

UCH-FC
Biotecnología
C764
C.1

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**



**“ROL DE LA HORMONA MINERALOCORTICOIDE
ALDOSTERONA COMO MODULADOR DE LA
RESPUESTA INMUNE ADQUIRIDA”**

**Seminario de título entregado a la
Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos
Para optar al título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular**

Por

**Francisco Contreras Crenovich
Noviembre 2008
Santiago – Chile**

Director de Seminario de Título: Dr. Alexis M. Kalergis.



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr.:

FRANCISCO CONTRERAS CRENOVICH

“ROL DE LA HORMONA MINERALOCORTICOIDE ALDOSTERONA COMO MODULADOR DE LA RESPUESTA INMUNE ADQUIRIDA”

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

Dr. Alexis Kalergis Parra
Director Seminario de Título

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación

Dra. María Rosa Bono Merino
Presidente Comisión

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

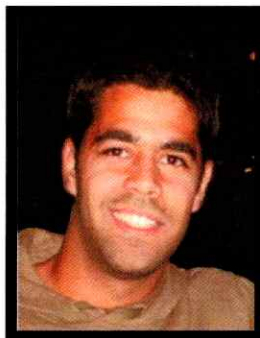
Dr. Mario Roseblatt Silber
Corrector

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Noviembre de 2008

BIOGRAFÍA

Hace ya 25 años ocurrió el acontecimiento que me permite escribir estas líneas: yo, Francisco Contreras Crenovich nací un día viernes 1° de Julio de 1983. A partir de ese momento me convertí en el hijo menor de una familia compuesta por mis padres, Mario y Lucía, y mis hermanos, María José y Nicolás. Desde muy pequeño comencé mis estudios en el Colegio De La Salle de La Reina, establecimiento en el cual cursé doce años de enseñanza escolar, de los cuales atesoro grandes recuerdos y aún mantengo grandes amistades. Destaco la formación deportiva que recibí en mi colegio, particularmente en el handball, deporte que me llevó a conocer otros países, conquistar títulos nacionales y a formar parte de la selección nacional juvenil. Fue precisamente durante estos últimos años de formación escolar en los cuales me sentí atraído por las ciencias biológicas, interés que me motivó a ingresar a la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile en el año 2002. Durante mi paso por esta Facultad he tenido la oportunidad única de conocer profesores de excelencia, aquellos cuyas enseñanzas van más allá de lo netamente científico, y compañeros de carrera con los cuales compartimos momentos memorables. Y así, a noviembre de 2008, llego al momento de mi titulación: el final de un camino que estoy seguro desembocará en muchas otras rutas.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi familia por su constante apoyo, en particular a mis padres los cuales siempre se sacrificaron pensando en mi educación. Van las gracias para mi polola también, quien me alegró con su compañía y comprendió las excentricidades de la vida del científico durante estos años.

Agradezco a mi director de tesis, el Dr. Alexis Kalergis por darme la oportunidad de formar parte de su grupo y de participar en proyectos tan interesantes.

Agradezco a los Dres. Carlos Fardella, Luis Michea y Fernando Figueroa por su participación en las discusiones científicas concernientes a este proyecto. Agradezco también el tiempo dedicado por la Dra. Ma. Rosa Bono en la revisión y mejora de las últimas versiones de esta tesis. Aprovecho de dar las gracias a Cristián Amador, Cristián Carvajal y Jaime De Calisto por su excelente disposición a la hora de facilitarme reactivos y de discutir técnicas y resultados.

Agradezco también al excelente grupo de personas que tuve la oportunidad de conocer en el laboratorio: Erick Riquelme, Carolina Prado, Rodrigo Pacheco, Mirentxu Iruretagoyena, Magaly Barrientos, Claudio Figueroa, Leandro Carreño, Pablo González, Eduardo Leiva, Natacha Marini, Kelly Cautivo, Roberto Gómez, Jorge Mora y Susan Bueno. Gracias por brindarme su ayuda en el minuto preciso y por compartir conmigo sus experiencias. Me gustaría agradecer de manera particular a Andrés Herrada, compañero de labores y amigo, no sólo por su aporte intelectual a esta tesis sino por su gran personalidad y calidad humana. Estoy seguro de que conseguirá las metas que se proponga.

Es mi obligación agradecer a las personas responsables de los servicios de microscopía confocal de la Universidad de Santiago y de la P. Universidad Católica, Daniel Valdés y Ximena Verges, quienes con mucha paciencia me ayudaron a utilizar este equipo y analizar posteriormente las imágenes. Su ayuda es fundamental para el desarrollo de muchas investigaciones!

Finalmente, me gustaría agradecer a mis amigos y, a estas alturas colegas de carrera, los cuales siempre mostraron interés y preocupación por mí, gracias a Dinka M.,

Andrés M., Felipe V., Gaby S., Toño G., Susana C, Cristián V., Seba Z., Charlie F. y, por supuesto, a Richard Kawada por el desarrollo de la corriente charista de pensamiento.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado a través de los proyectos FONDECYT 1070352, 1070876, 1050265, 1050690 y 1050979; FONDEF D04I1075; INCO-CT-2006-032296; y el Núcleo Milenio en Inmunología e Inmunoterapia (P04/030-F).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
2. LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
3. RESÚMEN.....	xiii
4. ABSTRACT.....	xv
5. INTRODUCCIÓN.....	1
5.1. Función fisiológica del sistema inmune.....	2
5.2. Las DCs en la iniciación de respuestas adaptativas contra patógenos.....	4
5.3. Rol de las DCs en la mantención de tolerancia.....	7
5.4. Participación del sistema inmune en el desarrollo de hipertensión y enfermedades vasculares.....	10
5.5. El sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona cumple un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis hídrica y de electrolitos en el organismo.....	11
5.6. Rol alternativo de aldosterona en la patogénesis del daño vascular.....	13
6. HIPÓTESIS.....	15
7. OBJETIVOS.....	15
7.1. Objetivo general.....	15
7.2. Objetivos específicos.....	15
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
8.1. Animales.....	17
8.2. Reactivos y péptidos.....	17
8.3. Obtención de DCs a partir de precursores de medula ósea de ratón.....	18
8.4. Obtención de linfocitos T desde ganglios linfáticos de ratones transgénicos.....	19
8.5. Co-cultivo de DCs con linfocitos T transgénicos en presencia de aldosterona.....	19

8.6. Ensayo de activación de linfocitos T con anticuerpo anti-CD3ε adherido a placa.....	20
8.7. Expresión de moléculas coestimuladoras y secreción de citoquinas por DCs en respuesta a aldosterona.....	21
8.8. Cuantificación de citoquinas mediante ELISA de captura.....	21
8.9. Detección de la fosforilación de MAPKs en DCs.....	22
8.10. Análisis de formación de sinapsis inmunológica mediante microscopía confocal.....	23
8.11. Análisis de expresión del MR mediante western blot.....	24
8.12. Inducción de EAE.....	24
8.13. Tratamiento con deoxicorticosterona acetato y espironolactona.....	25
8.14. Detección de respuesta de anticuerpos anti-MOG.....	26
8.15. Determinación de la respuesta de linfocitos T específicos para MOG.....	26
9. RESULTADOS.....	28
9.1. Aldosterona potencia la activación de linfocitos T CD8+ por DCs.....	28
9.2. La activación de linfocitos T no es afectada de manera directa por aldosterona.....	32
9.3. Aldosterona no altera la formación de sinapsis inmunológica entre DCs y linfocitos T.....	34
9.4. Aldosterona modula la expresión de PD-L1 y PD-L2 en DCs.....	39
9.5. Aldosterona potencia la secreción de IL-6 y TGF-β por DCs de manera dependiente del MR.....	42
9.6. Aldosterona induce la activación de las MAPK JNK en DCs.....	44
9.7. DCs tratadas con aldosterona promueven la secreción de IL-17 por linfocitos T CD4+.....	46
9.8. Aldosterona aumenta la severidad de un modelo murino de esclerosis múltiple.....	49
9.9. Aldosterona potencia la respuesta Th17 anti-mielina en un modelo de autoinmunidad.....	52

10. DISCUSIÓN.....	55
10.1. Potenciación de la activación de linfocitos T CD8+ inducida por aldosterona.....	56
10.2. Modulación de la actividad de las DCs mediante la activación del MR.....	58
10.3. Desarrollo de inmunidad tipo Th17 y aumento en la gravedad de enfermedad autoinmune inducido por aldosterona.....	63
10.4. Posible aplicación de espironolactona como droga inmunosupresora.....	66
11. CONCLUSIONES.....	67
12. BIBLIOGRAFÍA.....	68

1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Las DCs como enlace entre la respuesta innata y adquirida.....	4
Figura 2: Activación de DCs e iniciación de la respuesta inmune adquirida.....	6
Figura 3: Participación de las DCs en la mantención de tolerancia inmunológica.....	9
Figura 4: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.....	12
Figura 5: Sistema experimental para evaluar la activación de linfocitos T por DCs in vitro.....	30
Figura 6: Aldosterona potencia la activación de linfocitos T CD8 ⁺ por DCs.....	31
Figura 7: Aldosterona no afecta directamente la activación de linfocitos T CD8 ⁺	33
Figura 8: Sistema experimental para evaluar la formación de sinápsis inmunológica entre linfocitos T y DCs.....	36
Figura 9: La formación de sinapsis inmunológica entre linfocitos T y DCs no es afectada por aldosterona.....	37
Figura 10: Aldosterona modula la expresión de PD-L1 y PD-L2 en DCs.....	41
Figura 11: Aldosterona potencia la secreción concertada de IL-6 y TGF- β por DCs mediante un proceso que requiere la señalización a través del MR.....	43
Figura 12: Aldosterona induce la fosforilación de las MAPK JNK en DCs.....	45
Figura 13: DCs tratadas con aldosterona potencian la polarización de linfocitos T CD4 ⁺ en células Th17.....	48
Figura 14: Las manifestaciones clínicas de una enfermedad autoinmune son exacerbadas por el tratamiento con DOCA.....	51
Figura 15: Aldosterona promueve la respuesta contra mielina potenciando la producción de IL-17 y la secreción de IgG específica.....	54

2. LISTA DE ABREVIATURAS

APC: Célula presentadora de antígenos (Antigen presenting cell)

APC (en anticuerpos): Aloficocianina (Allophycocyanin)

BSA: Albúmina de suero de bovino (Bovine serum albumin)

DC: Célula dendrítica (Dendritic cell)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)

DOCA: Desoxicortecosterona acetato (Deoxycorticosterone acetate)

EAE: Encefalomiелitis autoinmune experimental (Experimental autoimmune encephalomyelitis)

ELISA: Ensayo "inmuno-absorbente" ligado a enzima (Enzyme-linked immunosorbent assay)

ENaC: Canal de sodio epitelial (Epithelial sodium channel)

ERK: Quinasa regulada por señal extracelular (Extracellular signal-regulated kinase)

FBS: Suero fetal de bovino (Fetal bovine serum)

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein isothiocyanate)

GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

HIV: Virus de inmunodeficiencia humana (Human immunodeficiency virus)

HRP: Peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase)

IFN: Interferón (Interferon)

Ig: Inmunoglobulina (Immunoglobulin)

IL: Interleuquina (Interleukin)

JNK: Quinasa N-terminal de c-Jun (c-Jun N-terminal kinase)

LPS: Lipopolisacárido (Lipopolysaccharide)

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos (Mitogen-activated protein kinase)

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (Major histocompatibility complex)

MMP: Metaloproteínasa de matriz (Matrix metalloproteinase)

MOG: Glicoproteína de la mielina del oligodendrocito (Myelin oligodendrocyte glycoprotein)

MR: Receptor de mineralocorticoides (Mineralocorticoid receptor)

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero (Messenger ribonucleic acid)

NF- κ B: Factor nuclear-kappa B (Nuclear factor-kappa B)

OVA: Ovalbúmina (Ovalbumin)

PA: Aldosteronismo primario (Primary aldosteronism)

PAMP: Patrón molecular asociado a patógenos (Pathogen-associated molecular pattern)

PBS: Tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline)

PE: Ficoeritrina (Phycoerythrin)

pMHC: complejo péptido/MHC

RAA: Renina-angiotensina-aldosterona (Renin-angiotensin-aldosterone)

RNA: Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)

TCR: Receptor de linfocito T (T cell receptor)

TGF: Factor de crecimiento transformador (Transforming growth factor)

Th: Linfocito T de ayuda (T helper cell)

TMB: 3,3',5,5' tetra-metil benzidina (3,3',5,5' tetra-methyl benzidine)

3. RESÚMEN

Aldosterona cumple un importante rol en la regulación de la presión sanguínea mediante el aumento de la retención de sodio y agua en el riñón. De acuerdo a esta función, el elevado riesgo cardiovascular observado en pacientes con aldosteronismo primario (PA) ha sido atribuido tradicionalmente al desarrollo de hipertensión en respuesta a elevados niveles de aldosterona plasmática. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que aldosterona promueve el daño vascular de manera independiente al aumento en la presión sanguínea, ya que pacientes que padecen PA sufren de más eventos cardiovasculares que individuos hipertensos que presentan concentraciones normales de aldosterona circulante. Dado que las condiciones inflamatorias que conducen al desarrollo de daño vascular pueden ser promovidas por linfocitos T, el objetivo de esta tesis fue evaluar la capacidad de aldosterona de modular la iniciación de la respuesta inmune adquirida.

Como las células dendríticas (DCs) tienen la capacidad única de regular el tipo y la magnitud de las respuestas mediadas por linfocitos T, evaluamos si la interacción entre DCs y linfocitos T puede ser modulada por aldosterona. En este trabajo mostramos que esta hormona aumentó la activación de linfocitos T $CD8^+$ de manera dependiente de DCs. De manera consistente, la expresión del receptor de mineralocorticoides (MR) fue detectada en DCs, las cuales presentaron una menor expresión de PD-L1 y PD-L2 en superficie en respuesta a aldosterona. Además, el tratamiento con esta hormona induce la activación de la vía de las MAPK y la secreción concertada de IL-6 y TGF- β por DCs. Adicionalmente, DCs estimuladas con aldosterona imponen un fenotipo T de ayuda 17

(Th17) a linfocitos T CD4⁺, los cuales han sido recientemente asociados con el desarrollo de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Concordante con estos resultados, la administración sistémica de aldosterona agravó la progresión de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo murino de enfermedad autoinmune promovido por linfocitos Th17. De manera adicional, el bloqueo del MR suprime todos los efectos inducidos por aldosterona en DCs e impide el desarrollo de EAE en ratones tratados con aldosterona. Nuestros datos sugieren que mediante la modulación de la función de las DCs, aldosterona potencia la activación de linfocitos T CD8⁺ y promueve la polarización hacia respuestas inmunes tipo Th17, lo cual podría contribuir con el daño inflamatorio que conduce al desarrollo de enfermedades vasculares.

4. ABSTRACT

Aldosterone plays an important role in the control of blood pressure by promoting sodium and water retention in the kidney. According to this function, increased cardiovascular risk observed in patients with primary aldosteronism (PA) has been traditionally attributed to hypertension development in response to high plasma aldosterone levels. However, recent studies have shown that aldosterone promotes vascular damage independently of blood pressure elevation, as PA patients experience more cardiovascular events than hypertensive individuals showing normal circulating aldosterone concentrations. Since inflammatory conditions leading to vascular damage can be promoted by T cell-mediated immunity, the aim of this thesis was to assess the ability of aldosterone to modulate the initiation of an adaptive immune response.

As dendritic cells (DCs) have the unique capacity to regulate the type and magnitude of T cell responses, we evaluated whether the interaction between DCs and T cells can be modulated by aldosterone. Here we show that this hormone augmented the activation of CD8⁺ T cells in a DC-dependent fashion. Consistently, mineralocorticoid receptor (MR) expression was detected in DCs, which showed decreased surface expression of PD-L1 and PD-L2 in response to aldosterone. Furthermore, aldosterone treated-DCs showed activation of MAPK pathway and secreted IL-6 and TGF- β in a concerted manner. In addition, DCs stimulated with aldosterone impose a T helper 17 (Th17) phenotype to CD4⁺ T cells, which have recently been associated to the promotion of inflammatory and autoimmune diseases. Accordingly, systemic administration of aldosterone enhanced the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a

murine model of autoimmune disease promoted by Th17 cells. In addition, blockade of the MR suppressed all the effects elicited by aldosterone on DCs and abolished EAE development in aldosterone-treated mice. Our data suggest that modulation of DC function by aldosterone enhances CD8⁺ T cell activation and promotes Th17-polarized immune responses, which might contribute to the inflammatory damage leading to vascular disease.

5. INTRODUCCIÓN

Los accidentes vasculares constituyen la primera causa de muerte a nivel mundial y uno de los principales factores de riesgo es la hipertensión arterial, una condición que se presenta en cerca del 20 % de la población, tanto en Chile como en países desarrollados (Lewington y col., 2002; Wang y Wang, 2004; Fasce y col., 2007). Un importante mediador de la hipertensión es la hormona aldosterona, la cual cuando es producida de manera excesiva induce una mayor reabsorción de agua en el riñón, lo que tiene como consecuencia un incremento en la presión sanguínea. Esta condición se conoce con el nombre aldosteronismo primario (PA) y es altamente prevalente entre los pacientes diagnosticados con hipertensión (Mosso y col., 2003; Mulatero y col., 2004).

En los últimos años, una cantidad importante de evidencia apunta a que aldosterona no solo juega un rol central en la etiología de la hipertensión mediante la regulación del volumen sanguíneo, sino que además puede modular la patogénesis de enfermedades vasculares induciendo un estado inflamatorio, el cual promueve el remodelamiento cardíaco, el engrosamiento de la pared vascular y el desarrollo de aterosclerosis (Brown, 2008).

Debido a la reconocida participación del sistema inmune en el establecimiento de estados inflamatorios, este estudio pretende evaluar la capacidad de aldosterona de modular la iniciación de respuestas inmunes de tipo proinflamatorio/autoinmune, lo que podría establecer la relación entre los efectos inflamatorios inducidos por aldosterona y el desarrollo de hipertensión y daño vascular en respuesta a elevados niveles de dicha hormona.

5.1. Función fisiológica del sistema inmune

Debido a la capacidad de proveer un ambiente protegido y abundante en nutrientes, los organismos superiores se han convertido en nichos atractivos para el desarrollo de diferentes tipos de microorganismos, siendo posible encontrar bacterias, hongos y virus capaces de interactuar con sus hospederos en una relación de mutuo beneficio. Sin embargo, ciertos grupos de microorganismos han desarrollado estrategias para invadir a los organismos superiores y diseminar hacia otros hospederos, convirtiéndose en patógenos capaces de provocar enfermedades. Como consecuencia de la presión impuesta por dichos patógenos, los organismos superiores han desarrollado mecanismos de defensa que en su conjunto constituyen el sistema inmune, cuya principal función es proteger al organismo frente a los agentes infecciosos evitando dañar los tejidos propios. La defensa eficiente del organismo requiere la contribución de los mecanismos generales de defensa desplegados por la inmunidad innata y la participación de un componente más específico, la inmunidad adaptativa (Medzhitov y Janeway, 1997a). La inmunidad innata, tal como su nombre indica, es capaz de responder de manera inmediata frente a las infecciones, aún cuando no se haya enfrentado previamente a los patógenos que las provocan. Esta propiedad se debe a la expresión de receptores que se caracterizan por reconocer estructuras conservadas presentes en los patógenos, o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Estos receptores se denominan en su conjunto receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos y permiten la identificación de productos microbianos tales como el peptidoglicán, LPS, CpG DNA, RNA de doble y simple hebra, entre otros (Brightbill y col., 1999; Aderem y Ulevitch, 2000). La interacción entre estas estructuras y los receptores expresados en células del

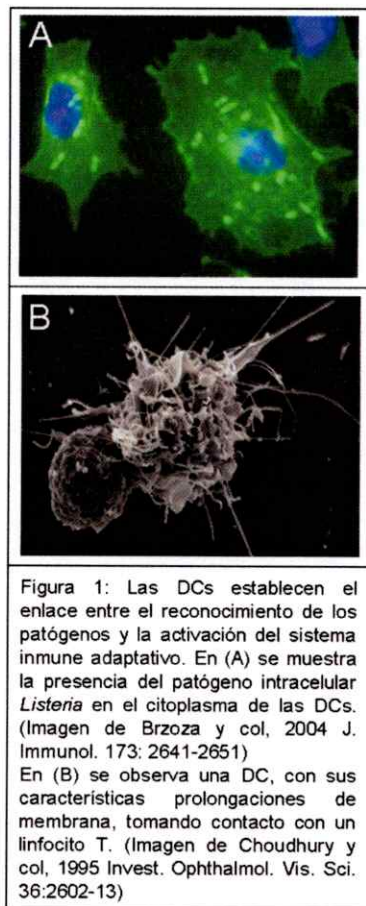
sistema inmune innato, como macrófagos y neutrófilos, promueve la internalización y destrucción de patógenos en compartimentos lisosomales, mediante la activación de diferentes mecanismos microbicidas (Medzhitov y Janeway, 1997b; Greenberg y Grinstein, 2002).

