

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS  
DENDRÍTICAS TOLEROGÉNICAS EN PACIENTES CON  
ARTRITIS REUMATOIDE.**

**TESIS ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE PARA OPTAR  
AL GRADO DE MAGISTER EN BIOQUÍMICA**

**POR**

**ADAM AGUIRRE DUCLER**

**Director de Tesis  
Dr. Juan Carlos Aguillón, Ph.D.**

**SANTIAGO - CHILE  
2008**

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>vi</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Patogénesis de la artritis reumatoide.....	2
1.2 Las células dendríticas.....	4
1.3 Las células dendríticas en autoinmunidad y en artritis reumatoide.....	5
1.4 Interleuquina 10.....	8
1.5 Las DC en la tolerancia inmunológica.....	10
1.6 Modelo experimental de artritis reumatoide.....	13
1.7 DC en enfermedades autoinmunes.....	13
<b>2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	<b>16</b>
2.1 Hipótesis.....	16
2.2 Objetivo general.....	16
2.3 Objetivos específicos.....	17
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.1 Pacientes.....	18
3.1.1 Criterios de inclusión.....	18
3.1.2 Criterios de exclusión.....	18
3.2 Generación de células dendríticas a partir de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide.....	19
3.3 Caracterizar fenotípicamente las células dendríticas generadas <i>ex vivo</i> , mediante el cultivo en presencia de IL-10, a través de la expresión de marcadores de membrana por citometría de flujo y morfológicamente mediante microscopía confocal.....	19
3.3.1 Evaluación fenotípica.....	20
3.3.2 Evaluación morfológica mediante microscopía confocal.....	20
3.4 Evaluar las células dendríticas tratadas con IL-10 <i>in vitro</i> , en relación al patrón de citoquinas secretadas.....	21
3.4.1 Patrón de citoquinas mediante ensayos de ELISPOT.....	21
3.4.2 Determinación de TGFβ1 mediante citometría de flujo.....	21
3.5 Evaluar las células dendríticas tratadas con IL-10 <i>in vitro</i> , mediante ensayos funcionales en cuanto a su capacidad fagocítica y alo-estimuladora.....	22

3.5.1	Ensayo de endocitosis de células dendríticas utilizando dextran-FITC	22
3.5.2	Capacidad de las células dendríticas tolerogénicas de inhibir la alo-proliferación	22
3.6	Análisis estadístico	23
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>24</b>
4.1.a	Características demográficas de pacientes y controles	24
4.1.b	Generación de células dendríticas a partir de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide	28
4.1.c	Evaluación morfológica mediante microscopía confocal	30
4.2	Caracterización fenotípica de las células dendríticas generadas <i>ex vivo</i> , mediante el cultivo en presencia de IL-10, a través de la expresión de marcadores de membrana por citometría de flujo	33
4.3	Evaluar las células dendríticas tratadas con IL-10 <i>in vitro</i> , en relación al patrón de citoquinas secretadas	41
4.4	Evaluar las células dendríticas tratadas con IL-10 <i>in vitro</i> , mediante ensayos funcionales en cuanto su capacidad fagocítica y aloestimuladora	45
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>59</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Dot plots representativos de las células dendríticas (DC) generadas a partir de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide .....	<b>29</b>
<b>Figura 2.</b> Microscopía confocal de células dendríticas (DC) de pacientes con artritis reumatoide e individuos controles .....	<b>31</b>
<b>Figura 3.</b> Porcentaje de células dendríticas (DC) (CD11C+) expresando distintos marcadores de superficie en pacientes con artritis reumatoide (AR) .....	<b>34</b>
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de células dendríticas (DC) (CD11C+) expresando distintos marcadores de superficie en individuos controles sanos .....	<b>35</b>
<b>Figura 5.</b> Expresión de marcadores de superficie en células dendríticas (DC) de pacientes con artritis reumatoide (AR) .....	<b>37</b>
<b>Figura 6.</b> Expresión de marcadores de superficie en células dendríticas (DC) de individuos controles sanos .....	<b>39</b>
<b>Figura 7.</b> Comparación de los niveles de expresión de los marcadores de superficie entre células dendríticas (DC) de pacientes con artritis reumatoide (AR) e individuos controles sanos .....	<b>40</b>
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de células dendríticas (DC) (CD11C+) que expresan TGF $\beta$ en pacientes con artritis reumatoide (AR) e individuos controles sanos .....	<b>42</b>
<b>Figura 9.</b> Determinación de citoquinas mediante ELISPOT en células dendríticas (DC) de pacientes con artritis reumatoide (AR) e individuos sanos .....	<b>44</b>
<b>Figura 10.</b> Comparación de la capacidad endocítica de células dendríticas (DC) de de pacientes con artritis reumatoide (AR) e individuos sanos .....	<b>46</b>
<b>Figura 11.</b> Capacidad de inhibición de la alo-proliferación de las células dendríticas (DC) de pacientes con artritis reumatoide (AR) e individuos controles sanos .....	<b>48</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1a.</b> Características demográficas de los pacientes con artritis reumatoide (AR) reclutados en este estudio.....	<b>24</b>
<b>Tabla 1b.</b> Características demográficas de los individuos controles sanos incluidos en este estudio.....	<b>25</b>
<b>Tabla 2a.</b> Generación de células dendríticas a partir de concentrados leucocitarios de pacientes con artritis reumatoide (AR).....	<b>26</b>
<b>Tabla 2b.</b> Generación de células dendríticas a partir de concentrados leucocitarios de individuos controles sanos.....	<b>27</b>

