson, A.W., 2007. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature reviews. Immunology*. 7, 610-21.
- Moser, M., Animale, L.D.P., 2003. Dendritic Cells in Immunity and Tolerance — Do They Display Opposite Functions? 19, 5-8.
- Mueller, D.L., 2010. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nature immunology*. Nature Publishing Group. 11, 21-7.
- Ohkura, N., Sakaguchi, S., 2010. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Seminars in immunopathology*. 32, 95-106.

- Pêche, H., Heslan, M., Usal, C., Amigorena, S., & Cuturi, M. C. 2003. Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation*. 76, 1503-10.
- Pino, K., 2005. Caracterización fenotípica y funcional de células dendríticas de médula ósea de ratón. Seminario de Título. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Puliaeva, I., Soloviova, K., Puliaiev, M., Lang, T., Puliaev, R., Via, C.S., 2011. Enhancement of suboptimal CD8 cytotoxic T cell effector function in vivo using antigen-specific CD80 defective T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 186, 291-304.
- Ramírez, V., 2009. Efecto de la incorporación de fagosomas de PLGA en combinación de vitamina D3 en las características fenotípicas de las células dendríticas. Seminario de Título. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Schmidt, A., Oberle, N., Krammer, P.H., 2012. Molecular Mechanisms of Treg-Mediated T Cell Suppression. *Frontiers in Immunology*. 3, 1-20.
- Shofner, J.D., Vasquez, J.G., Berger, C.L., Edelson, R.L., 2007. Improved generation of anti-tumor immunity by antigen dose limitation. *Journal of immune based therapies and vaccines*. 5, 2.
- Sigmundsdottir, H., Butcher E.C., 2008. Improved generation of anti-tumor immunity by antigen dose limitation. *Journal of immune based therapies and vaccines*. 5, 2.
- Silva, C., 2011. Efecto del tratamiento con fagosomas PLGA alogénicos en la respuesta inmune humoral y celular in vivo. Seminario de Título. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., Nussenzweig, M.C., 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology*. 21, 685-711.
- Thaiss, C. a, Semmling, V., Franken, L., Wagner, H., Kurts, C., 2011. Chemokines: a new dendritic cell signal for T cell activation. *Frontiers in immunology*. 2, 31.
- Théry, C., Duban, L., Segura, E., Véron, P., Lantz, O., Amigorena, S., 2002. Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature immunology*. 3, 1156-62.
- Ureta, G., Osorio, F., Morales, J., Roseblatt, M., Bono, M.R., Fierro, J. a, 2007. Generation of dendritic cells with regulatory properties. *Transplantation proceedings*. 39, 633-7.

- van Kooten, C., Lombardi, G., Gelderman, K. a., Sagoo, P., Buckland, M., Lechler, R., Cuturi, M.C., 2011. Dendritic Cells as a Tool to Induce Transplantation Tolerance: Obstacles and Opportunities. *Transplantation*. 91, 2-7.
- Walseng, E., Furuta, K., Bosch, B., Weih, K. a, Matsuki, Y., Bakke, O., Ishido, S., Roche, P. a, 2010. Ubiquitination regulates MHC class II-peptide complex retention and degradation in dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107, 20465-70.
- Wang, G.-J., Liu, Y., Qin, A., Shah, S. V., Deng, Z., Xiang, X., Cheng, Z. 2008. Thymus exosomes-like particles induce regulatory T cells. *Journal of immunology*. 181, 5242-5248.
- Watowich, S., Liu, Y., 2010. Mechanisms regulating dendritic cell specification and development. *Immunol rev*. 238(1): 76-92.
- Wood, K.J., Goto, R., 2012. Mechanisms of Rejection: Current Perspectives. *Transplantation*. 93, 1-10.
- Yamaguchi, T., Wing, J.B., Sakaguchi, S., 2011. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Seminars in immunology*. Elsevier Ltd. 23, 424-30.
- Yang, J., Riella, L.V., Chock, S., Liu, T., Zhao, X., Yuan, X., Paterson, A.M., Vanguri, V., Yagita, H., Azuma, M., Blazar, B.R., Freeman, G.J., Rodig, S.J., Sharpe, H., Chandraker, A., Sayegh, M.H., 2011. The Novel Costimulatory Programmed Death Ligand 1/B7.1 Pathway Is Functional in Inhibiting Alloimmune Responses In Vivo. *The Journal of Immunology*. 187, 1113-1119.