Aun cuando los rápidos mecanismos de la inmunidad innata son esenciales en la defensa del organismo, en muchos casos estos no son capaces de controlar la infección, y se requiere la participación de la inmunidad específica. Generalmente, la activación de la inmunidad adaptativa resulta en la erradicación del patógeno debido a la capacidad tanto de eliminar directamente células infectadas como de potenciar los mecanismos efectores del sistema innato. Este tipo de inmunidad se caracteriza por reconocer de manera específica una enorme cantidad de antígenos derivados de patógenos, pudiendo distinguir entre antígenos que exhiben sutiles diferencias entre sí. Adicionalmente, esta respuesta es capaz de generar memoria inmunológica, es decir el sistema es capaz de recordar al agente infeccioso y responder de manera más rápida y eficiente ante futuras exposiciones al mismo patógeno. Estas propiedades reflejan las características de las células que componen el sistema inmune adaptativo: los linfocitos T, responsables tanto de la eliminación de células infectadas (linfocitos T $CD8^+$), como de definir el tipo de respuesta (linfocitos T $CD4^+$), y los linfocitos B, encargados de secretar diferentes tipos de anticuerpos. A pesar de que la inmunidad específica es indispensable para la defensa contra patógenos, el inicio eficiente de este tipo de respuestas requiere la participación de miembros del sistema inmune innato, específicamente de células presentadoras de antígenos (APCs) profesionales. Una APC de particular relevancia en el inicio de

respuestas primarias son las células dendríticas (DCs) debido a que poseen la capacidad única de activar linfocitos T vírgenes (Steinman, 1991; Hart, 1997; Bell y col., 1999).

5.2. Las DCs en la iniciación de respuestas adaptativas contra patógenos

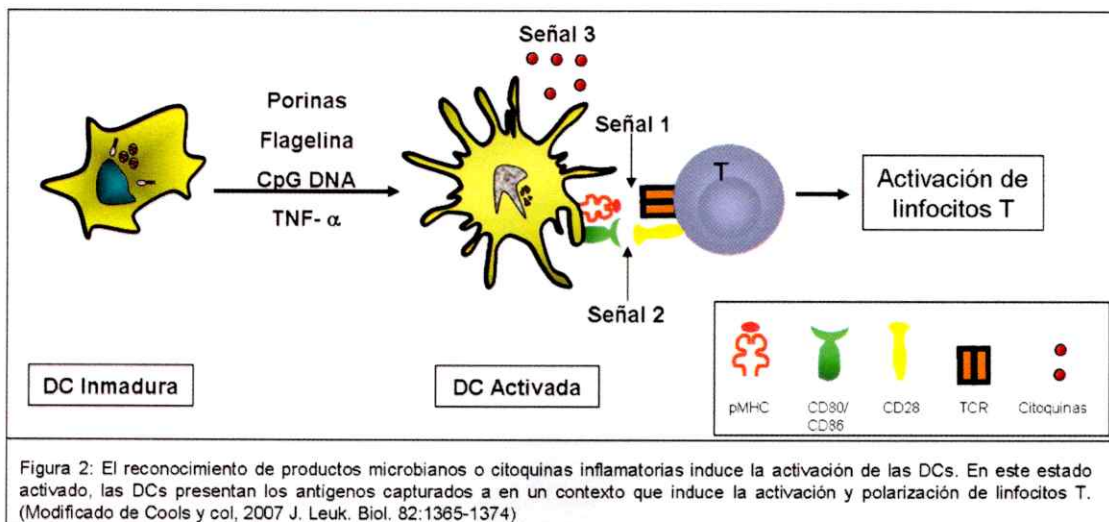
La activación de linfocitos T vírgenes es un proceso altamente complejo, dado que requiere el encuentro de dos elementos que se encuentran espacialmente separados; mientras los patógenos cuyos antígenos deben ser reconocidos se encuentran en sitios periféricos, los linfocitos T circulan por la sangre y el sistema linfático. Además, las células infectadas generalmente no pueden alertar al sistema inmune sobre la presencia de los patógenos, a lo que se suma tanto la baja frecuencia de linfocitos T específicos como la baja afinidad que presentan los receptores de reconocimiento de antígenos (TCRs) expresados por las células T (Banchereau y Steinman, 1998). La solución a estas limitaciones recae en la función de las DCs. Estas células se ubican en los sitios de entrada de los patógenos en un estado inmaduro, caracterizándose por poseer una alta capacidad de capturar y procesar antígenos (Banchereau y Steinman, 1998). Ante el reconocimiento de señales de peligro, como PAMPs o citoquinas inflamatorias, ocurre la activación de las DCs, las que migran desde el sitio de la infección hacia los ganglios linfáticos, conectando de esta manera el sitio de tejido infectado con la región anatómica en la que



se da inicio a las respuestas específicas, los nodos linfáticos (Lanzavecchia y Sallusto, 2001). Otra característica de las DCs activadas es la capacidad de expresar cantidades importantes de antígenos asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), lo que provee el contexto apropiado para el reconocimiento de antígenos por el TCR de los linfocitos T (señal 1). Se ha reportado que la cantidad de complejo péptido/MHC (pMHC) desplegado por las DCs en los ganglios linfáticos es 10 a 100 veces más alta que la cantidad expresada por otras APCs, como linfocitos B y monocitos (Inaba y col., 1997). Además del reconocimiento del pMHC por el TCR específico, la eficiente activación de linfocitos T exige la estimulación de coreceptores, como CD28, por parte de moléculas coestimuladoras presentes en la superficie de DCs activadas (señal 2). Consistente con el rol que juegan las DCs en la activación de linfocitos T vírgenes, el proceso de activación incrementa la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 en la superficie de las DCs, lo cual permite la potente estimulación de linfocitos T (Caux y col., 1994; Inaba y col., 1994).

De manera adicional al reconocimiento de complejos pMHC y moléculas coestimuladoras, se ha descrito que la inducción de inmunidad adaptativa requiere la estimulación mediante una tercera señal entregada por las DCs (Curtsinger y col., 2003). Esta señal 3 corresponde a citoquinas secretadas por las DCs, las cuales son reconocidas por receptores presentes en linfocitos T. Además de promover la activación de la inmunidad adaptativa, esta señal permite la polarización de linfocitos T CD4⁺ hacia diferentes linajes de linfocitos efectores, lo que permite al sistema inmune generar respuestas especializadas en función del tipo de microorganismo que provoca la infección (Pulendran y col., 2001). De este modo, el reconocimiento de ciertos

patógenos intracelulares induce la secreción de IL-12 por las DCs, lo que, en conjunto con la expresión de pMHC y de moléculas coestimuladoras, promueve la polarización a linfocitos T CD4⁺ de ayuda (helper) de tipo 1 (Th1). Este linaje se caracteriza por secretar interferón (IFN)- γ , lo que promueve la activación de macrófagos en el sitio de infección y, consecuentemente, la eliminación de aquellos agentes infecciosos capaces de sobrevivir al interior de estas células fagocíticas. Por otro lado, en respuesta a patógenos extracelulares como protozoos y helmintos, las DCs presentan antígenos en ausencia de IL-12, lo que induce la secreción estable de IL-4, IL-5 e IL-13 por parte de linfocitos T CD4⁺ denominados Th2. La principal función efectora de este tipo de linfocitos T es promover la secreción de inmunoglobulina E por parte de linfocitos B específicos, logrando de esta manera controlar la infección mediante la inflamación mediada principalmente por eosinófilos (Mosmann y Coffman, 1989; Dong y Flavell, 2001). Adicionalmente, investigaciones recientes han identificado un tercer tipo de linfocitos T CD4⁺ efectores, denominados Th17 debido a la abundante secreción de IL-17 inducida en respuesta a su activación (Dong, 2006; Harrington y col., 2006). Este tipo



de linfocitos T se diferencia a partir de precursores vírgenes en respuesta a TFG- β e IL-6, dos citoquinas que pueden ser producidas por DCs (Veldhoen y col., 2006). Aún cuando no se han identificado los PAMPs que inducen la secreción de dichas citoquinas por DCs, la actividad efectora de los linfocitos Th17 desempeña un rol protector frente a infecciones causadas por patógenos extracelulares, en particular mediante el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección (Infante-Duarte y col., 2000; Ye y col., 2001)

5.3. Rol de las DCs en la mantención de tolerancia

El sistema inmune adaptativo se caracteriza por desarrollar un repertorio de linfocitos T y B, en el que cada miembro expresa un único receptor de antígeno generado mediante un proceso de recombinación somática que ocurre durante el desarrollo de dichos linfocitos. Debido a su naturaleza aleatoria, este proceso permite tanto el reconocimiento de antígenos derivados de patógenos como derivados de tejidos propios, lo que puede resultar en la activación de linfocitos auto-reactivos, la destrucción de tejidos y el desarrollo de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes. Es por esta razón que el sistema inmune cuenta con mecanismos activos que generan tolerancia a antígenos propios, en los cuales se ha descrito que las DCs juegan un rol preponderante (Matzinger y Guerder, 1989). En el caso de los linfocitos T, los precursores inmaduros abandonan la médula ósea para alojarse en el timo, órgano en el que ocurre tanto el rearrreglo génico como la expresión de TCRs por parte de los linfocitos en desarrollo (timocitos). Una vez que ocurre la expresión del TCR en la superficie de los timocitos, estos sufren un proceso de selección mediante el reconocimiento de péptidos propios que son

presentados en moléculas de MHC de células tanto del epitelio tímico como por DCs que residen en dicho órgano (Volkmann y col., 1997; Zinkernagel y Althage, 1999). Como resultado de este proceso sólo sobreviven aquellos timocitos cuyo TCR reconoce pMHC propios con baja afinidad (selección positiva), mientras los que reconocen complejos pMHC con alta afinidad son eliminados mediante apoptosis (selección negativa) (Brocker y col., 1997; Brocker, 1999). Este mecanismo, denominado tolerancia central, asegura la circulación de linfocitos T capaces de reconocer antígenos cargados en moléculas de MHC propias y permite la eliminación de gran cantidad de linfocitos T auto-reactivos. Sin embargo, el ambiente tímico no proporciona la totalidad de los antígenos expresados por el organismo, por lo que entre un 25 y un 40 % de los linfocitos T con la capacidad de responder a antígenos propios escapan al proceso de selección que tiene lugar en el timo (Bouneaud y col., 2000). En base a esto, se ha demostrado que el sistema inmune cuenta con mecanismos de tolerancia periférica, los cuales evitan el inicio de respuestas contra antígenos propios en la periferia y previenen el desarrollo de autoinmunidad (Walker y Abbas, 2002). En este tipo de tolerancia, la estimulación de linfocitos T auto-reactivos por DCs puede resultar en la eliminación por apoptosis, en la inactivación funcional (anergia) o bien en el desarrollo de linfocitos T reguladores (Treg) (Kurts y col., 1997; Adler y col., 1998; Verhasselt y col., 2004). Evidencia reciente ha demostrado que las DCs en estado inmaduro capturan antígenos desde ambientes locales y sufren un proceso de maduración en ausencia de señales de peligro, lo que permite tanto la migración a nodos linfáticos como la presentación de antígenos propios en un contexto de baja densidad de moléculas coestimuladoras activadoras (Akbari y col., 2001; Stoitznier y col., 2003; Ip y Lau, 2004). A pesar de que

los mecanismos moleculares involucrados en el silenciamiento de linfocitos auto-reactivos por DCs en reposo no han sido completamente dilucidados, se ha demostrado que estas células contribuyen de manera importante tanto en la eliminación de linfocitos T que reconocen antígenos propios como en la inducción de un fenotipo regulador (Treg) (Dhodapkar y col., 2001; Hawiger y col., 2001; Probst y col., 2003). En base a la evidencia disponible se ha propuesto que en un estado basal, es decir en ausencia de infección o inflamación, las DCs capturan antígenos propios o ambientales e inducen el silenciamiento de aquellos linfocitos T específicos para este tipo de antígenos. De este modo, el sistema es capaz de responder solamente contra antígenos ajenos al organismo, aun cuando en condiciones inflamatorias las DCs presentan tanto antígenos inocuos como derivados de patógenos en forma inmunogénica (Steinman y col., 2003).

Debido al importante rol que cumplen las DCs en el balance entre inmunidad y tolerancia, la modulación de su estado funcional es una variable crítica tanto para la protección contra infecciones como para evitar el desarrollo de enfermedades inflamatorias.

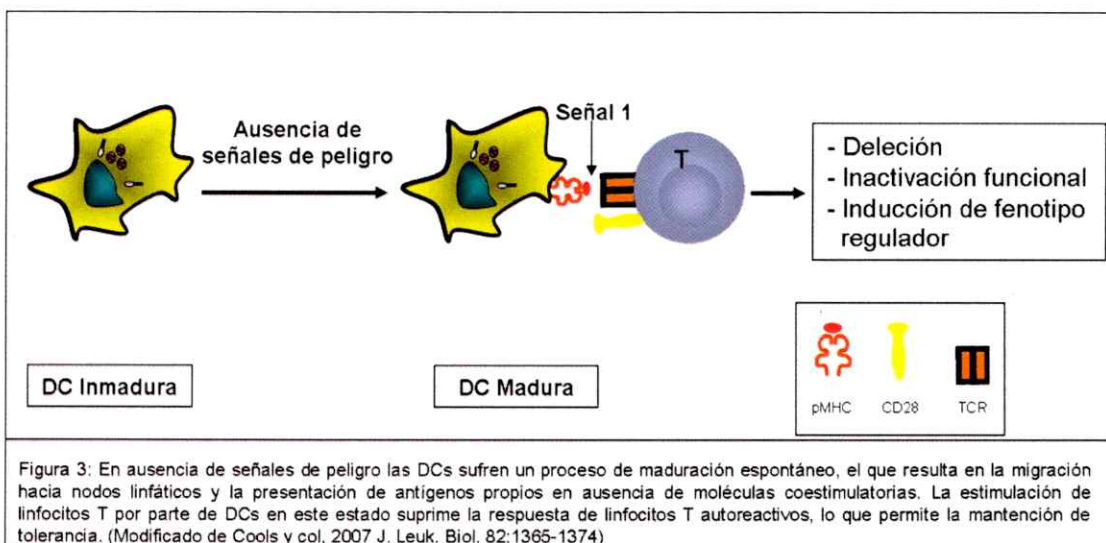


Figura 3: En ausencia de señales de peligro las DCs sufren un proceso de maduración espontáneo, el que resulta en la migración hacia nodos linfáticos y la presentación de antígenos propios en ausencia de moléculas coestimuladoras. La estimulación de linfocitos T por parte de DCs en este estado suprime la respuesta de linfocitos T autoreactivos, lo que permite la mantención de tolerancia. (Modificado de Cools y col., 2007 J. Leuk. Biol. 82:1365-1374)

5.4. Participación del sistema inmune en el desarrollo de hipertensión y enfermedades vasculares

Una de las condiciones en las que el sistema inmune puede tener un rol nocivo contra tejidos del organismo es en el desarrollo de hipertensión y daño vascular. La participación del sistema inmune en la inducción de daño vascular se basa principalmente en la capacidad de células inmunocompetentes de asociarse a tejidos endoteliales y de promover un estado de estrés oxidativo a nivel de la pared vascular. La producción de especies reactivas de oxígeno promueve la vasoconstricción, a la vez que propician el desarrollo de fibrosis y un consecuente aumento en la rigidez vascular (Gryglewski y col., 1986; Griendling y col., 1994). Diversas líneas de investigación han entregado evidencias que involucran al sistema inmune con el desarrollo de hipertensión y accidentes vasculares. En este sentido, varios estudios han demostrado que la manipulación del sistema inmune, mediante la remoción del timo o la inhibición farmacológica, previene el desarrollo de hipertensión en diferentes modelos experimentales (Bataillard y col., 1986; Muller y col., 2002; Tian y col., 2007). Consistentemente, un estudio reciente demostró que un número importante de pacientes diagnosticados con artritis reumatoidea o psoriasis también presentan hipertensión, y que el tratamiento de estos cuadros de autoinmunidad con inmunosupresores normaliza los niveles de presión sanguínea (Herrera y col., 2006). Por otra parte, la infusión de linfocitos T activados para el tratamiento de metástasis pulmonares de melanoma incrementa la presión en humanos (Balsari y col., 1986), evidencia que es apoyada por la activación de la inmunidad celular y humoral observada en mujeres con preeclampsia (Minagawa y col., 1999). Adicionalmente, estudios recientes muestran que la

disminución de linfocitos T CD4⁺ observada en pacientes infectados con HIV se correlaciona con una menor prevalencia de hipertensión, y que la utilización de antiretrovirales altamente activos en dichos pacientes resulta en un aumento de la presión arterial (Seaberg y col., 2005; Palacios y col., 2006). En base a esta evidencia es posible proponer que componentes del sistema inmune participan directamente en el desarrollo de hipertensión y probablemente en la patogénesis de lesiones vasculares.

5.5. El sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona cumple un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis hídrica y de electrolitos en el organismo

El éxito de la vida en hábitats terrestres requiere la mantención de niveles hídricos y osmóticos adecuados para el desarrollo de diversos procesos fisiológicos. Como consecuencia, los organismos de vida terrestre están dotados de un sistema capaz de medir y regular el balance de agua y sales en la sangre, el cual está constituido por los riñones y el sistema renina-angiotensina-aldosterona (Harris, 1983). En condiciones de bajo volumen intravascular o de baja concentración de sodio en la sangre, las células yuxtaglomerulares del riñón responden sintetizando y liberando renina. Una vez en la sangre, esta enzima cataliza la hidrólisis de angiotensinógeno, el cual es sintetizado en el hígado, produciéndose de esta manera el intermediario inerte angiotensina I que posteriormente es convertido en el componente activo del sistema, angiotensina II, por la enzima convertidora de angiotensina (Muller, 1987). Este componente, además de aumentar la sensación de sed y de promover vasoconstricción, promueve la secreción de la hormona mineralocorticoide aldosterona por parte de la corteza de la médula adrenal. Esta hormona ejerce su acción mediante el receptor de mineralocorticoides (MR), en

células del túbulo contorneado distal del riñón. La unión de aldosterona con su receptor en el citoplasma induce la translocación del MR al núcleo, el cual une elementos de respuesta a hormonas en el DNA y promueve la reabsorción de Na^+ hacia la sangre. En particular, este efecto se debe al aumento en la expresión tanto del canal de sodio epitelial (ENaC) presente en la cara luminal, como de la Na^+/K^+ -ATPasa presente en la membrana basolateral del epitelio, lo que resulta en la reabsorción de Na^+ y agua y la excreción de K^+ y H^+ en la orina (Zaman y col., 2002; Hu y Funder, 2006).

Debido al papel clave que cumple aldosterona en la regulación del volumen vascular, la producción crónica de elevados niveles de esta hormona o hiperaldosteronismo, tiene como resultado el desarrollo de hipertensión. Por este motivo, el desbalance en la secreción de aldosterona se considera un factor de riesgo cardiovascular, ya que el corazón responde al aumento en la presión arterial desarrollando hipertrofia ventricular, condición relacionada a la ocurrencia de infarto. Históricamente, la prevalencia de

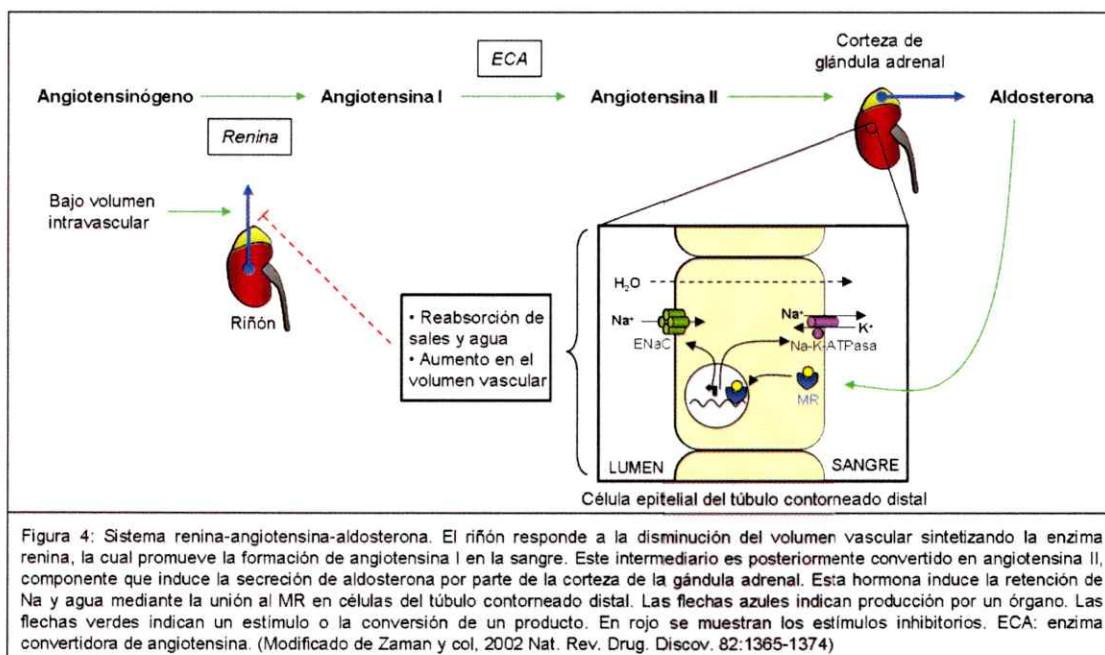


Figura 4: Sistema renina-angiotensina-aldosterona. El riñón responde a la disminución del volumen vascular sintetizando la enzima renina, la cual promueve la formación de angiotensina I en la sangre. Este intermediario es posteriormente convertido en angiotensina II, componente que induce la secreción de aldosterona por parte de la corteza de la glándula adrenal. Esta hormona induce la retención de Na^+ y agua mediante la unión al MR en células del túbulo contorneado distal. Las flechas azules indican producción por un órgano. Las flechas verdes indican un estímulo o la conversión de un producto. En rojo se muestran los estímulos inhibitorios. ECA: enzima convertidora de angiotensina. (Modificado de Zaman y col, 2002 Nat. Rev. Drug. Discov. 82:1365-1374)

hiperaldosteronismo en pacientes hipertensos ha sido considerada menor, sin embargo estudios recientes indican que cerca del 10 % de los casos de hipertensión diagnosticados se deben a elevados niveles de aldosterona plasmática (Mosso y col., 2003).