## ABREVIATURAS

AcMo	Anticuerpo monoclonal
AR	Artritis reumatoide
CCR	Receptor de Quimioquina (ej. CCR7)
CFSE	Carboxi-fluoresceína diacetato succinimidil éster
DC	Célula Dendrítica
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ELISPOT	Inmunospot Ligado a Enzima
FITC	Isotiocianato de Flurosceína
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
ICAM	Molécula de Adesión Intercelular (ej. ICAM1)
ICOS	Coestimulador Inducible
IL-	Interleuquina (ej. IL-4)
LPS	Lipopolisacárido
MHC I/II	Complejo Principal de Histocompatibilidad I/II
PBL	Linfocitos de Sangre Periférica
PBMC	Células Mononucleares de Sangre Periférica
PBS	Buffer Fosfato Salino
PE	Ficoeritrina
PHA	Fitohematoaglutinina
Treg	Linfocitos T regulatorios
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Factor de Necrosis Tumoral

## RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica autoinmune que se caracteriza por la inflamación crónica y progresiva de las articulaciones sinoviales llevando a la destrucción del cartílago y hueso articular. En la AR existe consenso que el proceso autoinmune involucra una presentación anormal de auto-antígenos por parte de células presentadoras de antígeno o células dendríticas (DC), que llevaría a la activación de células T CD4+ auto-reactivas, secretoras de interferón gamma e interleuquina (IL)-17, que inducen en los macrófagos, la secreción de IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . Durante la última década, el desarrollo de técnicas para generar gran número de DC *in vitro* junto con el entendimiento del rol de las DC en la tolerancia periférica, han permitido producir DC con propiedades tolerogénicas y reguladoras. En este contexto, en esta Tesis se generaron *in vitro* DC de pacientes AR a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), mediante el cultivo en presencia de IL-10 se buscó generar DC con propiedades tolerogénicas. Estas células se caracterizaron fenotípicamente mediante citometría de flujo y morfológicamente mediante microscopía confocal, además se caracterizaron en cuanto a expresión de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias; por último se realizaron ensayos funcionales *in vitro* de fagocitosis y de inhibición de la alo-proliferación. Como resultado, se generaron DC de pacientes AR con características tolerogénicas utilizando IL-10, estas células poseen una menor expresión en superficie celular de los marcadores CD83, CD40 y CD86 y las moléculas MHC clase II con relación a las DC maduras. Expresan en su superficie el receptor de quimioquinas CCR7, lo cual nos indica que son células con capacidad de migración a órganos linfoides secundarios. El uso de IL-10 permite generar DC productoras de TGF $\beta$  e IL-10, con una baja producción de IL-12 en relación a las DC maduras. Por último, estas DC poseen una elevada capacidad endocítica y una disminuida capacidad de inducción de alo-proliferación. También es importante destacar que estas DC no difieren a las generadas a partir de PBMC de individuos normales en cuanto a las

características fenotípicas y funcionales ya mencionadas. Por lo tanto, estos resultados sugieren que en los pacientes AR, las DC se pueden modular hacia un fenotipo tolerogénico, lo cual podría transformarse en una estrategia terapéutica a considerar.