5.6. Rol alternativo de aldosterona en la patogénesis del daño vascular

Durante un extenso período de tiempo se aceptó el mecanismo clásico de inducción de hipertensión mediado por aldosterona descrito anteriormente, sin embargo, en las últimas dos décadas ha surgido evidencia que sugiere un efecto independiente de factores hemodinámicos. Los primeros estudios reportaron el desarrollo de fibrosis vascular independiente de la evolución de hipertrofia en modelos de hipertensión en ratas (Weber y Brilla, 1991). Adicionalmente, se determinó que utilizando dosis de agentes bloqueantes del MR incapaces de normalizar los niveles de presión arterial, se logra una inhibición completa del desarrollo de fibrosis inducida por aldosterona (Brilla y col., 1993). Estos hallazgos fueron apoyados por el descubrimiento de que además del riñón, órganos como el corazón, el cerebro y los vasos sanguíneos expresan el MR y por tanto son capaces de responder a aldosterona (Bonvalet y col., 1995; Takeda y col., 1997). Estudios posteriores han sugerido que aldosterona tiene un rol proinflamatorio, debido a la capacidad de inducir estrés oxidativo y la expresión de marcadores inflamatorios, como fibrinógeno y el inhibidor del activador de plasminógeno-1, por parte del tejido vascular, además de promover el infiltrado de leucocitos mononucleares en el espacio perivascular (Rocha y col., 2002; Brown, 2008). Recientemente se ha demostrado que el infiltrado vascular incluye células presentadoras de antígenos, a lo

que se suma evidencia reciente que demuestra el requerimiento de linfocitos T para el desarrollo de hipertensión inducida por angiotensina II, un inductor de la secreción de aldosterona (Williams y Williams, 2003; Guzik y col., 2007). Aún cuando la activación de células inmunes durante el desarrollo de hiperaldosteronismo ha sido documentada (Ahokas y col., 2005), la capacidad de aldosterona de modular componentes del sistema inmune no ha sido directamente evaluada.

De acuerdo a los antecedentes expuestos, considerando la importante función que cumplen las DCs en la iniciación y regulación de respuestas inmunes y que se ha reportado que las respuestas inmunes están involucradas en el desarrollo de hipertensión y lesiones vasculares, en este proyecto evaluamos la modulación de la interacción entre DCs y linfocitos T por aldosterona, así como también estudiamos la capacidad de elevados niveles de esta hormona de potenciar la progresión de una enfermedad autoinmune en un modelo murino.

6. HIPÓTESIS

Debido al carácter proinflamatorio de la hormona mineralocorticoide aldosterona y su participación en el desarrollo de hipertensión y daño cardíaco es posible proponer la siguiente hipótesis:

Elevados niveles de aldosterona potencian la iniciación de la respuesta inmune adquirida, estableciendo un fenotipo inflamatorio que contribuye al desarrollo de autoinmunidad.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad inmunomoduladora de aldosterona en el contexto de la interacción entre DCs y linfocitos T y el desarrollo de una enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T.

7.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de aldosterona sobre la activación de linfocitos T mediada por DCs *in vitro*.

- Evaluar la capacidad de aldosterona de alterar la función tanto de linfocitos T como de DCs *in vitro*.
- Determinar la capacidad de aldosterona de modular la progresión de un modelo de enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T *in vivo*.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Animales

En este trabajo se utilizaron ratones de entre seis y ocho semanas de edad tanto wild type como transgénicos OT-I y OT-II, todos en un background C57BL/6. Los ratones transgénicos OT-I y OT-II expresan TCR específicos que reconocen péptidos derivados de ovalbúmina (OVA) cargados en moléculas de MHC-I o MHC-II, respectivamente. Todos los animales fueron mantenidos y manipulados de acuerdo a normativas institucionales en las instalaciones libres de patógenos específicos de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

8.2. Reactivos y péptidos

Las soluciones madre de aldosterona y espironolactona fueron preparadas en etanol 100 % a 10 mM y 5 mM, respectivamente. Las soluciones de trabajo fueron preparadas en medio RPMI completo inmediatamente antes de cada experimento. El antagonista espironolactona fue agregado a los cultivos 10 minutos antes del tratamiento con aldosterona a una concentración final de 5 μ M, con el fin de inhibir la actividad del receptor de mineralocorticoides. La concentración final de aldosterona agregada a los cultivos fue de 100 nM. Para controlar el efecto del solvente en los diferentes ensayos se incluyó el tratamiento con etanol (vehículo). El péptido derivado de la glicoproteína de la mielina del oligodendrocito (MOG₃₅₋₅₅, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) fue mantenido a una concentración de 5 mg/ml y las soluciones de trabajo fueron preparadas en PBS 1X inmediatamente antes de ser utilizadas.

8.3. Obtención de DCs a partir de precursores de médula ósea de ratón.

Las DCs utilizadas en este trabajo fueron obtenidas mediante la diferenciación de células progenitoras de médula ósea de ratón. Para la obtención de células progenitoras, las tibias y fémures de ratones C57BL/6 fueron removidas en condiciones estériles, cortadas por los extremos y profundidas con PBS 1X para extraer la médula ósea de su interior, siendo posteriormente homogenizada con jeringa de 25 G. Esta suspensión celular fue centrifugada a 1200 rpm por 8 minutos, luego resuspendida en solución de lisis de glóbulos rojos (ACK) en una razón 50 % vol/vol y mezclada por inversión 30 veces. Posteriormente, la preparación fue centrifugada a 1200 rpm por 8 min y las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X. Luego del último lavado, las células fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 suplementado (FBS 5 %, penicilina/estreptomicina, aminoácidos no esenciales, glutamina, HEPES, Piruvato de sodio, β -mercaptoetanol) suplementado con GM-CSF (50 U/ml) y contadas en hematocitómetro. Se sembraron 1×10^6 células/pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos y se incubaron en una estufa de cultivo celular a 37°C con atmósfera 5 % CO₂ y 100 % humedad. Cada dos días el medio de cultivo fue renovado por medio fresco suplementado con GM-CSF. Con el objeto de evaluar la diferenciación de precursores de médula ósea se determinó la expresión de CD11c, un marcador de DCs, en la superficie de las células al día 5 de cultivo mediante citometría de flujo. De este modo, una población mayoritaria de DCs fue utilizada para la realización de ensayos subsecuentes.

8.4. Obtención de linfocitos T desde ganglios linfáticos de ratones transgénicos.

Para realizar ensayos de presentación de antígenos *in vitro*, se obtuvieron suspensiones celulares desde ganglios de ratones transgénicos OT-I y OT-II. Para esto fueron removidos en condiciones estériles los ganglios linfáticos cervicales, axilares, mesentéricos, braquiales e inguinales. Estos fueron homogeneizados con los extremos esmerilados de dos portaobjetos en 5 ml de PBS 1X. Esta suspensión fue traspasada a un tubo de 15 ml y se dejó decantando por 5 minutos, para eliminar el tejido no disgregado. Luego, se traspasó el sobrenadante a otro tubo y se agregó 5 ml de solución de lisis de glóbulos rojos (ACK). Esta mezcla fue incubada por 1 minuto y luego centrifugada a 1200 rpm por 8 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet de células se lavó dos veces con PBS 1X. Finalmente las células fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 suplementado. El porcentaje de linfocitos T transgénicos fue determinado por citometría de flujo mediante tinción con los anticuerpos monoclonales anti-V α 2-FITC, anti-V β 5-PE y anti-CD8-APC (para linfocitos OT-I) o anti-CD4-APC (para linfocitos OT-II).

8.5. Co-cultivo de DCs con linfocitos T transgénicos en presencia de aldosterona.

Al día 5 de cultivo, DCs derivadas de médula ósea fueron tratadas con vehículo, aldosterona 100 nM o espironolactona 5 μ M previo al tratamiento con aldosterona, e inmediatamente pulsadas con proteína OVA a diferentes concentraciones. Después de 24 horas de incubación, las DCs fueron transferidas a medio fresco y la viabilidad fue

evaluada mediante exclusión del colorante azul de tripán. A continuación, estas DCs fueron sembradas en diluciones seriadas de ½ en placas de 96 pocillos y co-cultivadas, en presencia de vehículo, aldosterona o aldosterona más espironolactona, con células provenientes de ganglios de ratones OT-I u OT-II. Para la determinación de parámetros de activación de linfocitos T se mantuvo este cultivo por 20 horas en una estufa de cultivo celular, para luego evaluar la secreción de IL-2 mediante ELISA y la expresión del marcador temprano de activación CD69 por parte de la población linfocitaria, mediante citometría de flujo. Para evaluar la polarización de linfocitos T CD4⁺, se determinó la presencia de IL-17 en el sobrenadante de co-cultivos de 36 horas mediante ELISA de captura.

8.6. Ensayo de activación de linfocitos T con anticuerpo anti-CD3ε adherido a placa.

La activación de linfocitos T independiente de células presentadoras de antígenos se llevó a cabo mediante la estimulación de la molécula CD3ε. Para esto, placas de 96 pocillos fueron incubadas, en condiciones estériles, con diferentes cantidades de un anticuerpo monoclonal que reconoce CD3ε, diluido en PBS 1X por 12 horas a 4 °C. Luego de bloquear con PBS-BSA 1 % por 2 horas a temperatura ambiente y lavar con PBS 1X, 10⁵ células de suspensión de ganglio de ratón OT-I fueron agregadas por pocillo y tratadas con vehículo, aldosterona 100 nM o espironolactona 5 μM previo al tratamiento con aldosterona. Luego de 20 horas de incubación, la secreción de IL-2 al medio de cultivo y la expresión de CD69 por parte de los linfocitos T fue evaluada mediante ELISA y citometría de flujo, respectivamente.

8.7. Expresión de moléculas coestimuladoras y secreción de citoquinas por DCs en respuesta a aldosterona.

Al día 5 de cultivo las DCs fueron tratadas ya sea con vehículo, aldosterona 100 nM o espironolactona 5 μ M previo al tratamiento con aldosterona, durante 24 horas. Al cabo de este tiempo las células fueron resuspendidas en PBS 1X y teñidas con anticuerpos monoclonales anti-CD11c-APC y anti-CD80-FITC, anti-CD86-FITC, anti-PDL1-PE y anti-PDL2-PE. Luego de 30 minutos de incubación, las células fueron fijadas en paraformaldehído 1% y la expresión de moléculas coestimuladoras por parte de las DCs fue evaluada mediante citometría de flujo. La secreción de IL-6, IL-10, IL-12 y TGF- β fue analizada en los sobrenadantes de las DCs mediante ELISA de captura.

8.8. Cuantificación de citoquinas mediante ELISA de captura

La determinación de la concentración de citoquinas presentes en los sobrenadantes de los cultivos se realizó mediante ELISA de captura. Para esto, placas de 96 pocillos fueron activadas con 50 μ l/pocillo de anticuerpo monoclonal de captura diluido 1/350 en PBS 1X por 12 horas a 4 °C. Posteriormente, los pocillos fueron bloqueados con PBS-BSA 1 % por 2 horas a temperatura ambiente. Luego de lavar los pocillos dos veces con 200 μ l de PBS-Tween 20 0.02 % y una vez con 200 μ l de PBS 1X, se agregó 150 μ l del sobrenadante de cultivo a cada pocillo y se incubó la placa por 12 horas a 4 °C. Luego, los pocillos fueron lavados como se indicó anteriormente, para luego agregar 50 μ l/pocillo de una dilución 1/750 del anticuerpo monoclonal de detección conjugado a biotina en PBS-BSA 1 % e incubar por 2 horas a temperatura

ambiente. Después de lavar como se indica más arriba, se incubó con 50 μ l/pocillo de una solución 1/1000 de estreptavidina-HRP en PBS-BSA 1 % por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavar nuevamente, se inició la reacción agregando el sustrato TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina). Luego de 10 minutos a temperatura ambiente, se detuvo la reacción con 50 μ l/pocillo de H₂SO₄ 2 N y el desarrollo de color fue cuantificado en un lector para placas de ELISA a una absorbancia de 450 nm.

8.9. Detección de la fosforilación de MAPKs en DCs

DCs fueron tratadas ya sea con vehículo, aldosterona 100 nM o espironolactona 5 μ M previo al tratamiento con aldosterona, por 10 minutos. Como control positivo se incluyó la estimulación con LPS 1 μ g/ml (Sigma). A continuación, las células fueron fijadas en formaldehído 2% a 37°C por 10 minutos y luego permeabilizadas en metanol 90% a -20°C por 3 horas. Posteriormente, las DCs fueron lavadas tres veces y resuspendidas en solución de bloqueo (PBS-FBS 2%-0.05% NaN₃). Cada muestra fue separada en tres alícuotas iguales, las cuales fueron teñidas con anticuerpos monoclonales anti-difosfo-ERK 1/2-AlexaFluor488, anti-difosfo-p38-AlexaFluor488 o anti-difosfo-JNK1 no conjugado. Adicionalmente, todas las muestras fueron teñidas con un anticuerpo anti-CD11c-PE mediante la incubación a 4°C por 1 hora. Luego, las células fueron lavadas dos veces y resuspendidas en solución de bloqueo. Aquellas muestras que fueron teñidas con el anticuerpo anti-difosfo-JNK1 no conjugado fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra-FITC a 4°C por 1 hora. Algunas muestras fueron teñidas con anticuerpo anti-IgG de cabra-FITC en ausencia del

anticuerpo anti-difosfo-JNK1 para controlar la unión inespecífica del anticuerpo secundario. Finalmente, las células fueron lavadas dos veces y resuspendidas en solución de bloqueo, para luego analizar la fluorescencia para difosfo-ERK1/2, difosfo-p38 y difosfo-JNK1 en la población CD11c⁺ mediante citometría de flujo.

8.10. Análisis de formación de sinapsis inmunológica mediante microscopía confocal

La formación de sinapsis inmunológica entre DCs y linfocitos T fue evaluada de acuerdo a lo descrito previamente (Esquerre y col., 2008; González y col., 2008). En resumen, las DCs fueron tratadas ya sea con vehículo, aldosterona 100 nM o espironolactona 5 μ M previo al tratamiento con aldosterona, e inmediatamente pulsadas con proteína OVA 50 μ g/ml. Luego de 24 horas, las DCs fueron teñidas con CMTMR-Orange 0,5 μ M (Molecular Probes, Invitrogen) en medio RPMI 1640 suplementado a 37°C por 15 minutos y lavadas dos veces. En paralelo, linfocitos T CD8⁺ purificados fueron teñidos con BODIPY FL C₅-Ceramida 1 μ M por 30 minutos a 37°C (Molecular Probes, Invitrogen). A continuación, las DCs y los linfocitos T teñidos fueron mezclados en microcámaras (Lab-Tek Chamber coverglass, Nalge Nunc) previamente cubiertas con poli-D-lisina (Sigma). Luego de dos horas de cocultivo, la fluorescencia fue registrada mediante microscopía confocal (FluoView FV1000, Olympus). Para evaluar la formación de sinapsis inmunológica entre linfocitos T y DCs, al menos 50 campos por tratamiento fueron elegidos al azar para determinar visualmente, del total de conjugados entre linfocitos T y DCs, la fracción de linfocitos T que exhiben polarización del aparato

de Golgi hacia la zona de contacto con las DCs. Un mínimo de 500 conjugados por tratamiento fueron analizados en tres experimentos independientes.

8.11. Análisis de expresión del MR mediante western blot

Los extractos de proteínas de riñón o DCs derivadas de médula ósea fueron obtenidos utilizando solución de lisis Totex (HEPES 20 mM, NaCl 350 mM, glicerol 20%, Nonidet P-40 1%, MgCl₂ 1 mM, EDTA 0.5 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.1%, aprotinin 0.1%). Las proteínas fueron denaturadas a 95 °C por 10 minutos, para luego cargar 25 µg de proteína en geles de SDS-poliacrilamida al 12% y posteriormente transferir a una membrana de nitrocelulosa. Dichas membranas fueron bloqueadas durante toda la noche en PBS-Tween-20 0.2%-Leche descremada 10% a 4°C, para luego lavar dos veces con PBS-Tween 20 0.2% e incubar con una dilución 1:500 de un anticuerpo policlonal de ratón contra el péptido METKGYHSLPEGLDMERR derivado del MR durante 3 horas (Gomez-Sanchez y col., 2006). Posteriormente, las membranas fueron lavadas e incubadas con una dilución 1:2000 de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a HRP durante 2 horas, para luego lavar y revelar utilizando la solución de peróxido Supersignal West Pico (Pierce Biotechnology).

8.12. Inducción de Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)

Hembras C57BL/6 de entre 6 y 8 semanas fueron inyectadas subcutáneamente en el flanco con 50 µg del péptido MOG₃₅₋₅₅ emulsionado en Adyuvante Completo de Freund's (Invitrogen) suplementado con *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra inactivada por calor (Difco Laboratories), como fue descrito anteriormente (Iruetagoiena y col.,

2005; Iruretagoyena y col., 2006). Adicionalmente, los animales recibieron inyecciones intraperitoneales de 500 ng de toxina Pertussis (Calbiochem) diluida en PBS al momento de la inmunización y 48 horas más tarde. Los signos clínicos de enfermedad fueron observados normalmente entre 15 y 18 días después de la sensibilización y fueron registrados diariamente de acuerdo al siguiente criterio de puntaje: 0, signos de enfermedad no detectables; 1, flacidez en la cola; 2, debilidad en extremidades posteriores o andar anormal; 3, parálisis completa de extremidades posteriores; 4, parálisis de extremidades anteriores y posteriores; y 5, agonía o muerte. Para prevenir sufrimiento innecesario, aquellos animales severamente afectados por la enfermedad fueron eutanasiados con la supervisión de un veterinario.

8.13. Tratamiento con desoxicortecosterona acetato y espironolactona

Para evaluar el efecto de aldosterona sobre la respuesta anti-mielina que causa EAE se utilizó el agonista del MR, desoxicorticosterona acetato (DOCA), el cual se caracteriza por presentar una mayor vida media en plasma comparado con aldosterona (Vallee y col., 1995). Ratones inducidos a desarrollar EAE fueron inyectados subcutáneamente dos veces a la semana ya sea con DOCA (0.75 mg/kg de peso corporal) diluido en aceite de oliva (volumen total 100 µl) o solo vehículo. Todos los tratamientos se iniciaron dos días después de la inmunización con MOG y continuaron a lo largo de todo el experimento. Todos los grupos fueron alimentados con dieta de roedor estándar (3 g/día, Rodent purified diet, Dyets Inc.). El grupo de animales tratados con espironolactona recibieron estos pellets suplementados con 1.8 mg de espironolactona por ratón por día. La progresión de enfermedad fue evaluada en los diferentes grupos de

ratones de acuerdo a lo descrito anteriormente. Las dosis de DOCA utilizadas fueron bien toleradas por los ratones y no se observó un incremento significativo en la presión sanguínea, según se determinó mediante un método no invasivo en animales conscientes.

8.14. Detección de respuesta de anticuerpos anti-MOG

Veintiún días después de la inmunización con péptido MOG₃₅₋₅₅ se obtuvieron muestras de suero de ratones de los diferentes grupos para analizar la presencia de IgG específicas para MOG mediante ELISA, como fue descrito anteriormente (Iruetagoiena y col., 2008). Para esto, placas de ELISA fueron activadas con 50 μ l de péptido MOG₃₅₋₅₅ 10 μ g/ml diluido en PBS pH 7.2 durante toda la noche a 4 ° C para luego bloquear con PBS-BSA 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras de suero fueron diluidas de manera seriada en PBS-BSA 1% partiendo de una dilución 1:100 e incubadas por 3 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos tipo IgG fueron detectados utilizando un anticuerpo anti-IgG de ratón generado en conejo conjugado con HRP (GE Healthcare) durante una hora a temperatura ambiente. Luego de lavar, se agregó el sustrato 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (Sigma), y la absorbancia fue evaluada en un lector de placas a 450 nm.

8.15. Determinación de la respuesta de linfocitos T específicos para MOG

Veintiún días después de la inducción de EAE se obtuvieron suspensiones celulares de nodos linfáticos mesentéricos e inguinales de animales tratados o control, para luego ser incubadas (5×10^5 células/pocillo) en medio RPMI 1640 suplementado en presencia de concentraciones crecientes del péptido MOG₃₅₋₅₅. Después de 72 horas de

incubación a 37°C se determinó la liberación de IL-2, IFN- γ e IL-17 en respuesta al péptido MOG₃₅₋₅₅ mediante ELISA, de acuerdo a lo descrito previamente (Iruretagoyena y col., 2006; Iruretagoyena y col., 2008).

9. RESULTADOS

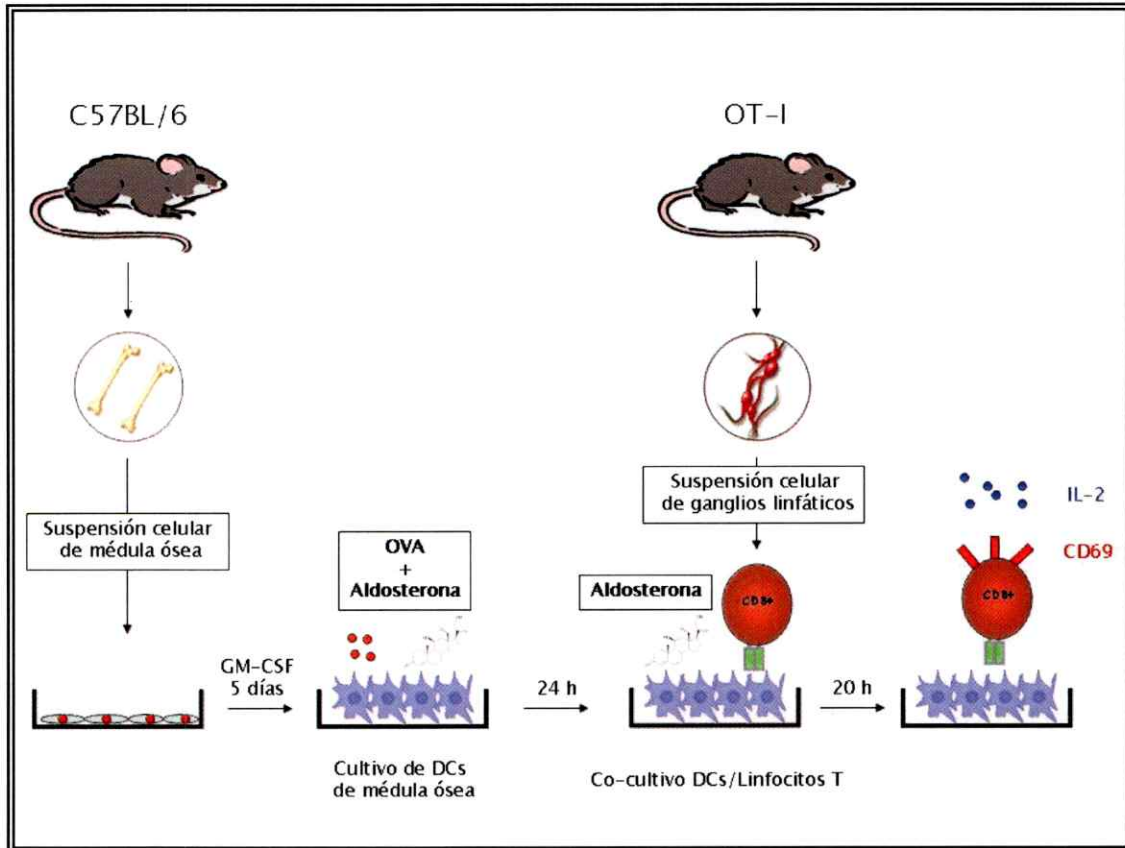
9.1. Aldosterona potencia la activación de linfocitos T CD8⁺ por DCs

Con el objeto de evaluar la capacidad de aldosterona de modular la iniciación de la respuesta inmune adquirida *in vitro*, DCs derivadas de precursores de médula ósea de ratón fueron pulsadas con proteína OVA y tratadas con vehículo o aldosterona durante 24 horas, para posteriormente incubar con linfocitos T OVA-específicos, también en presencia de dicha hormona. Como se muestra en la figura 5, luego de 20 horas de co-cultivo se evaluaron parámetros de activación de linfocitos T, como la expresión del marcador temprano de activación CD69, mediante citometría de flujo, y la secreción de IL-2 al sobrenadante, por medio de ELISA. Como primera aproximación, DCs pulsadas con una concentración saturante de OVA (50 µg/ml) fueron incubadas con diferentes concentraciones de aldosterona y luego co-cultivadas con linfocitos T CD8⁺ también en presencia de diferentes concentraciones de aldosterona, obteniéndose una correlación positiva entre ambos marcadores de activación y concentraciones crecientes de aldosterona (Figura 6A). En base a este resultado se seleccionó la concentración de aldosterona 10⁻⁷ M (100 nM) como la concentración a utilizar en los subsecuentes ensayos *in vitro*, por tratarse de la concentración de hormona que produce una mayor potenciación en la activación de linfocitos T mediada por DCs. A continuación se evaluó mediante el mismo sistema la activación de linfocitos T por DCs tratadas con aldosterona (100 nM) y pulsadas con diferentes concentraciones de OVA. En este caso es posible observar que aldosterona potencia la activación de linfocitos T CD8⁺ por DCs en todo el rango de concentraciones de antígeno utilizado, en comparación a aquellos cultivos realizados en presencia sólo de vehículo (Figura 6B).

Para determinar si este fenómeno de potenciación de la activación de linfocitos T por aldosterona es mediado por el receptor intracelular de mineralocorticoides (MR), tanto las DCs como los linfocitos T fueron incubados con el antagonista espironolactona, antes del tratamiento con aldosterona. Este compuesto corresponde a un inhibidor de los efectos de aldosterona debido a la capacidad de competir por la unión al MR (Rogerson y col., 2003; Rogerson y col., 2004). Los resultados obtenidos muestran que tanto la secreción de IL-2 como la expresión de CD69 en linfocitos T CD8⁺ caen a niveles basales cuando se incuba previamente con espironolactona (Figura 6B), lo que sugiere que el aumento en la activación de linfocitos T CD8⁺ inducido por aldosterona requiere de la señalización a través del MR.

Figura 5

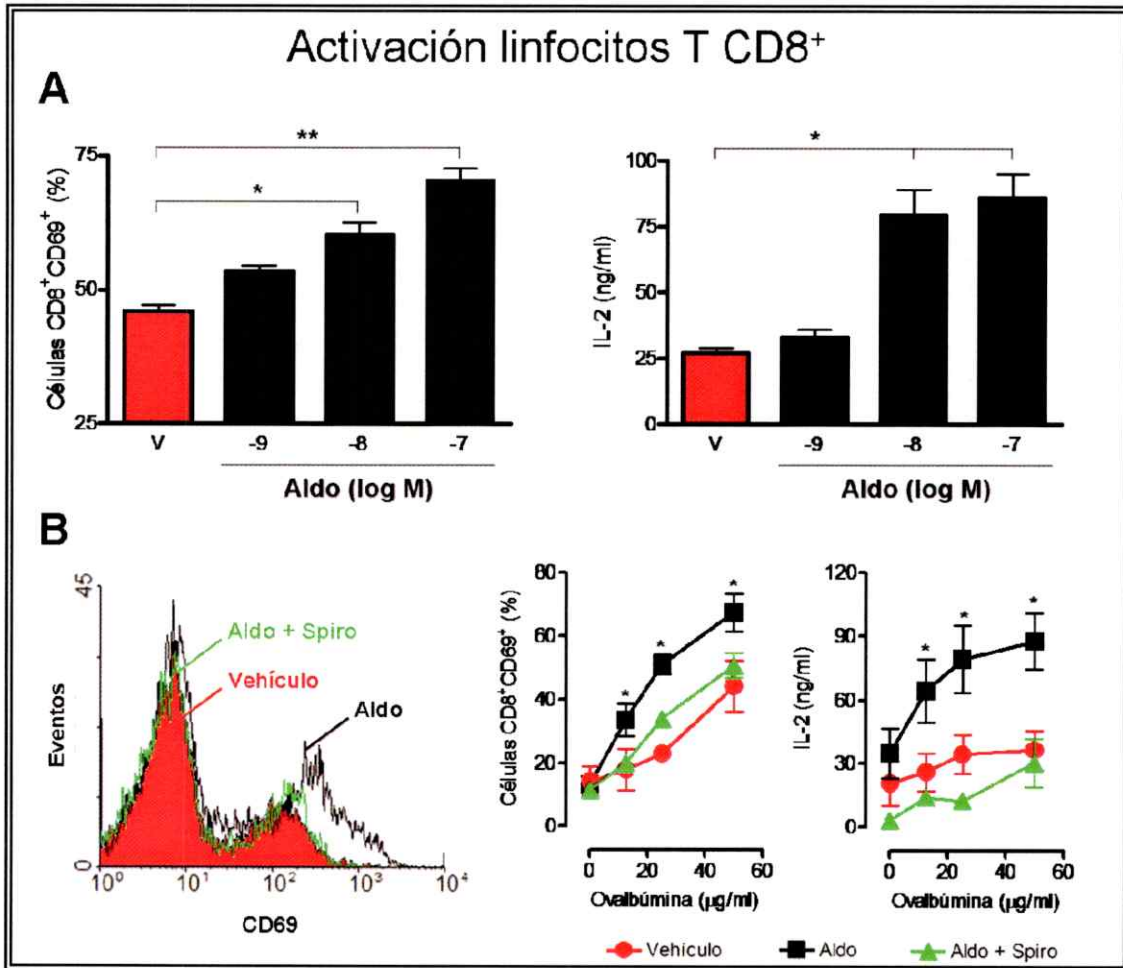
Sistema experimental para evaluar la activación de linfocitos T por DCs *in vitro*



Las DCs fueron diferenciadas de progenitores de médula ósea de ratones C57BL/6 y luego de 5 días fueron pulsadas con OVA y tratadas con Aldosterona por 24 horas. Luego fueron co-cultivadas con linfocitos T CD8⁺ provenientes de ganglios linfáticos de ratones transgénicos OT-I en presencia de aldosterona. Después de 20 horas, la activación de dichos linfocitos fue evaluada de acuerdo a la secreción de IL-2 y la expresión del marcador de superficie CD69.

Figura 6

Aldosterona potencia la activación de linfocitos T CD8⁺ por DCs



(A) DCs pulsadas con OVA (50 µg/ml) fueron tratadas ya sea con vehículo (V, barras blancas) o diferentes concentraciones de aldosterona (barras negras, se muestran como el logaritmo de la molaridad) durante 24 hrs, para luego ser co-cultivadas con linfocitos T CD8⁺ OT-I, también en presencia de diferentes concentraciones de aldosterona. La activación de linfocitos T fue evaluada mediante la expresión de CD69 (izquierda) y la secreción de IL-2 (derecha).

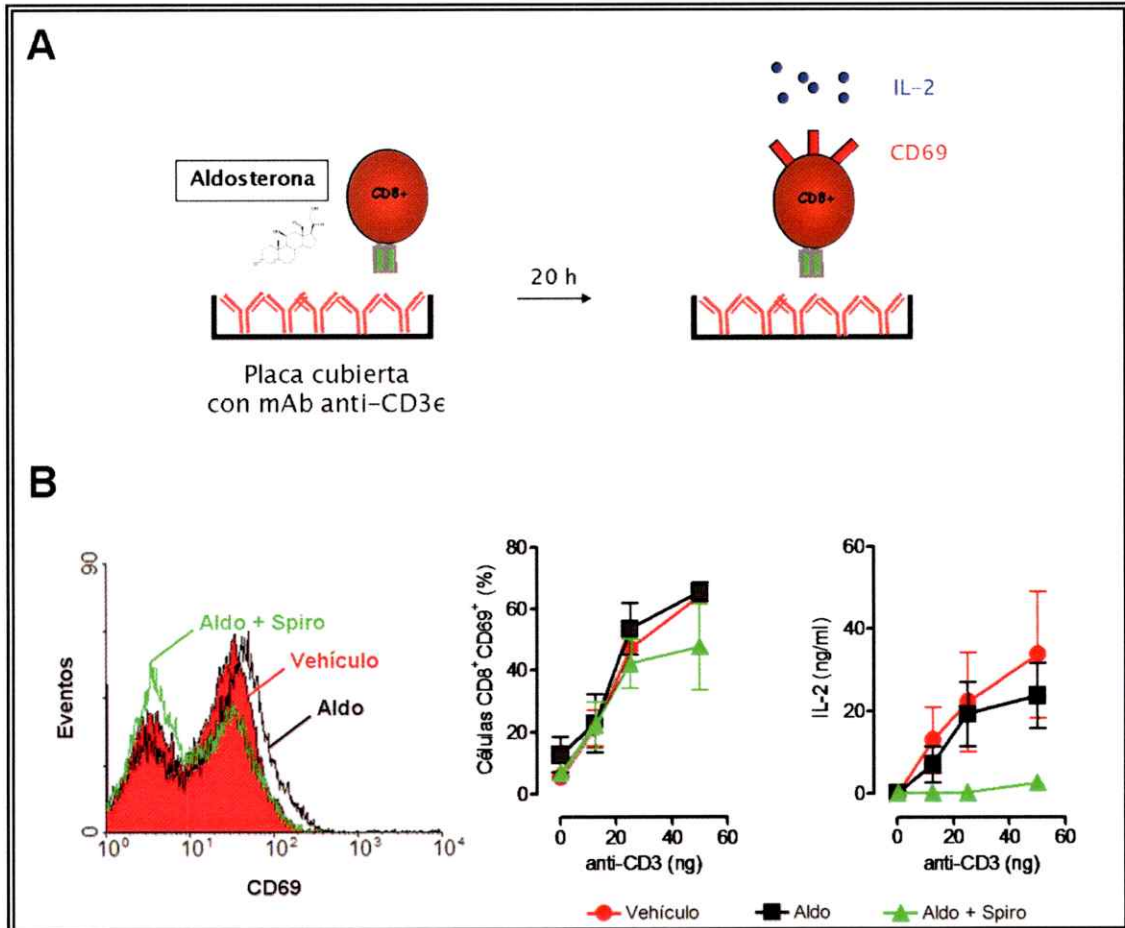
(B) DCs pulsadas con diferentes concentraciones de OVA fueron tratadas con vehículo (negro), aldosterona 100 nM (gris), o bien con espirolactona 5 µM previo al tratamiento con aldosterona (blanco), durante 24 hrs. Al cabo de este tiempo fueron co-cultivadas con linfocitos T CD8⁺ OT-I en estas mismas condiciones, para luego evaluar parámetros de activación. Histogramas representativos de la expresión de CD69 en la población CD8⁺ co-cultivada con DCs pulsadas con OVA 50 µg/ml (izquierda). Expresión de CD69 (medio) y secreción de IL-2 (derecha) por linfocitos T en respuesta a DCs pulsadas con diferentes concentraciones de OVA. Los gráficos muestran los promedios ± SD de tres experimentos independientes. Aldosterona vs vehículo: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, ANOVA de una vía.

9.2. La activación de linfocitos T no es afectada de manera directa por aldosterona

Debido a que en los resultados descritos anteriormente tanto las DCs como los linfocitos T fueron incubados en presencia de aldosterona, decidimos evaluar si el efecto observado se debe a la modulación directa de uno u otro tipo celular. Para esto, en primer lugar estudiamos si aldosterona es capaz de potenciar la activación de linfocitos T CD8⁺ en ausencia de células presentadoras de antígenos. Como se muestra en la figura 7A, la activación de linfocitos T independiente de APCs fue evaluada mediante el entrecruzamiento de la molécula CD3ε con anticuerpos específicos adheridos a placa, un estímulo equivalente a la estimulación antigénica del TCR. En conjunto con dicha estimulación, los linfocitos T fueron tratados con vehículo, aldosterona, o bien con espinolactona previo al tratamiento con aldosterona, para luego de 20 horas evaluar la secreción de IL-2 y la expresión de CD69 por la población linfocitaria. Los resultados obtenidos muestran que aldosterona no altera la activación de linfocitos T CD8⁺ inducida por la señalización a través de CD3ε, tanto medido por la expresión de CD69 como por la secreción de IL-2 (Figura 7B). Consistentemente, no se observó un efecto en la expresión del marcador CD69 producto del bloqueo del MR, obteniéndose niveles de activación muy similares a los observados en linfocitos T tratados con vehículo. Sin embargo, la secreción de IL-2 por parte de linfocitos T estimulados con anticuerpos anti-CD3ε fue suprimida prácticamente por completo en respuesta al tratamiento con espinolactona (Figura 7B). Estos resultados sugieren que aldosterona no afecta de manera directa la activación de linfocitos T, lo que, en conjunto con los resultados descritos anteriormente, permite proponer que la potenciación de la activación de linfocitos T CD8⁺ inducida por aldosterona es mediada por DCs.

Figura 7

Aldosterona no afecta directamente la activación de linfocitos T CD8⁺



(A) Sistema experimental para evaluar la activación de linfocitos T de forma independiente de APCs. Linfocitos T CD8⁺ fueron incubados en placas cubiertas con anticuerpos anti-CD3ε y tratados durante 20 hrs, para luego evaluar la liberación de IL-2 al medio de cultivo y la expresión CD69 en la superficie celular.

(B) Linfocitos T CD8⁺ fueron incubados como se muestra en (A) y tratados con vehículo (rojo), aldosterona (100 nM, negro), o bien con espironolactona 5 μM previo al tratamiento con aldosterona (verde) durante 20 hrs. Histogramas representativos de la expresión de CD69 en la población de linfocitos CD8⁺ estimulados con 25 ng de anticuerpo anti-CD3ε adherido a placa (izquierda). Expresión de CD69 (medio) y secreción de IL-2 (derecha) por linfocitos T en respuesta diferentes cantidades de anticuerpo anti-CD3ε adherido por pocillo. Los gráficos muestran los promedios ± SD de tres experimentos independientes.

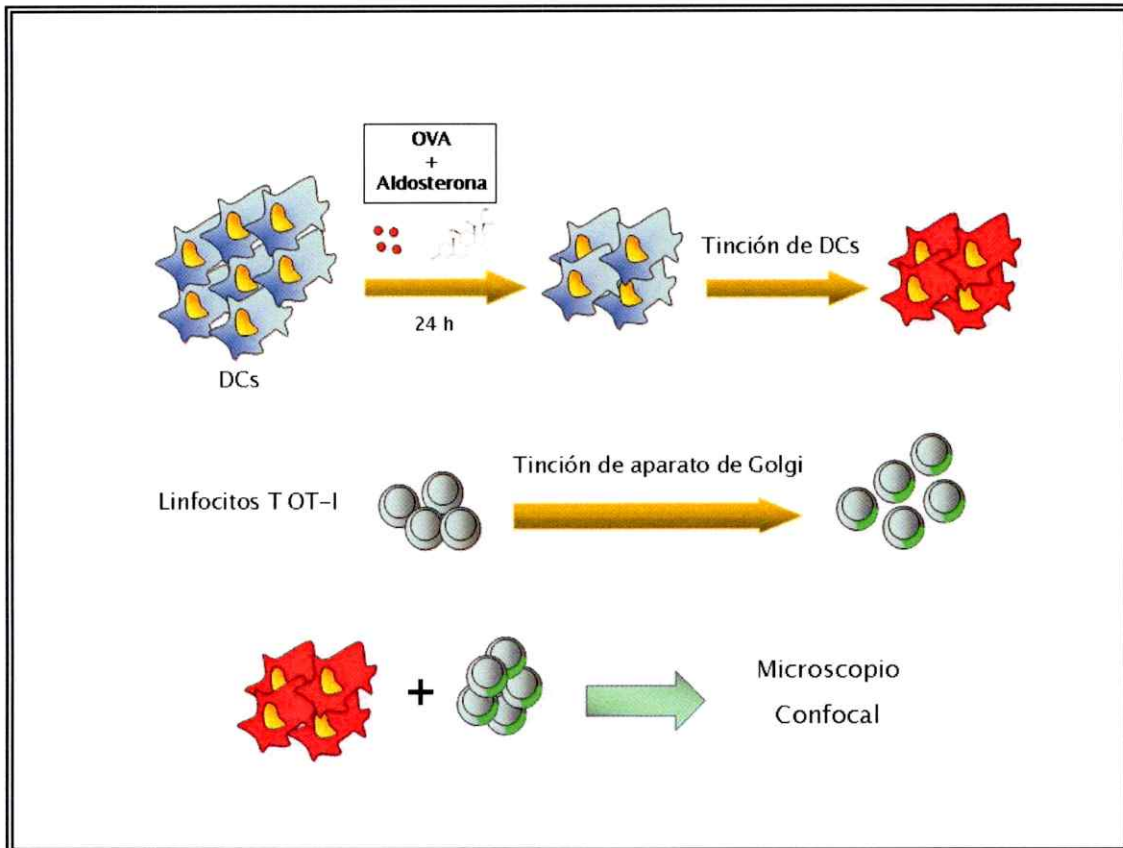
9.3. Aldosterona no altera la formación de sinapsis inmunológica entre DCs y linfocitos T

Dado que la potenciación de la activación de linfocitos T CD8⁺ inducida por aldosterona parece ser mediada por las DCs, decidimos analizar si este mineralocorticoide es capaz de modular la interacción entre DCs y linfocitos T. La activación de linfocitos T requiere la interacción de una serie de receptores que reconocen ligandos presentes en la superficie de las DCs y la formación de una estructura supramolecular denominada sinapsis inmunológica (Grakoui y col., 1999). Este proceso se caracteriza por la relocalización de la maquinaria secretoria del linfocito T hacia la superficie de la DC, por lo cual evaluamos si la mayor activación de linfocitos T inducida por aldosterona puede ser explicada por una mayor polarización hacia la zona de contacto con las DCs. Para esto, las DCs fueron pulsadas con OVA y tratadas con aldosterona durante 24 horas, para luego incubar con linfocitos T CD8⁺ OVA específicos previamente teñidos para evidenciar la ubicación del aparato de Golgi. Luego de dos horas de cultivo, la distribución del aparato de Golgi de los linfocitos T CD8⁺ en el sitio de contacto fue analizada mediante microscopía confocal (Figura 8). Tal como era esperado según lo expuesto anteriormente, mientras DCs no pulsadas no inducen una polarización significativa de linfocitos T, una fracción importante de los conjugados formados con DCs pulsadas con OVA presentan polarización del aparato de Golgi hacia el sitio de contacto (Figura 9A y B). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la polarización de linfocitos T CD8⁺ incubados con DCs pulsadas con OVA y tratadas con aldosterona al comprarlas con los cultivos de DCs pulsadas y tratadas con vehículo (Figura 9A y B).

Es importante hacer notar que el bloqueo del MR con espironolactona previo al tratamiento de las DCs con aldosterona induce una notable inhibición en la polarización de linfocitos T CD8⁺ hacia el sitio de contacto (Figura 9A y B). Estos datos sugieren que el aumento en la activación de linfocitos T CD8⁺ inducida por aldosterona no se debe a un incremento en la formación de sinapsis entre DCs y linfocitos T y que espironolactona tiene la capacidad por si sola de evitar la interacción entre estas células.