## SUMMARY

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease characterized by chronic and progressive synovial joint inflammation, leading to cartilage and articular bone destruction. In RA pathogenesis, there is consensus that the autoimmune process involves altered self-antigen presentation by antigen-presenting cells or dendritic cells (DCs) leading to the activation of auto-reactive CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. Antigen-activated CD4<sup>+</sup> T lymphocytes are the main mediators of inflammation and articular damage through the secretion of interferon gamma and interleukin (IL)-17, which activates the release of IL-1, IL-6 and tumor necrosis factor alpha by macrophages. During the last decade, the development of techniques for generating large number of DCs *in vitro* together to the understanding of the role that DCs play in peripheral tolerance have permitted to produce DC with tolerogenic and regulatory properties. In this thesis, it has been hypothesized that peripheral blood mononuclear cells (PBMC)-derived DCs generated *in vitro* from RA patients, in the presence of IL-10, exhibit a tolerogenic phenotype. These cells were phenotypically and morphologically characterized by flow cytometry and confocal microscopy, respectively. Additionally, they were characterized in terms of their pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine secretion profile, and evaluating their functionality *in vitro* by endocytosis and alloproliferation inhibition assays. We have generated monocyte-derived DCs from RA patients, which display tolerogenic characteristics after they were cultured in presence of IL-10. They showed a lower surface expression of CD83, CD40, CD86 and MHC class II molecules when compared to mature DCs. They also expressed the chemokine receptor CCR7, which confers them the capability to migrate towards secondary lymphoid tissues. In addition, these IL-10-treated DCs showed to be higher producers of TGF $\beta$  and IL-10 than mature DCs but they displayed a lower ability to produce IL-12 compared to mature DCs. Finally, these DCs present a high endocytotic activity and a diminished ability to induce alloproliferation of PBMC. Interestingly, IL-10-treated DCs obtained from RA patients

did not differ from those obtained from healthy individuals in terms of phenotypic and functional characteristics described above. Taken together, these results suggest that DCs obtained from RA patients can be modulated to a tolerogenic phenotype by the IL-10 treatment, which allow us to postulate this experimental approach as a therapeutic strategy to be considered.

## 1. INTRODUCCIÓN.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica auto-inmune que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial, se caracteriza por inflamación crónica y progresiva de las articulaciones sinoviales, conduciendo normalmente a una significativa incapacidad y una reducción en la calidad de vida. Se presenta 2 a 3 veces con mayor frecuencia en mujeres que en hombres, y puede manifestarse a cualquier edad, con una mayor incidencia entre los 40 a 60 años de edad. La AR se asocia con tratamientos de alto costo, y si no es tratada adecuadamente, con una reducción en la expectativa de vida. La etiología y la patogénesis de la enfermedad son complejas y no han sido completamente dilucidadas (Breedveld, 1998; Firestein, 2003).

La AR es una enfermedad heterogénea con un amplio espectro de severidad clínica, que va desde la artritis leve hasta una forma invalidante que se caracteriza por tener altos títulos de factor reumatoide y compromiso vital de otros órganos (Wicks et al, 1994). Es una enfermedad poli-artrítica que involucra muchas articulaciones (6 ó más), aunque en etapas tempranas de la enfermedad, sólo una o muy pocas se ven afectadas. Virtualmente todas las articulaciones periféricas se pueden afectar, sin embargo, las más afectadas son las de manos, pies y rodilla, además de las inter-falángicas distales, e incluso puede afectar la columna vertebral y la articulación atlanto-axial. Para su tratamiento, se emplean numerosos fármacos, principalmente anti-inflamatorios no esteroideos, glucocorticoides e inmunosupresores, que la mayoría de las veces sólo controlan algunos signos y síntomas por un periodo limitado, asociándose además a importantes eventos adversos (Choy y Panayi, 2001; Smolen y Steiner, 2003). El entendimiento de su patogénesis ha posibilitado el descubrimiento de enfoques terapéuticos innovadores, que incluyen el bloqueo de moléculas efectoras del daño. Así, el uso de terapia antagonista de citoquinas, especialmente anti-factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), parecería ser una estrategia eficaz, específica y menos tóxica que la terapia convencional, para suprimir la inflamación y retardar el daño articular en alrededor del