Figura 8

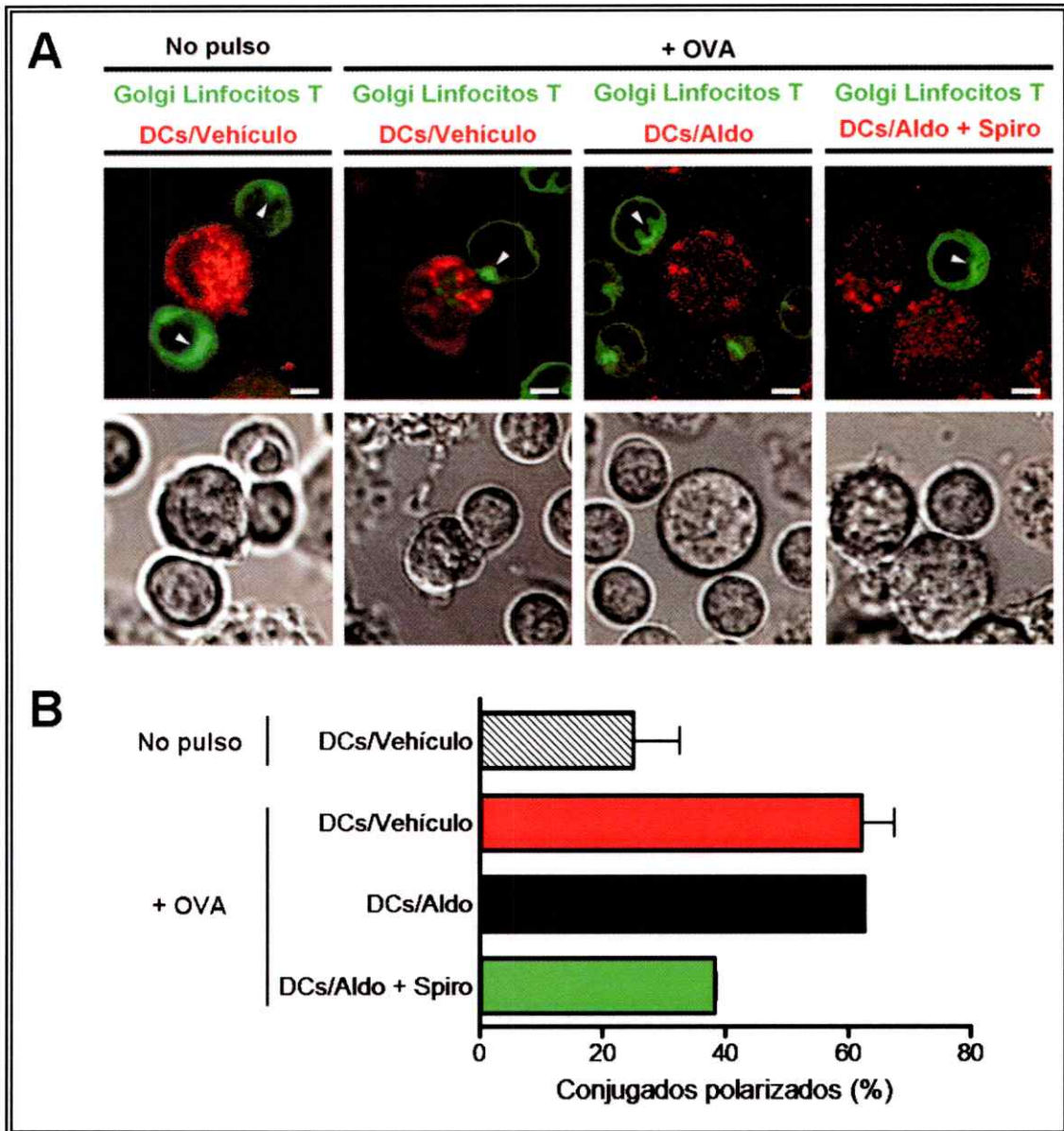
Sistema experimental para evaluar la formación de sinápsis inmunológica entre linfocitos T y DCs



DCs derivadas de médula de ósea fueron pulsadas con OVA y tratadas con aldosterona durante 24 hrs, para luego teñir con un colorante rojo. Además, linfocitos T $CD8^+$ OT-I fueron teñidos con un colorante verde que es retenido en el aparato de Golgi. Ambos tipos celulares fueron co-cultivados durante 2 hrs, para posteriormente analizar la distribución del aparato de Golgi en el sitio de contacto mediante microscopía confocal.

Figura 9

La formación de sinapsis inmunológica entre linfocitos T y DCs no es afectada por aldosterona



(A) DCs pulsadas con OVA fueron tratadas ya sea con vehículo, aldosterona 100 nM o espironolactona 5 μ M previo al tratamiento con aldosterona durante 24 hrs, para luego ser teñidas con CMTMR-Orange 0,5 μ M (rojo) y conjugadas con linfocitos T OT-I teñidos con BODIPY FL C5-Ceramida 1 μ M (verde) en proporción 1:1. DCs no

pulsadas y tratadas con vehículo fueron incluidas como control. Después de incubar por 2 hrs a 37°C, la polarización del aparato de Golgi hacia las DCs (flechas) fue registrada mediante microscopía confocal. Escala: 2 μ m.

(B) Análisis cuantitativo de la polarización de linfocitos T hacia DCs no pulsadas y tratadas con vehículo (achurado) o DCs pulsadas y tratadas con vehículo (rojo), aldosterona (negro) o espironolactona mas aldosterona (verde). La cuantificación se llevó a cabo mediante la examinación de campos aleatorios. Los valores representan los promedios \pm SD de tres experimentos independientes.

9.4. Aldosterona modula la expresión de PD-L1 y PD-L2 en DCs

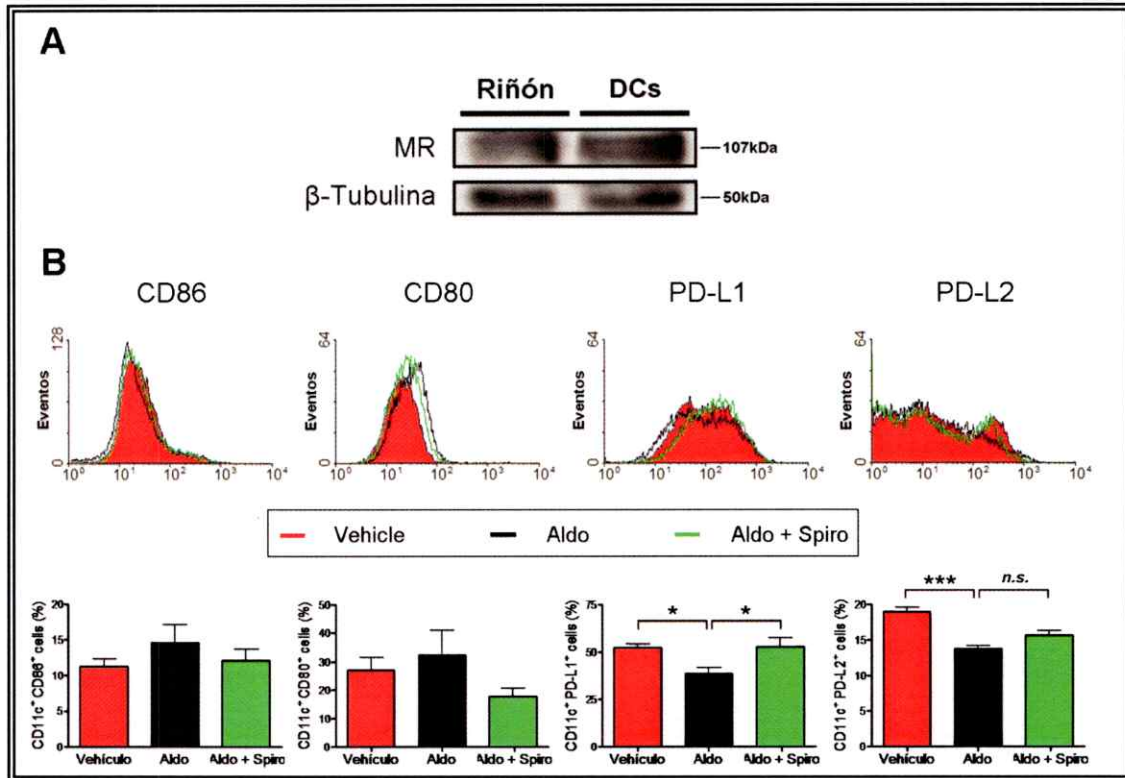
En vista de que DCs tratadas con aldosterona no aumentan la formación de sinápsis inmunológica con linfocitos T, pero si son capaces de potenciar la expresión de marcadores de activación en dichos linfocitos, evaluamos la capacidad de aldosterona de modular la función de las DCs.

Considerando que la potenciación inducida por aldosterona es dependiente de la señalización a través del MR, en primer lugar evaluamos la expresión de este receptor en DCs. Como se muestra en la figura 10A, DCs derivadas de médula ósea expresan el MR a nivel de proteína, según se detectó mediante western blot. Este resultado sugiere que aldosterona podría alterar la función de la DC mediante la unión y señalización a través del MR. A continuación evaluamos la capacidad de aldosterona de modificar las propiedades inmunogénicas de las DCs, mediante el análisis de la expresión de moléculas involucradas en la activación de linfocitos T en la superficie de las DCs. Para esto las DCs fueron incubadas en presencia de aldosterona durante 24 horas, para luego determinar la expresión de las moléculas CD80, CD86, PD-L1 y PD-L2 en la población CD11c⁺ mediante citometría de flujo. Aún cuando el tratamiento con esta hormona no afecta la expresión de las dos primeras moléculas coestimuladoras, se observó que aldosterona disminuye el porcentaje de DCs que presentan elevados niveles de los marcadores PD-L1 y PD-L2 (Figura 10B). Además, el bloqueo del MR en DCs solamente impide la disminución de la expresión de PD-L1 inducida por aldosterona, lo que sugiere que si bien esta hormona disminuye la expresión de ambas moléculas, solo el efecto sobre PD-L1 sería mediado por el MR (Figura 10B). Estos resultados muestran que aldosterona reduce la expresión de dos moléculas coestimuladoras en DCs, las

cuales están involucradas en la inhibición de la activación de linfocitos T en DCs, y por lo tanto sugieren un posible mecanismo mediante el cual esta hormona potencia la activación de linfocitos T CD8⁺ por DCs.

Figura 10

Aldosterona modula la expresión de PD-L1 y PD-L2 en DCs



(A) Detección de la expresión del MR en homogenizados de riñón (control positivo) y DCs derivadas de médula ósea mediante western blot. La detección de β -tubulina fue incluida como control de carga.

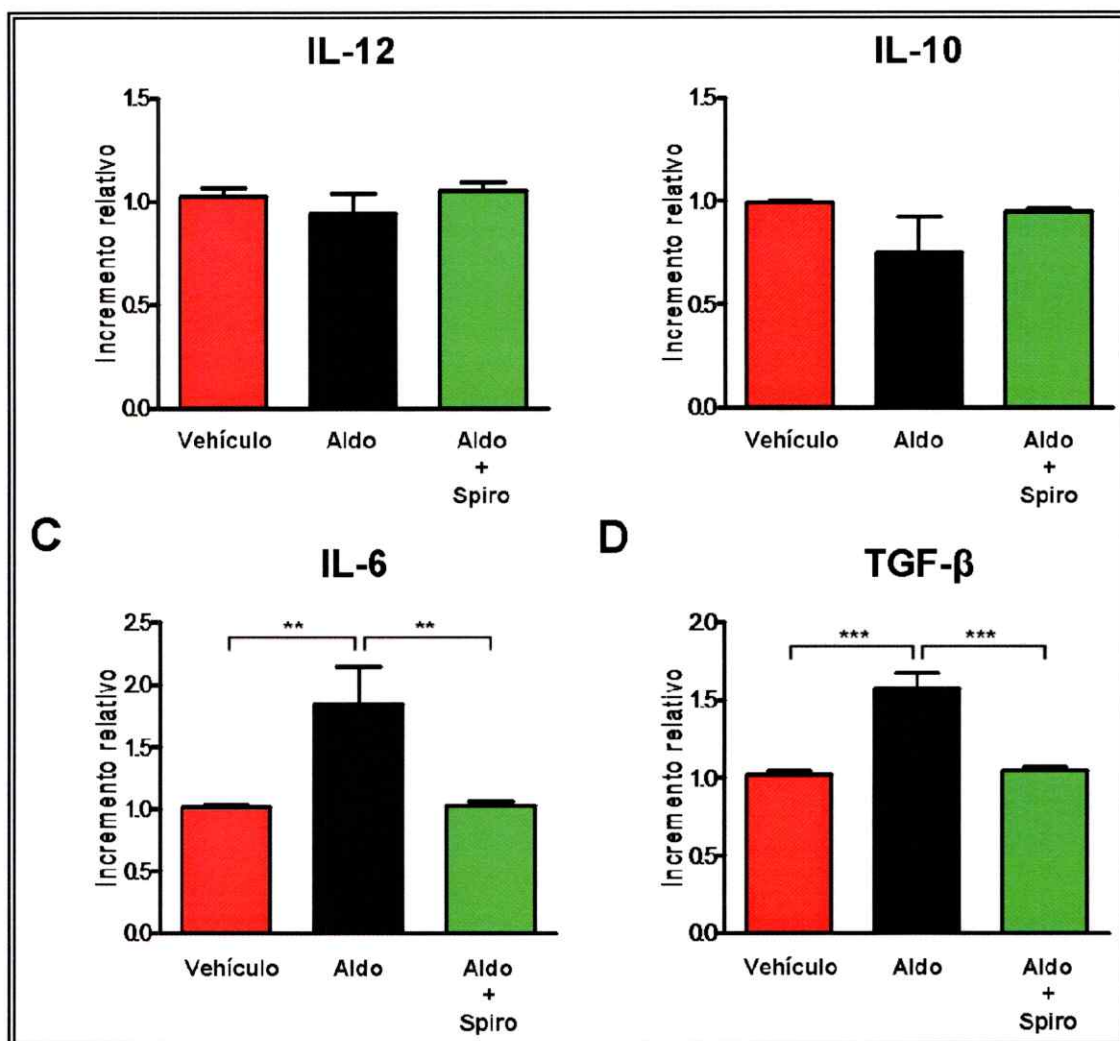
(B) DCs fueron tratadas ya sea con vehículo (rojo), aldosterona 100 nM (negro) o espironolactona 5 μ M previo al tratamiento con aldosterona (verde) durante 24 hrs, para luego evaluar la expresión de las moléculas coestimuladoras CD86, CD80, PD-L1 y PD-L2 en la población CD11c⁺ mediante citometría de flujo. Histogramas representativos de la expresión de los diferentes marcadores (superior). Porcentaje de DCs que exhiben niveles elevados de expresión de cada marcador (inferior). Los gráficos muestran los promedios \pm SD de tres experimentos independientes. *n.s.*: no significativo; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, ANOVA de una vía.

9.5. Aldosterona potencia la secreción de IL-6 y TGF- β por DCs de manera dependiente del MR

El ambiente de citoquinas en el cual los linfocitos T reciben estimulación por complejos pMHC y moléculas coestimuladoras puede definir la magnitud y el tipo de respuesta efectora que induce un determinado antígeno (Mazzoni y Segal, 2004). Debido al importante rol que cumplen las citoquinas en la iniciación y polarización de respuestas mediadas por linfocitos T, decidimos evaluar la capacidad de aldosterona de modular la secreción de citoquinas por parte de DCs. Para esto, DCs derivadas de médula ósea fueron incubadas durante 24 horas en presencia de esta hormona para posteriormente determinar la liberación de diferentes citoquinas al medio de cultivo mediante ELISA. Este análisis permitió observar nuevamente un patrón diferencial de la regulación de la función de la DC, ya que si bien esta hormona no modula la secreción de IL-12 e IL-10 (Figura 11A y B), DCs tratadas con aldosterona liberan una cantidad significativamente mayor de IL-6 y TGF- β al medio de cultivo, en comparación con DCs tratadas con vehículo (Figura 11C y D). De manera adicional, la potenciación de la secreción de ambas citoquinas inducida por aldosterona fue eficientemente abolida por el tratamiento previo con espironolactona, lo que sugiere que este proceso requiere de la señalización a través del MR en DCs (Figura 11C y D). De este modo, estos datos muestran que aldosterona modula la función de la DC, promoviendo la secreción de IL-6 y TGF- β , mediante un proceso dependiente del MR.

Figura 11

Aldosterona potencia la secreción concertada de IL-6 y TGF- β por DCs mediante un proceso que requiere la señalización a través del MR



DCs derivadas de médula ósea fueron tratadas ya sea con vehículo (rojo), aldosterona 100 nM (negro) o espironolactona 5 μ M previo al tratamiento con aldosterona (verde) durante 24 hrs, para luego determinar la concentración de IL-12 (A), IL-10 (B), IL-6 (C) o TGF- β (D) en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA. Los datos se muestran como el incremento de la concentración de citoquina secretada respecto de las DCs tratadas con vehículo. Los gráficos muestran los promedios \pm SD de al menos tres experimentos independientes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, ANOVA de una vía.

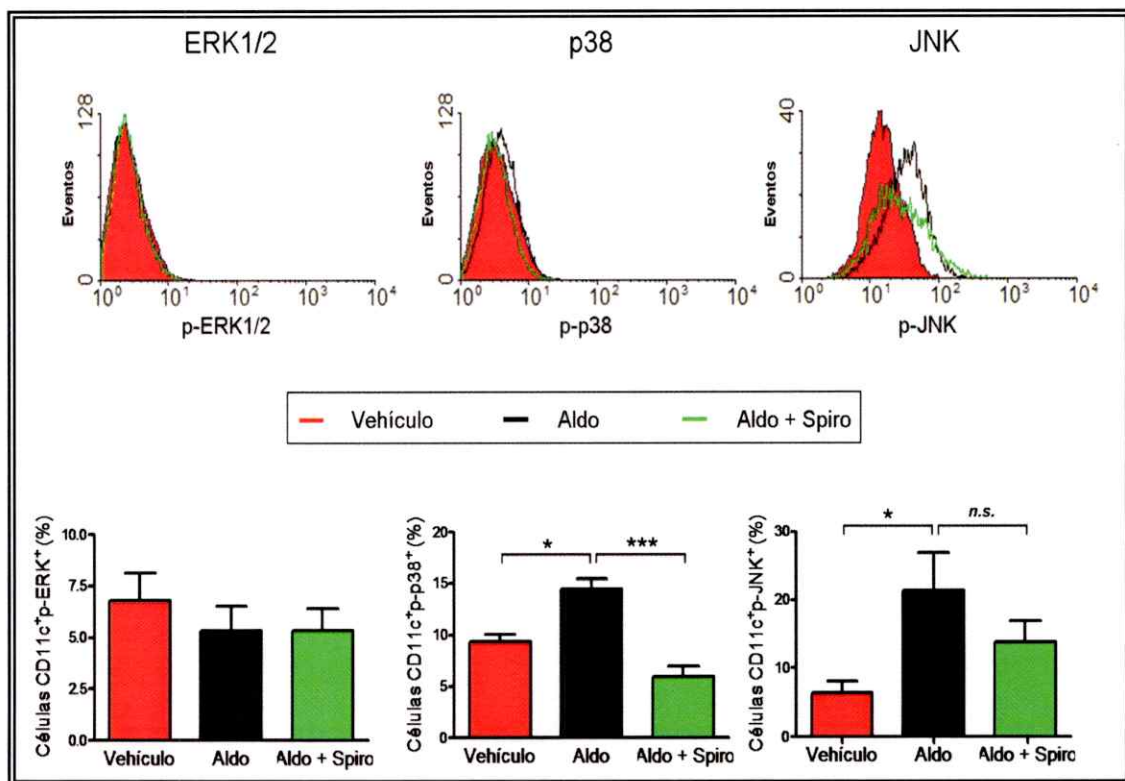
9.6. Aldosterona induce la activación de la MAPK JNK en DCs

Durante años se ha aceptado que la acción de aldosterona en diferentes tejidos blanco resulta de la unión de esta hormona al MR y la inducción de la expresión de diversos genes, sin embargo, evidencia reciente ha ampliado esta visión demostrando que parte de los efectos inducidos por aldosterona se deben a la rápida activación de diferentes vías de señalización, entre las que se cuentan componentes de la vía de las MAPKs (Verrey y col., 2000; Gekle y col., 2001). En base a estos antecedentes y con el objeto de caracterizar el mecanismo mediante el cual aldosterona modula la función de las DCs, decidimos evaluar la activación de miembros de la vía de las MAPKs, ERK 1/2, p38 y JNK, en DCs tratadas con aldosterona. Para esto, las DCs fueron tratadas durante 10 minutos con aldosterona para luego determinar el nivel de fosforilación de las MAPKs mencionadas anteriormente mediante citometría de flujo. Mediante esta metodología fue posible determinar que aldosterona induce un aumento significativo en la fosforilación JNK comparado con los niveles observados en DCs tratadas con vehículo, un efecto que puede ser parcialmente suprimido mediante el pretratamiento con espironolactona (Figura 12). Aun cuando el análisis estadístico indica que aldosterona induce un aumento significativo en la fosforilación de p38 en relación a lo observado en DCs tratadas con vehículo, estos resultados no son concluyentes debido a que las diferencias de señal detectadas mediante esta metodología son mínimas. De manera similar, la fosforilación de ERK 1/2 permanece al nivel basal en DCs tratadas con aldosterona (Figura 12), lo que indica que aldosterona afecta una porción discreta de la vía de las MAPKs. De este modo, estos resultados apoyan la noción de que aldosterona modula la

función de las DCs y sugieren que este efecto es mediado por la activación de la MAPK JNK.

Figura 12

Aldosterona induce la fosforilación de la MAPK JNK en DCs



DCs fueron tratadas ya sea con vehículo (rojo), aldosterona 100 nM (negro) o espironolactona 5 μ M previo al tratamiento con aldosterona (verde) durante 10 minutos, para posteriormente evaluar la fosforilación de las MAPKs ERK 1/2 (izquierda), p38 (medio) y JNK (derecha) en la población CD11c⁺ mediante citometría de flujo. Histogramas representativos de la fosforilación de las diferentes MAPKs en la población CD11c⁺ (superior). Porcentaje de fosforilación de MAPKs en DCs (inferior). Los gráficos muestran los promedios \pm SD de tres experimentos independientes. *n.s.*: no significativo; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, ANOVA de una vía.

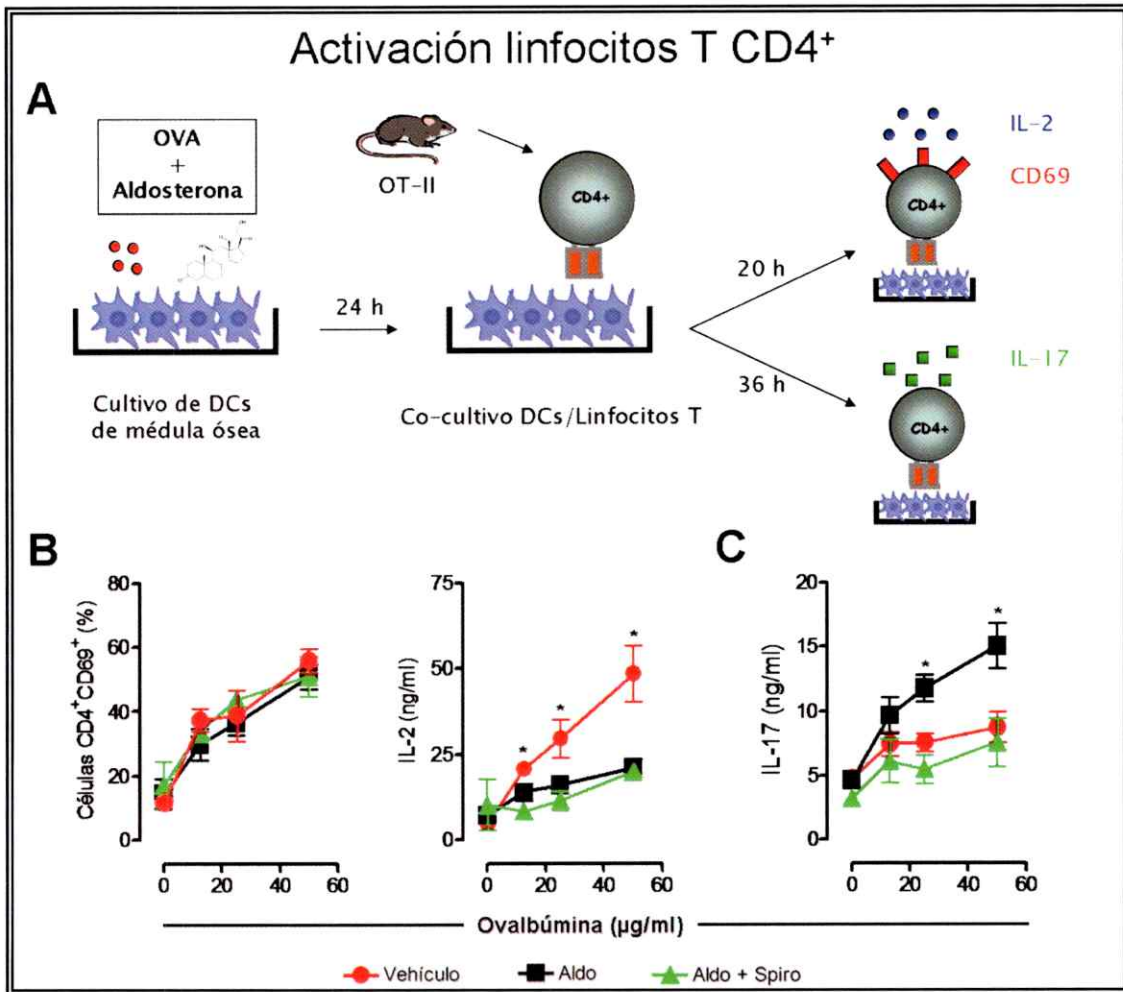
9.7. DCs tratadas con aldosterona promueven la secreción de IL-17 por linfocitos T CD4⁺

Debido al importante papel que desempeñan los linfocitos T CD4⁺ en el desarrollo de diversos procesos inflamatorios y enfermedades autoinmunes (Bradley y col., 1999; Yura y col., 2001; Brunn y col., 2008), decidimos evaluar la capacidad de aldosterona de modular la activación de este subtipo de linfocitos T por DCs. Para esto, DCs fueron pulsadas con OVA y tratadas con aldosterona durante 24 horas, para posteriormente co-cultivar, en ausencia de la hormona, con linfocitos T CD4⁺ específicos (Figura 13A). A diferencia de la potenciación de los parámetros de activación observada en linfocitos T CD8⁺, la expresión de CD69 en linfocitos T CD4⁺ en respuesta a DCs tratadas con aldosterona es similar a la observada en co-cultivos con DCs control (Figura 13B). Sorpresivamente, DCs tratadas con aldosterona suprimen de manera significativa la secreción de IL-2 por parte de linfocitos T CD4⁺ (Figura 13B). Estos resultados sugieren que aldosterona afecta de manera diferencial la activación de linfocitos T por DCs, potenciando por una parte la activación de linfocitos T CD8⁺ e inhibiendo la respuesta de linfocitos T CD4⁺. Sin embargo, debido a la observación de que aldosterona potencia la secreción de IL-6 y TFG- β por DCs y que recientemente se ha descrito el requerimiento de ambas citoquinas para la polarización de linfocitos T CD4⁺ vírgenes hacia un fenotipo efector Th17 (McGeachy y col., 2007), decidimos analizar la secreción de IL-17 por linfocitos T CD4⁺ co-cultivados durante 36 horas con DCs tratadas con aldosterona (Figura 13A). Mediante la determinación de este parámetro se pudo evidenciar que DCs tratadas con aldosterona inducen un aumento en la secreción de IL-17 por parte de linfocitos T CD4⁺, al comparar con la secreción inducida por DCs

tratadas con vehículo (Figura 13C). Además, la potenciación de la secreción de IL-17 inducida por aldosterona es eficientemente suprimida por el pretratamiento de las DCs con espironolactona (Figura 13C). De este modo, estos datos sugieren que aldosterona confiere a las DCs la capacidad de promover la polarización de linfocitos T CD4⁺ a un fenotipo Th17, a través de un proceso dependiente de la señalización mediada por el MR.

Figura 13

DCs tratadas con aldosterona potencian la polarización de linfocitos T CD4⁺ en células Th17



(A) Sistema experimental para evaluar la activación y polarización de linfocitos T CD4⁺ por DCs *in vitro*.

DCs pulsadas con diferentes concentraciones de OVA fueron tratadas con vehículo (rojo), aldosterona 100 nM (negro), o bien con espironolactona 5 µM previo al tratamiento con aldosterona (verde), durante 24 hrs. Al cabo de este tiempo fueron co-cultivadas con linfocitos T CD4⁺ OT-II en ausencia de aldosterona durante 20 hrs (B) para luego evaluar la secreción de IL-2 y la expresión de CD69, o bien durante 36 hrs (C), para determinar la secreción de IL-17 mediante ELISA. Los gráficos muestran los promedios ± SD de tres experimentos independientes. Aldosterona vs vehículo: * $p < 0,05$, ANOVA de una vía.

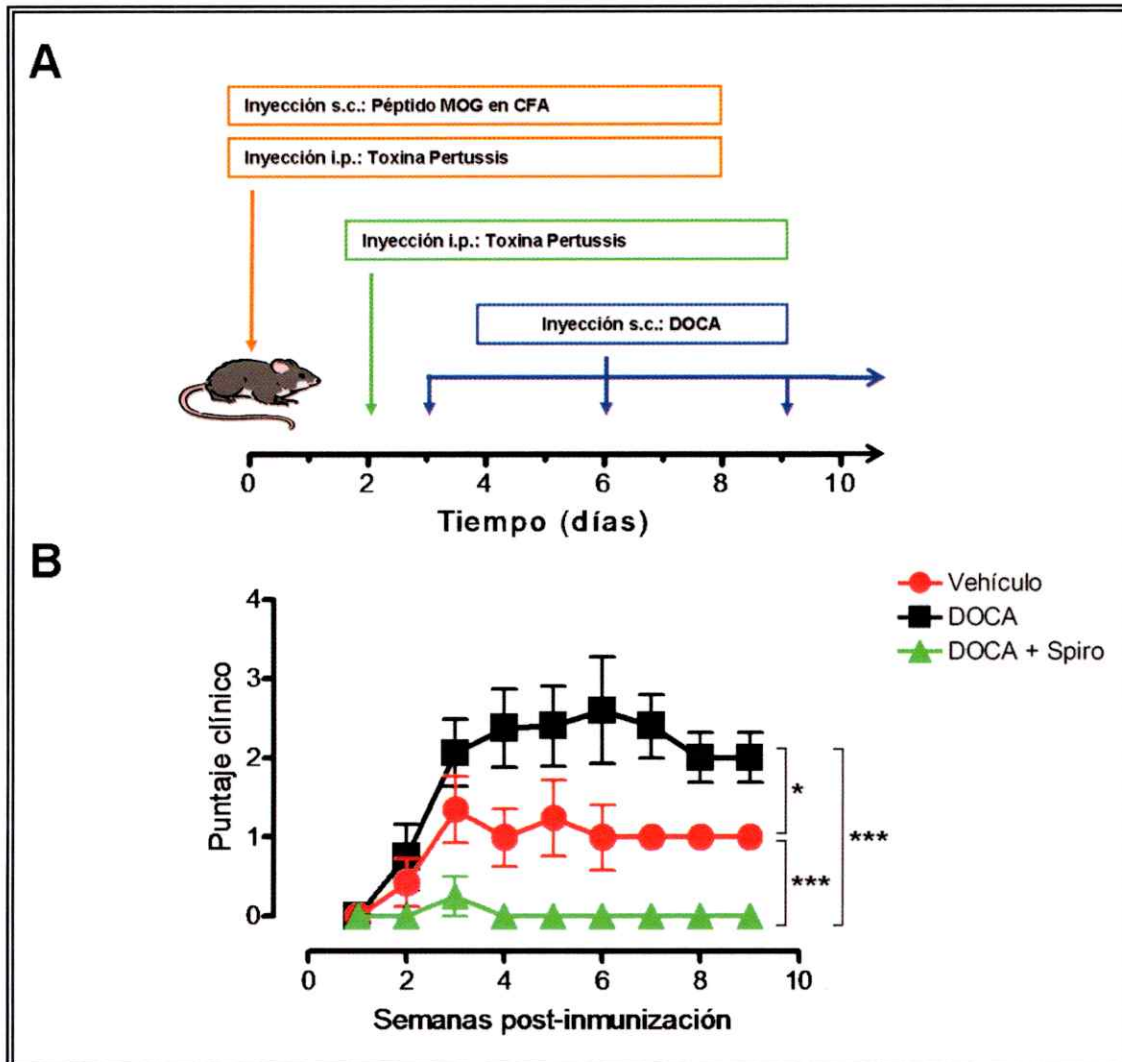
9.8. Aldosterona aumenta la severidad de un modelo murino de esclerosis múltiple

La evidencia expuesta hasta este punto demuestra que componentes esenciales para la iniciación de respuestas inmunes adaptativas son susceptibles de ser modulados por aldosterona, ya que, mediante la modificación de diferentes parámetros que determinan la actividad de las DCs, esta hormona potencia la activación y diferenciación de linfocitos T. Sin embargo, las estrategias utilizadas no permiten determinar si niveles elevados de aldosterona pueden promover el desarrollo de daño autoinmune. Con este objetivo, evaluamos el desarrollo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo murino de esclerosis múltiple mediado por linfocitos T, en animales tratados con elevadas dosis de mineralocorticoides. Debido a la baja vida media plasmática que presenta aldosterona y a que gran parte de los efectos observados en células inmunes requieren del MR, los animales fueron tratados con deoxicorticosterona acetato (DOCA), un análogo de aldosterona que además de ser un agonista del MR, presenta una mayor estabilidad en plasma (Vallee y col., 1995). Tal como se muestra en la figura 14A, luego de la inmunización con un péptido derivado de la glicoproteína de la mielina del oligodendrocito (MOG) se inició la administración subcutánea ya sea de vehículo o de DOCA dos veces a la semana. Un tercer grupo de animales recibió, además del tratamiento con DOCA, espironolactona por vía oral con el propósito de evaluar la participación del MR *in vivo*. Tal como ha sido reportado previamente por nuestro grupo (Iruretagoyena y col., 2006), los animales control (inyectados con vehículo) comienzan a mostrar signos de enfermedad dos semanas después de la inmunización, alcanzando un puntaje clínico máximo de 1,5 para luego estabilizarse en un valor cercano a 1 (Figura 14B). De manera similar, los animales tratados con DOCA comienzan a mostrar signos

de enfermedad cerca de dos semanas después de la inducción, sin embargo en este grupo se registra una mayor severidad de la enfermedad a contar de la tercera semana, alcanzando un puntaje máximo cercano a 3, para luego estabilizarse de manera más tardía en un valor de 2 (Figura 14B). De manera notable, la administración de espironolactona no solo evita el aumento en la severidad de la enfermedad inducido por DOCA, sino que además disminuye de manera significativa los valores de puntaje clínico en comparación con animales control, previniendo prácticamente por completo el desarrollo de EAE. Estos resultados muestran que elevados niveles de mineralocorticoides incrementa la severidad de una enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T, lo que sugiere un rol de aldosterona en el desarrollo de respuestas contra tejidos propios *in vivo*. Adicionalmente, nuestros datos sugieren la posibilidad de utilizar espironolactona como un fármaco supresor de daño autoinmune.

Figura 14

Las manifestaciones clínicas de una enfermedad autoinmune son exacerbadas por el tratamiento con DOCA



(A) Esquema de inducción de EAE y tratamiento con DOCA.

(B) Ratones C57BL/6 fueron inducidos a desarrollar EAE y 72 hrs después comenzaron a recibir inyecciones subcutáneas de vehículo (rojo) o DOCA (negro) dos veces por semana. Un tercer grupo recibió, de manera adicional a la administración de DOCA, alimento suplementado con espirolactona (verde). La progresión de enfermedad fue registrada diariamente, asignándose un puntaje clínico a los diferentes grados de parálisis, según lo indicado en materiales y métodos. Los gráficos muestran los promedios \pm SD de dos experimentos independientes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$, Test de Mann-Whitney, dos colas.

9.9. Aldosterona potencia la respuesta Th17 anti-mielina en un modelo de autoinmunidad

Tomando en cuenta que la población de linfocitos T CD4⁺ productores de IL-17 ha sido recientemente descrita como la principal responsable en el desarrollo de EAE (Langrish y col., 2005; Komiyama y col., 2006) y que aldosterona induce la polarización de linfocitos Th17 por DCs *in vitro*, decidimos evaluar si elevados niveles de mineralocorticoides son capaces de potenciar la respuesta Th17 específica en el modelo murino de esclerosis múltiple descrito anteriormente. Para esto, determinamos la secreción de IL-17, IFN- γ e IL-2 por parte de linfocitos T obtenidos de nodos linfáticos de ratones inmunizados en respuesta a DCs pulsadas con un péptido derivado de MOG. Consistente con la mayor severidad de EAE observada en ratones tratados con DOCA, los linfocitos T derivados de estos animales exhiben una secreción significativamente mayor tanto de IL-17 como de IFN- γ en respuesta al péptido MOG, en comparación con las células provenientes de ratones control (Figura 15A y B). Aún cuando la secreción de ambas citoquinas es potenciada por DOCA, solamente en el caso de la secreción de IL-17 es posible observar diferencias en respuesta a bajas concentraciones de péptido (Figura 15A y B), lo que sugiere que este mineralocorticoide induce la producción de IL-17 por parte de linfocitos T *in vivo* y se correlaciona con los resultados obtenidos *in vitro* (Figura 13C). A diferencia de lo descrito anteriormente, no se observaron diferencias en la secreción de IL-2 por parte de linfocitos derivados de ratones tratados con DOCA y ratones control (Figura 15C).

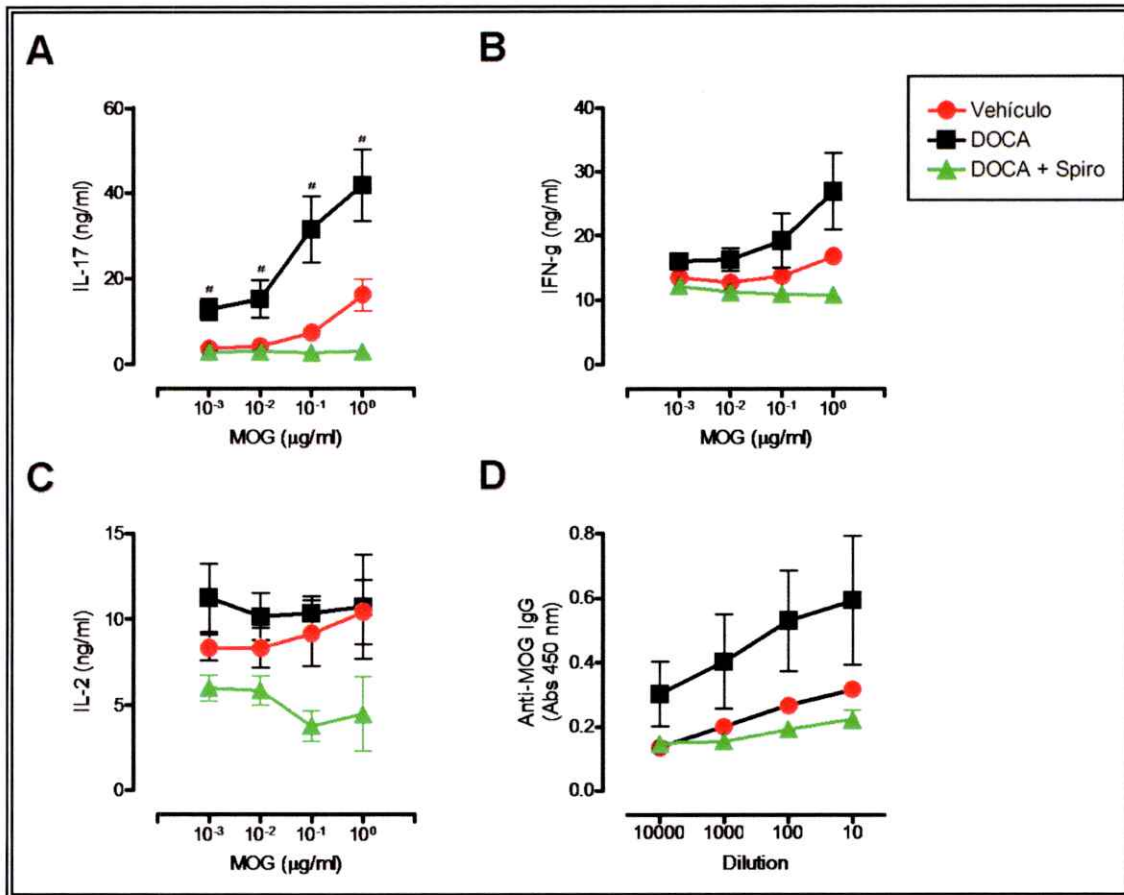
Con el fin de evaluar de manera completa el efecto de aldosterona sobre la respuesta autoinmune, la presencia de anticuerpos específicos para el péptido MOG en sangre

proveniente de ratones de los diferentes grupos fue determinada mediante ELISA. De manera similar a los resultados obtenidos para linfocitos T, los ratones tratados con DOCA presentan títulos de IgG anti-mielina significativamente elevados en comparación con los observados en animales tratados con vehículo (Figura 15D). Notablemente, la administración de espironolactona suprime por completo la respuesta tanto de linfocitos T como de linfocitos B, lo que apoya tanto los resultados obtenidos en la progresión de EAE como el eventual uso de este fármaco como un inmunosupresor (Figura 15A-D).

Estos resultados sugieren que elevados niveles de aldosterona pueden promover el daño autoinmune producto de una expansión de la población de linfocitos Th17.

Figura 15

Aldosterona promueve la respuesta contra mielina potenciando la producción de IL-17 y la secreción de IgG específica



Ratones C57BL/6 fueron inducidos a desarrollar EAE y 72 hrs después comenzaron a recibir tratamiento de acuerdo al protocolo indicado en la figura 14A. Tres semanas después de la inmunización, suspensiones celulares de nodos linfáticos fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de péptido MOG. Luego de 72 hrs de cultivo, la secreción de IL-17 (A), IFN-γ (B) e IL-2 (C) fue evaluada mediante ELISA. Paralelamente se evaluó la respuesta de anticuerpos anti-mielina presentes en el suero de estos animales mediante ELISA. DOCA vs vehículo: # $p < 0,05$, ANOVA de una vía.

10. DISCUSIÓN

La visión clásica de la contribución de aldosterona a la progresión del daño vascular ha contemplado el aumento del volumen vascular mediante la modificación de la función renal, lo que conduce a un aumento en la rigidez vascular y eventualmente a accidentes cardiovasculares (Mosso y col., 2003; Mulatero y col., 2004). En la última década se ha propuesto que este mecanismo no sería el único mediante el cual aldosterona afecta la función vascular, debido principalmente al descubrimiento de la expresión del MR en diversos tejidos, como el cerebro, el corazón y los vasos sanguíneos, y a la producción de especies reactivas del oxígeno, el infiltrado de células inmunes y la inflamación del espacio cardiovascular que inducen elevados niveles de esta hormona (Brown, 2008). Por otra parte, componentes del sistema inmune con potencial altamente proinflamatorio han sido asociados al desarrollo de hipertensión en diversos sistemas experimentales, así como también en humanos (Herrera y col., 2006; Tian y col., 2007). A pesar de que se ha descrito que la función de células del sistema inmune puede ser modulada no solo por mediadores solubles del propio sistema inmune, sino que también son susceptibles de regulación por sustancias como neurotransmisores u hormonas (Karpuzoglu y col., 2006; Lengi y col., 2006; Franco y col., 2007), la eventual potenciación de las propiedades inflamatorias de miembros del sistema inmune por aldosterona no ha sido estudiada.