70% de los pacientes refractarios a otros esquemas (Feldmann y Maini, 2001). Sin embargo, este nuevo enfoque, a pesar de ser beneficioso, no logra la remisión de la enfermedad, dado que no está dirigido al bloqueo de la génesis del proceso auto-inmune, el cual involucra la desregulación de clones de células T auto-reactivas.

### **1.1. Patogénesis de la artritis reumatoide.**

La AR es una enfermedad en la cuál el sistema inmune está íntimamente relacionado con la destrucción del cartílago y del hueso. La membrana sinovial de los pacientes con AR se caracteriza por hiperplasia, aumento de la vascularidad y la presencia de un infiltrado de células inflamatorias, principalmente neutrófilos y abundancia de células T CD4+, las cuales son centrales en la dirección de la respuesta inmune mediada por células.

Estudios genéticos han revelado que la presencia de la AR se encuentra ligada a los alelos *HLA-DRB1\*0401* y *HLA-DRB1\*0404* del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) humano (HLA) de clase II (Lanchbury, 1992). Las moléculas HLA de clase II, presentes en las células presentadoras de antígenos (APC), principalmente en las DC, son capaces de cargar péptidos antigénicos que son presentados a linfocitos T CD4+ auto-reactivos, lo cual ha llevado a postular que la AR es provocada por un antígeno artritogénico (Bläß et al., 1999). Aun cuando no existe consenso en la existencia de uno ó más antígenos artritogénicos, es clara la participación de proteínas endógenas tales como: proteína de unión de cartílago (Zhang et al. 1998a), dominio G1 del proteoglicano agregan (Banerjee et al., 1992; Zhang et al., 1998b), gp39 de cartílago (Cope et al., 1999), inmunoglobulinas que se unen a fragmentos Fc de otras inmunoglobulinas (factor reumatoideo) (Bläß et al., 1999), proteínas que contienen residuos aminoacídicos citrulinados (derivada de una modificación post-transduccional de la arginina) (Union et al., 2002), proteínas de shock térmico (RA33) (Steiner y Smolen, 2002), colágeno tipo II bovino (Rubin et al., 1987) y humano (Rosloniec et al., 1998; 2002), en este último caso, incluso se ha llegado a establecer las secuencias

aminoacídicas reconocidas por los linfocitos T CD4+ auto-reactivos (Rosloniec et al., 2002). Además, se ha descrito la participación de antígenos exógenos, derivados de agentes virales como gp110 del virus de Epstein Barr (Roudier et al., 1988) y proteínas de citomegalovirus (Fujinami et al., 1988).

Se ha descrito que los linfocitos T CD4+, antigénicamente activados, son los mediadores centrales de la inflamación y daño articular. A través de la secreción de interferón gamma (IFN $\gamma$ ) e IL-17 inducen la secreción por los macrófagos/monocitos de IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ . La sobre-expresión de TNF $\alpha$  e IL-1 parecerían ser vitales, tanto en el proceso inflamatorio como en la ejecución del daño articular (Brennan et al., 1992; Smolen y Steiner, 2003). Producto de la interacción de los linfocitos T CD4+ con fibroblastos sinoviales, condrocitos y osteoclastos, mediante señales promovidas por las moléculas de membrana CD69-CD11, ligando de osteoprotegerina (OPGL)-OPG y potenciada por la estimulación de la cascada de citoquinas pro-inflamatorias, se desencadena la secreción de metaloproteinasas que degradan matriz extracelular (Isler et al., 1993; Kong et al., 1999). Paralelamente, los linfocitos T CD4+ activados pueden estimular a los linfocitos B, mediante interacciones de las moléculas de superficie CD154-CD40, CD28-CD80/86, y producir inmunoglobulinas, incluido el factor reumatoideo que pudiera participar en la activación del complemento mediante la formación de complejos inmunes (Hay et al., 1991). Tanto los linfocitos T y macrófagos activados como los fibroblastos y sus productos, pueden estimular la angiogénesis, lo cual explica el aumento en la vascularidad observada en la membrana sinovial de los pacientes con AR. Las células endoteliales de la membrana sinovial son activadas, expresando moléculas de adhesión que promueven el reclutamiento de células inflamatorias en la articulación.

Recientemente el eje Th17, conformado por células T CD4+ productoras de IL-17, cuya diferenciación es dependiente de IL-6 y TGF $\beta$ , ha adquirido mayor relevancia, indicándolo como el responsable de la patogenia de la enfermedad, (Harrington et al., 2006; Iwakura e Ishigame, 2006). La expansión de la población Th17 es dependiente de

IL-23, formada por las subunidades p19 y p40, esta última compartida con IL-12. Ratones deficientes en p19, que afecta a IL-23 pero no a IL-12, o deficientes en p40 que afecta a ambas citoquinas, son resistentes al desarrollo de la artritis inducida por colágeno (CIA) y encefalitis autoinmune experimental (EAE), y expresan niveles de células productoras IFN $\gamma$  (Th1) similares a los expresados por los ratones “wild type”. Además, en el caso de CIA, los ratones deficientes en p35, que afecta a IL-12 pero no a IL-23, permanecen susceptibles a la enfermedad (Cua et al., 2003; Harrington et al., 2005). Por último, los ratones deficientes en IL-17 muestran atenuación de la inflamación articular (Nakae et al., 2003) y el tratamiento con anticuerpos neutralizantes anti-IL-17, disminuye la severidad de la enfermedad (Lubberts et al., 2004; Koenders et al., 2005).

## **1.2. Las células dendríticas.**

Las DC se generan en la médula ósea a partir de progenitores mieloides y linfoides, los que se localizarán en potenciales sitios de entrada de antígenos, donde se diferencian localmente en DC inmaduras (Ardavín et al., 2004). En un estado normal (“steady state”) en ausencia de inflamación, las DC residen como APC intersticiales en la mayoría de los tejidos periféricos, con excepción de la cornea. Las DC inmaduras internalizan antígenos exógenos eficientemente y exhiben una baja capacidad de estímulo para los linfocitos T vírgenes. Durante un proceso inflamatorio, la maduración de las DC periféricas es gatillada por la acción sinérgica de diferentes combinaciones de mediadores endógenos y exógenos liberados en el microambiente: (i) citoquinas pro-inflamatorias como el factor estimulante de colonias granulocíticas-macrofágicas (GM-CSF), IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$  y prostaglandina E2; (ii) componentes bacterianos y virales, lipopolisacárido (LPS), motivos no metilados de citosina poli guanina (CpG), doble hebra de RNA; y la (iii) interacción con moléculas de la familia de receptores de TNF (TNFR), como CD40, receptor activador del factor nuclear- $\kappa$ B (RANK) (Morelli y Thomson, 2003). La oligomerización de los receptores de la familia de TNF (TNFR,

CD40 y RANK) y la unión de los receptores tipo Toll (TLR) 2, 4 y 9 con sus ligandos, son dos de los mecanismos que inducen la translocación nuclear del factor de transcripción NF- $\kappa$ B que es requerido para la activación de DC inmaduras, lo que les permite dirigir una respuesta inmune, y les confiere la capacidad de migrar a los órganos linfoides secundarios. Como células maduras, las DC exhiben disminución en su capacidad de endocitar antígenos extracelulares, pero adquieren la capacidad de traslocar a la membrana plasmática péptidos asociados a moléculas MHC clase I y II. Adicionalmente, sobre-expresan moléculas co-estimuladoras para linfocitos T como CD80, CD86, OX40L e ICOS, junto con moléculas de adhesión intercelular (CD54, CD58), requeridas para la interacción física con los linfocitos T para el ensamblaje de la sinapsis inmunológica, aumentando también la expresión de receptores de quimioquinas (CCR7). Todo esto se traduce en que las DC maduras son células capaces de activar con alta eficiencia, tanto a linfocitos T vírgenes y de memoria, siendo capaces de estimular la migración de los linfocitos T a áreas específicas en los tejidos linfoides secundarios, en respuesta al ligando de CCR7 (CCL21) y CCL19 o la proteína inflamatoria macrofágica (MIP)-3 $\beta$  (Morel et al., 2003; Steinman et al., 2003; Morelli y Thomson, 2003).