10.1. Potenciación de la activación de linfocitos T CD8⁺ inducida por aldosterona

Debido a que las DCs cumplen un rol central tanto en la iniciación de respuestas inmunes como en la mantención de tolerancia a componentes propios, en esta tesis se estudió la modulación de la activación de la inmunidad adaptativa por el mineralocorticoide aldosterona. Para esto se utilizó un sistema experimental que se basa en el reconocimiento de la proteína OVA por parte de linfocitos T derivados de ratones transgénicos OT-I, cuyo TCR reconoce de manera específica un péptido derivado de OVA asociado a moléculas MHC-I. De este modo, la activación de linfocitos T CD8⁺ fue evaluada en respuesta a DCs previamente pulsadas con OVA, en presencia o ausencia de aldosterona. Mediante esta estrategia fue posible observar un aumento en la activación de linfocitos T CD8⁺ por DCs como resultado de la incubación con aldosterona, por el aumento tanto de la expresión del marcador de activación CD69 como de la secreción de IL-2. De manera similar a los efectos inducidos en otros sistemas experimentales, como el aumento en la expresión de proteínas implicadas en el transporte de Na⁺ en células del epitelio renal, la estimulación de la activación de linfocitos T fue inducida en el rango nanomolar de concentraciones de aldosterona (Naray-Fejes-Toth y col., 2004). Consistente con esta dependencia de la concentración, el efecto potenciador inducido por aldosterona sobre la activación de linfocitos fue completamente suprimido por el tratamiento previo con espironolactona, un antagonista específico del MR (Rogerson y col., 2003; Rogerson y col., 2004). Estos resultados sugieren que aldosterona promueve la activación de linfocitos CD8⁺ por DCs mediante un proceso que requiere la señalización vía MR. Estos datos proveen una explicación a lo observado en el estudio de Guzik y col., el cual describe que si bien la infusión de

angiotensina II potencia la activación de linfocitos T *in vivo*, este efecto no es completamente reproducible en ensayos de activación *in vitro* (Guzik y col., 2007). Considerando que angiotensina II es un intermediario del sistema RAA que promueve la secreción de aldosterona por la corteza adrenal, es probable que la mayor activación de linfocitos T observada en respuesta a la infusión de angiotensina II se deba al aumento de los niveles de aldosterona circulantes, efecto que no se observaría en ensayos *in vitro* en los que solo se encuentra el componente precursor angiotensina II.

Debido a que la potenciación de la activación de linfocitos T CD8⁺ por DCs descrita anteriormente resulta de la incubación de ambos tipos celulares en presencia de aldosterona, se decidió estudiar si aldosterona modula de manera directa la función de los linfocitos T mediante un ensayo independiente de APCs. A diferencia de lo descrito para la activación por DCs, la activación de linfocitos T CD8⁺ inducida por anticuerpos anti-CD3ε inmovilizados no es potenciada por aldosterona, observándose niveles similares tanto de la expresión de CD69 como de la secreción de IL-2. Estos resultados sugieren que el efecto potenciador de aldosterona sobre la activación de linfocitos T CD8⁺ requiere de la actividad de las DCs y no se debe a un efecto directo sobre la función de los linfocitos T. Estas observaciones contrastan con lo descrito por Cima y col., quienes demuestran que corticosterona, una hormona corticosteroide estructuralmente similar a aldosterona, por un lado potencia la activación de linfocitos T inducida por anti-CD3 e inhibe la activación inducida por antígenos (Cima y col., 2004). Las diferencias observadas se deben a los mecanismos de señalización que median la actividad de ambas hormonas, por un lado aldosterona requiere de la señalización a través del MR, mientras que corticosterona señala vía el receptor de glucocorticoides. Este caso de modulación

diferencial mediado por corticosteroides destaca la importancia de los diferentes mecanismos que determinan la actividad de los linfocitos T y eventualmente la magnitud de las respuestas inmunes.

Una observación interesante es que, si bien el bloqueo del MR no afecta la expresión de CD69, el tratamiento con espironolactona inhibe prácticamente por completo la secreción de IL-2 por parte de linfocitos T estimulados con anti-CD3. Considerando que de estos parámetros de activación solamente la expresión de IL-2 en linfocitos T requiere de la actividad del factor de transcripción NF- κ B, el resultado obtenido concuerda con un estudio en el que se observó que espironolactona reduce la actividad de este factor de transcripción mediante un mecanismo independiente del MR (Sonder y col., 2006). En base a esta evidencia, es posible proponer que la baja secreción de IL-2 observada en respuesta a espironolactona se debe a que, aún en condiciones de estimulación de CD3 ϵ , esta droga mantiene inactivo al factor de transcripción NF- κ B.

10.2. Modulación de la actividad de las DCs mediante la activación del MR

De acuerdo a los resultados obtenidos, la potenciación de la activación de linfocitos T CD8⁺ inducida por aldosterona requiere de la actividad de las DCs, por lo que se evaluaron parámetros de activación de linfocitos T cocultivados con DCs previamente tratadas con aldosterona. A pesar de que estas condiciones experimentales también inducen una mayor expresión de CD69 e IL-2 por linfocitos T CD8⁺, al evaluar un posible mecanismo mediante el análisis de la formación de sinapsis inmunológica entre DCs tratadas con aldosterona y linfocitos T, no se observaron diferencias en comparación a DCs tratadas con vehículo. En base a esto y para describir la eventual

modulación de la función de las DCs por aldosterona se decidió analizar la expresión del MR en dichas células. Mediante la utilización de un anticuerpo específico fue posible determinar que las DCs expresan el MR a niveles comparables con lo observado en riñón. Este resultado apoya lo descrito por el grupo de Sauer y col. hace más de una década, quienes describieron la expresión del MR a nivel de mRNA en monocitos de sangre periférica, células que en condiciones inflamatorias se diferencian a DCs (Sauer y col., 1996).

Tomando en cuenta que la potenciación de la activación de linfocitos T CD8⁺ inducida por aldosterona requiere de DCs y que estas APCs expresan el receptor de esta hormona, los siguientes ensayos apuntaron a determinar si la funcionalidad de las DCs es modulada en respuesta a aldosterona. En primer lugar analizamos la expresión de moléculas de superficie implicadas en la estimulación, ya sea positiva o negativa, de los linfocitos T. Si bien en el caso de las moléculas coestimuladoras positivas CD80 y CD86 no se observaron cambios en los niveles de expresión en respuesta a aldosterona, el tratamiento con esta hormona disminuye de manera significativa la población de DCs que expresan elevados niveles de las moléculas coestimuladoras negativas PDL1 Y PDL2. Estas moléculas constituyen los ligandos de PD-1, un miembro de la familia de receptores CD28, preferentemente expresado en linfocitos T y B activados, el cual regula de manera negativa la activación de linfocitos T y que se ha descrito cumple un rol crucial en la mantención de tolerancia inmune (Nishimura y col., 2001; Sharpe y Freeman, 2002). Por su parte, PDL1 y PDL2 son parte de la familia de moléculas B7, y mientras la expresión de PDL2 se encuentra restringida a macrófagos y DCs activadas, se ha reportado que PDL1 se expresa en células tanto hematopoyéticas como no

hematopoyéticas (Yamazaki y col., 2002; Liang y col., 2003; Loke y Allison, 2003). Ambas moléculas han sido involucradas en el mantenimiento de la tolerancia periférica, principalmente debido a la observación de que ratones deficientes en estos ligandos presentan mayor susceptibilidad o gravedad en el desarrollo de diferentes enfermedades como EAE, diabetes y nefritis autoinmune (Ansari y col., 2003; Dong y col., 2004; Zhu y col., 2006; Menke y col., 2007). Debido al importante rol que juegan estas moléculas en la inhibición de respuestas mediadas por linfocitos T, la disminución de PDL1 y PDL2 en DCs inducida por aldosterona sugiere un mecanismo mediante el cual esta hormona potencia la activación de linfocitos T CD8⁺.

Tal como se mencionó anteriormente, la expresión de PDL1 no está restringida a células de origen hematopoyético, encontrándose en tejidos como el corazón y el endotelio vascular donde inhiben las funciones efectoras de linfocitos T CD8⁺, a la vez que promueven la tolerancia mediante la generación de Tregs (Liang y col., 2003; Krupnick y col., 2005). Considerando que estos tejidos también expresan el MR y responden a aldosterona, es posible sugerir un potencial mecanismo de pérdida de tolerancia periférica en el cual elevados niveles de aldosterona disminuyen la expresión de PDL1 en tejidos vasculares, de manera similar a lo observado en DCs, lo que potenciaría las funciones efectoras de linfocitos T CD8⁺ y eventualmente promovería el infiltrado e inflamación característicos de enfermedades vasculares. De este modo, los resultados obtenidos en este trabajo podrían también involucrar efectos de aldosterona sobre tejidos blanco de afecciones vasculares, como el corazón y los vasos sanguíneos, sin embargo la comprobación de estas hipótesis requiere de la continuación de esta línea de investigación.

Otro parámetro que determina la magnitud y el tipo de respuestas mediadas por linfocitos T es la secreción de diferentes citoquinas por las DCs. En este caso también se observó un comportamiento diferencial en respuesta a aldosterona; a pesar de que no se detectan cambios en la secreción de IL-10 e IL-12, esta hormona potencia la secreción tanto de IL-6 como de TGF- β por DCs, en un proceso que requiere del MR. La potenciación de la secreción de IL-6 es consistente con lo observado por el grupo de Blasi y col., quienes describen la expresión de IL-6 a nivel de mRNA como marcador de inflamación en diferentes tejidos de ratas tratadas con aldosterona, un efecto que se revierte mediante la administración de un antagonista del MR (Blasi y col., 2003). Adicionalmente, el aumento en la expresión de TGF- β en respuesta a aldosterona también es apoyada por un estudio en el cual se observó que ratas tratadas con DOCA exhiben un incremento en los niveles de transcrito de TGF- β en riñón, aumento que requiere de la señalización a través del MR (Lam y col., 2006). De esta manera, estos resultados muestran que aldosterona puede modular las respuestas adaptativas no solo mediante la modificación de las moléculas de superficie expresadas por las DCs sino que también a través de la regulación del perfil de citoquinas secretado por este tipo celular, lo que finalmente influye en el tipo de mecanismo efector desplegado por los linfocitos T.

Con el objetivo de caracterizar el mecanismo mediante el cual aldosterona modula la actividad de las DCs se evaluó la activación de los tres miembros principales de las MAPKs, ERK, p38 y JNK, las cuales se ha descrito que participan en diversos aspectos de la respuesta inmune, tanto en la activación de la respuesta innata, como en el inicio y finalización de la inmunidad adaptativa (Dong y col., 2002). Adicionalmente, ha surgido

evidencia que demuestra efectos no genómicos inducidos por aldosterona en diferentes células blanco, los cuales indican que la unión de esta hormona al MR induce la activación de vías de segundos mensajeros (Fuller y Young, 2005). En DCs se observó que la exposición breve a aldosterona (10 minutos) induce un aumento en la fosforilación de JNK, mientras que ERK permanece en estado inactivo. De manera similar a lo descrito anteriormente, la leve inducción de la fosforilación de p38 inducida por aldosterona fue suprimida por el tratamiento previo con espironolactona, lo que sugiere un mecanismo en el cual el MR unido a su ligando induciría la activación de p38. Por su parte, la fosforilación de JNK es inhibida solo de manera parcial por el pretratamiento con espironolactona. Un fenómeno similar ha sido observado en células endoteliales y de riñón, en las cuales aldosterona induce la activación rápida de ERK y JNK en un proceso que requiere del MR (Grossmann y col., 2004; Uhrenholt y col., 2004). Nuestros resultados coinciden con la activación no genómica de JNK inducida por aldosterona, sin embargo no se detectó fosforilación de ERK en respuesta a aldosterona en DCs. De manera interesante, una investigación reciente ha demostrado que aldosterona induce la activación de p38 en células de músculo liso vascular y que la activación de esta quinasa sería un mediador de los efectos profibróticos inducidos por aldosterona (Callera y col., 2005). Es importante destacar que los resultados obtenidos respecto de la activación de p38 no son concluyentes debido a las pequeñas diferencias observadas y que en futuras investigaciones se debiera incluir la detección de residuos fosforilados en estas MAPKs mediante western-blot.

La secreción de citoquinas en respuesta a diferentes estímulos por parte de células del sistema inmune requiere de la activación de sistemas de transducción de señales entre

los que los miembros de las MAPKs juegan un rol preponderante. En particular, estudios en líneas celulares deficientes en p38 y JNK han demostrado que ambas quinasas son esenciales para la producción de IL-6 en respuesta a estímulos inflamatorios (Chu y col., 1999; Allen y col., 2000). En base a esta evidencia, es posible proponer que la activación de p38 y JNK inducida por aldosterona sea parte del mecanismo que induce un aumento en la secreción de citoquinas por parte de DCs. Sin embargo, estudios futuros permitirán determinar si efectivamente la activación de esta vía contribuye a la secreción de citoquinas por DCs.

De este modo, nuestros resultados sugieren un posible mecanismo mediante el cual aldosterona altera la función de las DCs. Adicionalmente, estos resultados exigen determinar en próximas investigaciones a qué nivel ocurre la señalización no genómica de aldosterona y si, además de la activación de la vía de las MAPKs, ocurre la activación de otros mediadores que se ha descrito son activados por aldosterona de manera no genómica como por ejemplo la proteína quinasa C (PKC) (Callera y col., 2005).

10.3. Desarrollo de inmunidad tipo Th17 y aumento en la gravedad de enfermedad autoinmune inducido por aldosterona

En vista de que aldosterona no solo modula la expresión de moléculas coestimuladoras sino que también modifica la secreción de citoquinas por DCs, se evaluó la activación de linfocitos T CD4⁺, un subtipo linfocitario que determina el tipo de respuesta adquirida dependiendo del ambiente de citoquinas en el cual es estimulado por complejos pMHC, en respuesta a DCs tratadas con aldosterona. A diferencia de lo observado con linfocitos T CD8⁺, DCs tratadas con aldosterona no potencian la activación linfocitos T CD4⁺,

observándose incluso la inhibición de la secreción de IL-2. Sin embargo, al evaluar la secreción de IL-17 se observó que DCs tratadas con aldosterona potencian la secreción de esta citoquina por linfocitos T CD4⁺. Tomando en cuenta que la presencia de IL-6 y TFG-β se ha descrito como necesaria para la polarización de linfocitos T CD4⁺ vírgenes hacia un fenotipo efector Th17 (McGeachy y col., 2007), este resultado es consistente con el aumento en la secreción de ambas citoquinas por DCs en respuesta a aldosterona. De manera adicional, la supresión de la secreción de IL-2 observada en respuesta a DCs tratadas con aldosterona también es consistente con estos resultados, ya que recientemente se ha demostrado que la señalización inducida por IL-2 en linfocitos CD4⁺ impide la polarización hacia un fenotipo Th17 (Laurence y col., 2007). Estos resultados muestran que aldosterona confiere a las DCs la capacidad de inducir la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes hacia un fenotipo Th17, probablemente mediante la modificación del perfil de citoquinas secretadas por DCs inducido por aldosterona.

Debido a que uno de los principales objetivos de este trabajo es determinar la capacidad de elevados niveles de aldosterona de influenciar una respuesta inmune *in vivo*, se evaluó la progresión de una enfermedad autoinmune en ratones tratados con un agonista del MR. Consistente con la modulación de la actividad de linfocitos T inducida por aldosterona *in vitro*, la administración del mineralocorticoide DOCA en ratones aumenta las manifestaciones clínicas de EAE, una enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T. Además de presentar puntajes clínicos más altos, aquellos animales administrados con DOCA exhibieron una mayor respuesta de linfocitos T y anticuerpos específicos para el antígeno del sistema nervioso central MOG. Las suspensiones de nodos linfáticos

obtenidos de estos animales presentaron una secreción elevada tanto de IL-17 e IFN- γ en respuesta a MOG, dos citoquinas proinflamatorias que han sido descritas como esenciales para la patogénesis de EAE (Langrish y col., 2005; Komiyama y col., 2006). Estos resultados apoyan la idea de que altos niveles de aldosterona son capaces de promover un estado inflamatorio y el daño contra tejidos propios, principalmente mediante la expansión de linfocitos Th17. En este sentido, un estudio reciente ha establecido una posible relación entre la polarización de linfocitos Th17 inducida por aldosterona y el daño vascular. El trabajo de Cortez y col. demuestra que IL-17, la principal citoquina secretada por linfocitos Th17, estimula la expresión de una metaloproteinasa de matriz (MMP-1) en cultivos primarios de fibroblastos cardíacos humanos (Cortez y col., 2007). Esta es una proteasa que participa en el remodelamiento de la matriz extracelular mediante la degradación de colágeno intersticial, por lo que la regulación de su expresión y funcionalidad juega un rol crítico en el desarrollo de hipertrofia y fibrosis vascular (Spinale, 2002; Ganea y col., 2007). De este modo, es posible proponer un mecanismo mediante el cual aldosterona promueve el daño vascular. En este modelo, la polarización de linfocitos Th17 inducida por aldosterona produce un incremento en el nivel de IL-17 circulante, lo que resultaría en un aumento en la expresión de MMPs por los fibroblastos que componen la vasculatura y un desbalance en el proceso de recambio de matriz extracelular en las paredes vasculares. Esta desregulación conduciría al desarrollo de hipertrofia y fibrosis con el consecuente engrosamiento de la pared vascular, la formación de placas ateroscleróticas, el aumento en la presión y finalmente daño cardíaco. Es importante destacar que si bien este estudio entrega evidencia de que aldosterona es capaz de promover el daño contra tejidos

propios mediante la potenciación del sistema inmune adaptativo, es necesario realizar estudios que demuestren directamente el modelo propuesto anteriormente. También se deberá evaluar en un próximo estudio si el efecto observado *in vivo* requiere de la actividad de las DCs, tal como se demostró en ensayos *in vitro*.

10.4. Posible aplicación de espironolactona como droga inmunosupresora

Una de las observaciones derivadas de este estudio es la capacidad de espironolactona no solo de evitar los efectos inducidos por aldosterona, sino la supresión prácticamente total de signos de enfermedad y parámetros inmunológicos inflamatorios registrados en animales inducidos a desarrollar EAE que recibieron espironolactona oral en conjunto con el tratamiento con DOCA. De este modo se agrega un potencial efecto inmunosupresor a una droga que actualmente tiene la aprobación de la administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos (FDA) para administrarse como un anti-hipertensivo en casos de hiperaldosteronismo. Tal como se ha mencionado con anterioridad, estudios previos han revelado que esta droga tendría un efecto inhibitor de la actividad de NF- κ B de manera independiente del MR (Sonder y col., 2006), por lo que sería un potencial candidato para la obtención de DCs tolerogénicas aplicables en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, tal como ha sido reportado previamente por nuestro grupo para otros inhibidores de este factor de transcripción, como andrografolide y rosiglitazona (Iruretagoyena y col., 2006).

11. CONCLUSIONES

El trabajo realizado en esta tesis indica que la hormona mineralocorticoide aldosterona es capaz de modular las respuestas inmunes adaptativas en base a las siguientes conclusiones:

- Aldosterona no afecta directamente la función de los linfocitos T CD8⁺, sin embargo potencia la activación de estos linfocitos a través de un proceso que requiere de DCs.
- Las DCs expresan el receptor de mineralocorticoides y responden al estímulo con aldosterona disminuyendo la expresión de moléculas coestimuladoras negativas y aumentando la secreción de las citoquinas IL-6 y TGF- β .
- DCs tratadas con aldosterona inducen la polarización de linfocitos T CD4⁺ hacia un fenotipo Th17 mediante un mecanismo dependiente del receptor de mineralocorticoides.
- Elevados niveles de aldosterona exacerbaban los parámetros clínicos e inmunológicos en un modelo de enfermedad autoinmune mediado por linfocitos Th17.

Una conclusión adicional que se desprende de este trabajo de tesis es que espironolactona posee propiedades inmunosupresoras que lo convierten en un fármaco potencialmente aplicable en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Aderem, A. y R.J. Ulevitch 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**:(6797): 782-7.
- Adler, A.J., D.W. Marsh, G.S. Yochum, J.L. Guzzo, A. Nigam, W.G. Nelson y D.M. Pardoll 1998. CD4+ T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells. *J Exp Med* **187**:(10): 1555-64.
- Ahokas, R.A., Y. Sun, S.K. Bhattacharya, I.C. Gerling y K.T. Weber 2005. Aldosteronism and a proinflammatory vascular phenotype: role of Mg²⁺, Ca²⁺, and H₂O₂ in peripheral blood mononuclear cells. *Circulation* **111**:(1): 51-7.
- Akbari, O., R.H. DeKruyff y D.T. Umetsu 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* **2**:(8): 725-31.
- Allen, M., L. Svensson, M. Roach, J. Hambor, J. McNeish y C.A. Gabel 2000. Deficiency of the stress kinase p38alpha results in embryonic lethality: characterization of the kinase dependence of stress responses of enzyme-deficient embryonic stem cells. *J Exp Med* **191**:(5): 859-70.
- Ansari, M.J., A.D. Salama, T. Chitnis, R.N. Smith, H. Yagita, H. Akiba, T. Yamazaki, M. Azuma, H. Iwai, S.J. Khoury, H. Auchincloss, Jr. y M.H. Sayegh 2003. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* **198**:(1): 63-9.
- Balsari, A., R. Marolda, C. Gambacorti-Passerini, G. Sciorelli, G. Tona, E. Cosulich, D. Taramelli, G. Fossati, G. Parmiani y N. Cascinelli 1986. Systemic administration of autologous, alloactivated helper-enriched lymphocytes to patients with metastatic melanoma of the lung. A phase I study. *Cancer Immunol Immunother* **21**:(2): 148-55.
- Banchereau, J. y R.M. Steinman 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:(6673): 245-52.
- Bataillard, A., J.C. Freiche, M. Vincent, J. Sassard y J.L. Touraine 1986. Antihypertensive effect of neonatal thymectomy in the genetically hypertensive LH rat. *Thymus* **8**:(6): 321-30.
- Bell, D., J.W. Young y J. Banchereau 1999. Dendritic cells. *Adv Immunol* **72**: 255-324.
- Blasi, E.R., R. Rocha, A.E. Rudolph, E.A. Blomme, M.L. Polly y E.G. McMahon 2003. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int* **63**:(5): 1791-800.
- Bonvalet, J.P., N. Alfaidy, N. Farman y M. Lombes 1995. Aldosterone: intracellular receptors in human heart. *Eur Heart J* **16 Suppl N**: 92-7.
- Bouneaud, C., P. Kourilsky y P. Bousso 2000. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* **13**:(6): 829-40.
- Bradley, L.M., V.C. Asensio, L.K. Schioetz, J. Harbertson, T. Krahl, G. Patstone, N. Woolf, I.L. Campbell y N. Sarvetnick 1999. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J Immunol* **162**:(5): 2511-20.