### **1.3. Las células dendríticas en autoinmunidad y en artritis reumatoide.**

Claramente, si los mecanismos de tolerancia tímicos o centrales fallan, los linfocitos T con alta avidéz y afinidad por un auto-antígeno sobreviven y pueden ser reclutados en casos de autoinmunidad. Varios hallazgos sugieren que las DC juegan un rol importante en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes, ya que son las únicas APC profesionales, capaces de provocar enfermedades autoinmunes. Es así como la transferencia de DC, aisladas de donantes con enfermedades autoinmunes, propagadas *in vitro* bajo condiciones que inducen su maduración, generan una fuerte respuesta Th1, que eventualmente puede desencadenar una enfermedad autoinmune (Bayry et al., 2004). Esta capacidad se restringe a DC que se exponen a potentes estímulos de

maduración en presencia de abundantes auto-antígenos. El entendimiento del rol de las DC en enfermedades autoinmunes, en parte, viene del análisis directo de estas APC en tejidos de sujetos con enfermedades autoinmunes. Las DC están presentes en alto número en el suero y líquido sinovial de pacientes con AR, artritis juvenil crónica, psoriasis, diabetes, tiroiditis y síndrome de Sjögren. Además, la presencia de altos niveles de DC circulantes, secretoras de citoquinas pro-inflamatorias, se ha asociado con esclerosis múltiple (Thomas y Lipsky, 1996; Morhenn, 1997; Drakesmith et al., 2000; Quadbeck et al., 2002).

Se ha propuesto que las DC juegan un papel importante tanto en la iniciación como en la perpetuación de la AR, a través de la presentación de antígenos artritogénicos a células T auto-reactivas (Summers et al., 1995; Thomas y Lipsky, 1996a; 1996b). Se ha postulado que estas DC activan a los linfocitos T infiltrantes, siendo esta activación suficiente para conducir a la inflamación orgánica y la enfermedad (Thomas y Quinn, 1996; Thomas, 1998; Pettit y Thomas, 1999). También se ha demostrado que el tejido sinovial de articulaciones con AR activa, se encuentra muy enriquecido en DC diferenciadas, que dada la expresión de RelB, serían eficientes APC. Estas DC generalmente se hallan interdigitando en los agregados linfoides perivasculares y probablemente, derivan de precursores de sangre periférica (Banchereau y Steinman, 1998; Ludewig et al., 1998; Dubois et al., 1999; Grouard et al., 1999; Kim et al., 1999a). La presencia de las DC *in situ* es probablemente debida tanto por la expresión local de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y CD40-L, como también por migración a través de los endotelios activados (MacDonald et al., 1997; Thomas, 1998, Ferrero et al., 1998; Randolph et al., 1998). Numerosas quimioquinas, tales como MIP-1 $\alpha$ , proteína quimiotáctica monocítica (MCP)-1 y RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted), que han demostrado participar en el reclutamiento de DC a los tejidos, han sido también detectadas en la membrana sinovial reumatoídea y es probable que participen en la marginación de DC y otros leucocitos a estos sitios inflamatorios (Szekanecz et al., 1998; Sallusto y Lanzavecchia, 1999). En el entorno

sinovial, también se ha demostrado la presencia de señales de sobrevida para las DC, lo cual puede resultar en periodos de vida anormales para las DC del tejido sinovial reumatoide, contribuyendo a la naturaleza crónica de la respuesta (Sallusto y Lanzavecchia, 1999). Lo anterior, podría relacionarse con evidencias que indican que las células T sinoviales tienen menor probabilidad de sufrir apoptosis. El aumento de la sobrevida de la DC, contribuye a un aumento de la celularidad en las articulaciones inflamadas, jugando un importante rol en la perpetuación del daño articular (MacDonald et al., 1997; Schirmer et al., 1998; Nishioka et al., 1998; Summers et al., 1999).