- Brightbill, H.D., D.H. Libraty, S.R. Krutzik, R.B. Yang, J.T. Belisle, J.R. Bleharski, M. Maitland, M.V. Norgard, S.E. Plevy, S.T. Smale, P.J. Brennan, B.R. Bloom, P.J. Godowski y R.L. Modlin 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* **285**:(5428): 732-6.
- Brilla, C.G., L.S. Matsubara y K.T. Weber 1993. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol* **25**:(5): 563-75.
- Brocker, T. 1999. The role of dendritic cells in T cell selection and survival. *J Leukoc Biol* **66**:(2): 331-5.
- Brocker, T., M. Riedinger y K. Karjalainen 1997. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* **185**:(3): 541-50.
- Brown, N.J. 2008. Aldosterone and vascular inflammation. *Hypertension* **51**:(2): 161-7.
- Brunn, A., O. Utermohlen, M. Carstov, M. Sanchez Ruiz, H. Miletic, D. Schluter y M. Deckert 2008. CD4 T Cells Mediate Axonal Damage and Spinal Cord Motor Neuron Apoptosis in Murine P0106-125-Induced Experimental Autoimmune Neuritis. *Am J Pathol*.
- Callera, G.E., R.M. Touyz, R.C. Tostes, A. Yogi, Y. He, S. Malkinson y E.L. Schiffrin 2005. Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension* **45**:(4): 773-9.
- Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, M. Azuma, K. Okumura, L.L. Lanier y J. Banchereau 1994. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* **180**:(5): 1841-7.
- Cima, I., N. Corazza, B. Dick, A. Fuhrer, S. Herren, S. Jakob, E. Ayuni, C. Mueller y T. Brunner 2004. Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation. *J Exp Med* **200**:(12): 1635-46.
- Cortez, D.M., M.D. Feldman, S. Mummidi, A.J. Valente, B. Steffensen, M. Vincenti, J.L. Barnes y B. Chandrasekar 2007. IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP-beta, NF-kappaB, and AP-1 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**:(6): H3356-65.
- Curtsinger, J.M., C.M. Johnson y M.F. Mescher 2003. CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. *J Immunol* **171**:(10): 5165-71.
- Chu, W.M., D. Ostertag, Z.W. Li, L. Chang, Y. Chen, Y. Hu, B. Williams, J. Perrault y M. Karin 1999. JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity* **11**:(6): 721-31.
- Dhodapkar, M.V., R.M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz y N. Bhardwaj 2001. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* **193**:(2): 233-8.
- Dong, C. 2006. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol* **6**:(4): 329-33.
- Dong, C., R.J. Davis y R.A. Flavell 2002. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* **20**: 55-72.

- Dong, C. y R.A. Flavell 2001. Th1 and Th2 cells. *Curr Opin Hematol* **8**:(1): 47-51.
- Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, D.B. Flies, J.M. van Deursen y L. Chen 2004. B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes. *Immunity* **20**:(3): 327-36.
- Esquerre, M., B. Tauzin, M. Guiraud, S. Muller, A. Saoudi y S. Valitutti 2008. Human regulatory T cells inhibit polarization of T helper cells toward antigen-presenting cells via a TGF-beta-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:(7): 2550-5.
- Fasce, E., I. Campos, P. Ibanez, M. Flores, H. Zarate, O. Roman y F. Fasce 2007. Trends in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in urban communities in Chile. *J Hypertens* **25**:(9): 1807-11.
- Franco, R., R. Pacheco, C. Lluís, G.P. Ahern y P.J. O'Connell 2007. The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends Immunol* **28**:(9): 400-7.
- Fuller, P.J. y M.J. Young 2005. Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension* **46**:(6): 1227-35.
- Ganea, E., M. Trifan, A.C. Laslo, G. Putina y C. Cristescu 2007. Matrix metalloproteinases: useful and deleterious. *Biochem Soc Trans* **35**:(Pt 4): 689-91.
- Gekle, M., R. Freudinger, S. Mildenerger, K. Schenk, I. Marschitz y H. Schramek 2001. Rapid activation of Na⁺/H⁺-exchange in MDCK cells by aldosterone involves MAP-kinase ERK1/2. *Pflugers Arch* **441**:(6): 781-6.
- Gomez-Sanchez, C.E., A.F. de Rodriguez, D.G. Romero, J. Estess, M.P. Warden, M.T. Gomez-Sanchez y E.P. Gomez-Sanchez 2006. Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* **147**:(3): 1343-8.
- González, P.A., C.E. Prado, E.D. Leiva, L.J. Carreño, S.M. Bueno y A.M. Kalergis 2008. Respiratory syncytial virus impairs T cell activation by preventing synapse assembly with dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **In press**.
- Grakoui, A., S.K. Bromley, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen y M.L. Dustin 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**:(5425): 221-7.
- Greenberg, S. y S. Grinstein 2002. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* **14**:(1): 136-45.
- Griendling, K.K., C.A. Minieri, J.D. Ollerenshaw y R.W. Alexander 1994. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **74**:(6): 1141-8.
- Grossmann, C., R. Freudinger, S. Mildenerger, A.W. Krug y M. Gekle 2004. Evidence for epidermal growth factor receptor as negative-feedback control in aldosterone-induced Na⁺ reabsorption. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**:(6): F1226-31.
- Gryglewski, R.J., R.M. Palmer y S. Moncada 1986. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* **320**:(6061): 454-6.
- Guzik, T.J., N.E. Hoch, K.A. Brown, L.A. McCann, A. Rahman, S. Dikalov, J. Goronzy, C. Weyand y D.G. Harrison 2007. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med* **204**:(10): 2449-60.

- Harrington, L.E., P.R. Mangan y C.T. Weaver 2006. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* **18**:(3): 349-56.
- Harris, P. 1983. Evolution and the cardiac patient. *Cardiovasc Res* **17**:(8): 437-45.
- Hart, D.N. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* **90**:(9): 3245-87.
- Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J.V. Ravetch, R.M. Steinman y M.C. Nussenzweig 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* **194**:(6): 769-79.
- Herrera, J., A. Ferrebuz, E.G. MacGregor y B. Rodriguez-Iturbe 2006. Mycophenolate mofetil treatment improves hypertension in patients with psoriasis and rheumatoid arthritis. *J Am Soc Nephrol* **17**:(12 Suppl 3): S218-25.
- Hu, X. y J.W. Funder 2006. The evolution of mineralocorticoid receptors. *Mol Endocrinol* **20**:(7): 1471-8.
- Inaba, K., M. Pack, M. Inaba, H. Sakuta, F. Isdell y R.M. Steinman 1997. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med* **186**:(5): 665-72.
- Inaba, K., M. Witmer-Pack, M. Inaba, K.S. Hathcock, H. Sakuta, M. Azuma, H. Yagita, K. Okumura, P.S. Linsley, S. Ikehara, S. Muramatsu, R.J. Hodes y R.M. Steinman 1994. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* **180**:(5): 1849-60.
- Infante-Duarte, C., H.F. Horton, M.C. Byrne y T. Kamradt 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* **165**:(11): 6107-15.
- Ip, W.K. y Y.L. Lau 2004. Distinct maturation of, but not migration between, human monocyte-derived dendritic cells upon ingestion of apoptotic cells of early or late phases. *J Immunol* **173**:(1): 189-96.
- Iruretagoyena, M.I., C.A. Riedel, E.D. Leiva, M.A. Gutierrez, S.H. Jacobelli y A.M. Kalergis 2008. Activating and inhibitory Fcγ receptors can differentially modulate T cell-mediated autoimmunity. *Eur J Immunol* **38**:(8): 2241-50.
- Iruretagoyena, M.I., S.E. Sepulveda, J.P. Lezana, M. Hermoso, M. Bronfman, M.A. Gutierrez, S.H. Jacobelli y A.M. Kalergis 2006. Inhibition of nuclear factor-κB enhances the capacity of immature dendritic cells to induce antigen-specific tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pharmacol Exp Ther* **318**:(1): 59-67.
- Iruretagoyena, M.I., J.A. Tobar, P.A. Gonzalez, S.E. Sepulveda, C.A. Figueroa, R.A. Burgos, J.L. Hancke y A.M. Kalergis 2005. Andrographolide interferes with T cell activation and reduces experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* **312**:(1): 366-72.
- Karpuzoglu, E., J.B. Fenaux, R.A. Phillips, A.J. Lengi, F. Elvinger y S. Ansar Ahmed 2006. Estrogen up-regulates inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, and cyclooxygenase-2 in splenocytes activated with T cell stimulants: role of interferon-γ. *Endocrinology* **147**:(2): 662-71.

- Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo y Y. Iwakura 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **177**:(1): 566-73.
- Krupnick, A.S., A.E. Gelman, W. Barchet, S. Richardson, F.H. Kreisel, L.A. Turka, M. Colonna, G.A. Patterson y D. Kreisel 2005. Murine vascular endothelium activates and induces the generation of allogeneic CD4+25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* **175**:(10): 6265-70.
- Kurts, C., H. Kosaka, F.R. Carbone, J.F. Miller y W.R. Heath 1997. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* **186**:(2): 239-45.
- Lam, E.Y., J.W. Funder, D.J. Nikolic-Paterson, P.J. Fuller y M.J. Young 2006. Mineralocorticoid receptor blockade but not steroid withdrawal reverses renal fibrosis in deoxycorticosterone/salt rats. *Endocrinology* **147**:(7): 3623-9.
- Langrish, C.L., Y. Chen, W.M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J.D. Sedgwick, T. McClanahan, R.A. Kastelein y D.J. Cua 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **201**:(2): 233-40.
- Lanzavecchia, A. y F. Sallusto 2001. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol* **13**:(3): 291-8.
- Laurence, A., C.M. Tato, T.S. Davidson, Y. Kanno, Z. Chen, Z. Yao, R.B. Blank, F. Meylan, R. Siegel, L. Hennighausen, E.M. Shevach y J. O'Shea J 2007. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* **26**:(3): 371-81.
- Lengi, A.J., R.A. Phillips, E. Karpuzoglu y S.A. Ahmed 2006. 17beta-estradiol downregulates interferon regulatory factor-1 in murine splenocytes. *J Mol Endocrinol* **37**:(3): 421-32.
- Lewington, S., R. Clarke, N. Qizilbash, R. Peto y R. Collins 2002. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* **360**:(9349): 1903-13.
- Liang, S.C., Y.E. Latchman, J.E. Buhlmann, M.F. Tomczak, B.H. Horwitz, G.J. Freeman y A.H. Sharpe 2003. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol* **33**:(10): 2706-16.
- Loke, P. y J.P. Allison 2003. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:(9): 5336-41.
- Matzinger, P. y S. Guerder 1989. Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature* **338**:(6210): 74-6.
- Mazzoni, A. y D.M. Segal 2004. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc Biol* **75**:(5): 721-30.
- McGeachy, M.J., K.S. Bak-Jensen, Y. Chen, C.M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan y D.J. Cua 2007. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* **8**:(12): 1390-7.

- Medzhitov, R. y C.A. Janeway, Jr. 1997a. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**:(1): 4-9.
- Medzhitov, R. y C.A. Janeway, Jr. 1997b. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**:(3): 295-8.
- Menke, J., J.A. Lucas, G.C. Zeller, M.E. Keir, X.R. Huang, N. Tsuboi, T.N. Mayadas, H.Y. Lan, A.H. Sharpe y V.R. Kelley 2007. Programmed death 1 ligand (PD-L) 1 and PD-L2 limit autoimmune kidney disease: distinct roles. *J Immunol* **179**:(11): 7466-77.
- Minagawa, M., J. Narita, T. Tada, S. Maruyama, T. Shimizu, M. Bannai, H. Oya, K. Hatakeyama y T. Abo 1999. Mechanisms underlying immunologic states during pregnancy: possible association of the sympathetic nervous system. *Cell Immunol* **196**:(1): 1-13.
- Mosmann, T.R. y R.L. Coffman 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**: 145-73.
- Mosso, L., C. Carvajal, A. Gonzalez, A. Barraza, F. Avila, J. Montero, A. Huete, A. Gederlini y C.E. Fardella 2003. Primary aldosteronism and hypertensive disease. *Hypertension* **42**:(2): 161-5.
- Mulatero, P., M. Stowasser, K.C. Loh, C.E. Fardella, R.D. Gordon, L. Mosso, C.E. Gomez-Sanchez, F. Veglio y W.F. Young, Jr. 2004. Increased diagnosis of primary aldosteronism, including surgically correctable forms, in centers from five continents. *J Clin Endocrinol Metab* **89**:(3): 1045-50.
- Muller, D.N., E. Shagdarsuren, J.K. Park, R. Dechend, E. Mervaala, F. Hampich, A. Fiebeler, X. Ju, P. Finckenberg, J. Theuer, C. Viedt, J. Kreuzer, H. Heidecke, H. Haller, M. Zenke y F.C. Luft 2002. Immunosuppressive treatment protects against angiotensin II-induced renal damage. *Am J Pathol* **161**:(5): 1679-93.
- Muller, J. 1987. Regulation of aldosterone biosynthesis. Physiological and clinical aspects. *Monogr Endocrinol* **29**: 1-364.
- Naray-Fejes-Toth, A., P.M. Snyder y G. Fejes-Toth 2004. The kidney-specific WNK1 isoform is induced by aldosterone and stimulates epithelial sodium channel-mediated Na⁺ transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:(50): 17434-9.
- Nishimura, H., T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Nakatani, M. Hara, A. Matsumori, S. Sasayama, A. Mizoguchi, H. Hiai, N. Minato y T. Honjo 2001. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* **291**:(5502): 319-22.
- Palacios, R., J. Santos, A. Garcia, E. Castells, M. Gonzalez, J. Ruiz y M. Marquez 2006. Impact of highly active antiretroviral therapy on blood pressure in HIV-infected patients. A prospective study in a cohort of naive patients. *HIV Med* **7**:(1): 10-5.
- Probst, H.C., J. Lagnel, G. Kollias y M. van den Broek 2003. Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8⁺ T cell tolerance. *Immunity* **18**:(5): 713-20.
- Pulendran, B., K. Palucka y J. Banchereau 2001. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* **293**:(5528): 253-6.
- Rocha, R., A.E. Rudolph, G.E. Friedrich, D.A. Nachowiak, B.K. Kekec, E.A. Blomme, E.G. McMahon y J.A. Delyani 2002. Aldosterone induces a vascular

- inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**:(5): H1802-10.
- Rogerson, F.M., Y. Yao, B.J. Smith y P.J. Fuller 2004. Differences in the determinants of eplerenone, spironolactone and aldosterone binding to the mineralocorticoid receptor. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **31**:(10): 704-9.
- Rogerson, F.M., Y.Z. Yao, B.J. Smith, N. Dimopoulos y P.J. Fuller 2003. Determinants of spironolactone binding specificity in the mineralocorticoid receptor. *J Mol Endocrinol* **31**:(3): 573-82.
- Sauer, J., M. Castren, U. Hopfner, F. Holsboer, G.K. Stalla y E. Arzt 1996. Inhibition of lipopolysaccharide-induced monocyte interleukin-1 receptor antagonist synthesis by cortisol: involvement of the mineralocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab* **81**:(1): 73-9.
- Seaberg, E.C., A. Munoz, M. Lu, R. Detels, J.B. Margolick, S.A. Riddler, C.M. Williams y J.P. Phair 2005. Association between highly active antiretroviral therapy and hypertension in a large cohort of men followed from 1984 to 2003. *Aids* **19**:(9): 953-60.
- Sharpe, A.H. y G.J. Freeman 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* **2**:(2): 116-26.
- Sonder, S.U., A. Woetmann, N. Odum y K. Bendtzen 2006. Spironolactone induces apoptosis and inhibits NF-kappaB independent of the mineralocorticoid receptor. *Apoptosis* **11**:(12): 2159-65.
- Spinale, F.G. 2002. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* **90**:(5): 520-30.
- Steinman, R.M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**: 271-96.
- Steinman, R.M., D. Hawiger y M.C. Nussenzweig 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **21**: 685-711.
- Stoitzner, P., S. Holzmann, A.D. McLellan, L. Ivarsson, H. Stossel, M. Kapp, U. Kammerer, P. Douillard, E. Kampgen, F. Koch, S. Saeland y N. Romani 2003. Visualization and characterization of migratory Langerhans cells in murine skin and lymph nodes by antibodies against Langerin/CD207. *J Invest Dermatol* **120**:(2): 266-74.
- Takeda, Y., I. Miyamori, S. Inaba, K. Furukawa, H. Hatakeyama, T. Yoneda, H. Mabuchi y R. Takeda 1997. Vascular aldosterone in genetically hypertensive rats. *Hypertension* **29**:(1 Pt 1): 45-8.
- Tian, N., J.W. Gu, S. Jordan, R.A. Rose, M.D. Hughson y R.D. Manning, Jr. 2007. Immune suppression prevents renal damage and dysfunction and reduces arterial pressure in salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**:(2): H1018-25.
- Uhrenholt, T.R., J. Schjerning, L.E. Rasmussen, P.B. Hansen, R. Norregaard, B.L. Jensen y O. Skott 2004. Rapid non-genomic effects of aldosterone on rodent vascular function. *Acta Physiol Scand* **181**:(4): 415-9.
- Vallee, S.M., C.A. Grillo, S. Gonzalez, L. Cosen-Binker, E.R. de Kloet, B.S. McEwen y A.F. De Nicola 1995. Further studies in deoxycorticosterone acetate treated rats:

- brain content of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors and effect of steroid antagonists on salt intake. *Neuroendocrinology* **61**(2): 117-24.
- Veldhoen, M., R.J. Hocking, C.J. Atkins, R.M. Locksley y B. Stockinger 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**(2): 179-89.
- Verhasselt, V., O. Vosters, C. Beuneu, C. Nicaise, P. Stordeur y M. Goldman 2004. Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4pos T cells by human mature autologous dendritic cells. *Eur J Immunol* **34**(3): 762-72.
- Verrey, F., D. Pearce, R. Pfeiffer, B. Spindler, L. Mastroberardino, V. Summa y M. Zecevic 2000. Pleiotropic action of aldosterone in epithelia mediated by transcription and post-transcription mechanisms. *Kidney Int* **57**(4): 1277-82.
- Volkman, A., T. Zal y B. Stockinger 1997. Antigen-presenting cells in the thymus that can negatively select MHC class II-restricted T cells recognizing a circulating self antigen. *J Immunol* **158**(2): 693-706.
- Walker, L.S. y A.K. Abbas 2002. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* **2**(1): 11-9.
- Wang, Y. y Q.J. Wang 2004. The prevalence of prehypertension and hypertension among US adults according to the new joint national committee guidelines: new challenges of the old problem. *Arch Intern Med* **164**(19): 2126-34.
- Weber, K.T. y C.G. Brilla 1991. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* **83**(6): 1849-65.
- Williams, J.S. y G.H. Williams 2003. 50th anniversary of aldosterone. *J Clin Endocrinol Metab* **88**(6): 2364-72.
- Yamazaki, T., H. Akiba, H. Iwai, H. Matsuda, M. Aoki, Y. Tanno, T. Shin, H. Tsuchiya, D.M. Pardoll, K. Okumura, M. Azuma y H. Yagita 2002. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* **169**(10): 5538-45.
- Ye, P., F.H. Rodriguez, S. Kanaly, K.L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. Zhang, J.E. Shellito, G.J. Bagby, S. Nelson, K. Charrier, J.J. Peschon y J.K. Kolls 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* **194**(4): 519-27.
- Yura, M., I. Takahashi, M. Serada, T. Koshio, K. Nakagami, Y. Yuki y H. Kiyono 2001. Role of MOG-stimulated Th1 type "light up" (GFP+) CD4+ T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Autoimmun* **17**(1): 17-25.
- Zaman, M.A., S. Oparil y D.A. Calhoun 2002. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov* **1**(8): 621-36.
- Zhu, B., I. Guleria, A. Khosroshahi, T. Chitnis, J. Imitola, M. Azuma, H. Yagita, M.H. Sayegh y S.J. Khoury 2006. Differential role of programmed death-ligand 1 [corrected] and programmed death-ligand 2 [corrected] in regulating the susceptibility and chronic progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **176**(6): 3480-9.

Zinkernagel, R.M. y A. Althage 1999. On the role of thymic epithelium vs. bone marrow-derived cells in repertoire selection of T cells. Proc Natl Acad Sci U S A 96:(14): 8092-7.