En 1994 Thomas describió DC maduras en el sinovio de enfermos con AR, esta observación inicial fue seguida por numerosos reportes que caracterizaban las poblaciones de DC en el sinovio y que daban cuenta de diferencias fenotípicas con respecto a las DC de individuos sanos. Es así que al caracterizar las DC en tejido sinovial de individuos con AR, estas células mostraron expresar altos niveles de Jak3, STAT4 y STAT6, lo que se correlacionó además, con la presencia del factor reumatoideo en el suero de estos individuos. Estas DC no correspondían a un solo subtipo, encontrándose tanto DC mieloides como plasmocitoides, en etapas de maduración, o bien, como células maduras productoras de IL-12 (Walker et al., 2007).

#### **1.4. Interleuquina 10.**

El gen de IL-10 humano, que codifica un homodímero con una masa molecular de 37 kDa, se localiza en el cromosoma 1 y está compuesto de 5 exones. Cada monómero consta de 160 aminoácidos. La actividad de IL-10 es mediada por su receptor específico, IL-10R, compuesto de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  y que se expresa en una variedad de células, especialmente en las células del sistema inmune (Zhang y Wang, 2006). La interacción IL-10/IL-10R activa las tirosinas kinasas Jak1 y Tyk2, e inhibe la actividad de NF- $\kappa$ B, dando como resultado la activación transcripcional de varios centenares de genes. La activación de la expresión génica de IL-10 es dependiente de STAT3 (Pestka et al., 2004). IL-10 también inhibe la expresión de muchos genes inducidos por LPS, incluyendo citoquinas pro-inflamatorias como el TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Aunque el mecanismo exacto por el cual IL-10 inhibe la expresión de genes pro-inflamatorios aún no ha sido definido, los efectos inhibitorios de la IL-10 también parecen ser dependiente de STAT3 (Donnelly et al., 2004).

La IL-10 es producida por macrófagos, DC, linfocitos B, y varios subtipos de linfocitos T CD4+ y CD8+. Aunque inicialmente se caracterizó por regular la respuesta de células T, muchos de los efectos de la IL-10 en la función de las células T y NK se conoce ahora que son indirectos, ya que el efecto de la IL-10 es sobre el sistema monocito-macrofágico. Por lo tanto, la IL-10 inhibe la expresión de las moléculas MHC clase II y las moléculas coestimuladoras B7-1/B7-2 en monocitos y macrófagos, limitando la producción de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo IL-1 e IL-6, IL-12, IL-18, and TNF $\alpha$  (Couper et al., 2008).

Los efectos inmunomodulatorios de IL-10 sobre las APC, en particular las células de Langerhans se reportaron tan pronto fue descubierta esta citoquina, a fines de los años 80s. Es así como los primeros trabajos describieron que la IL-10 prevenía la generación de DC humanas a partir de precursores CD14+ *in vitro*, cuando se agregaba al inicio del cultivo en presencia de GM-CSF e IL-4 o IL-13. Por otra parte, cuando se agrega esta citoquina después de 5 o 7 días de cultivo, junto con el estímulo de

maduración, como lo es una mezcla de citoquinas pro-inflamatorias o LPS, el fenotipo de DC se mantiene, pero no se observan aumentos en la expresión de moléculas MHC, moléculas co-estimuladoras y de adhesión, además la producción de citoquinas inducidas por LPS está disminuida (Steinbrink et al., 1997; McBride et al., 2002). Un aspecto importante, en contraste a las DC inmaduras, es que las DC tratadas con IL-10 son resistentes a la maduración, muestran alta expresión de algunos miembros de la familia de moléculas B7, las moléculas inhibitorias ILT2 e ILT3, y son bajas secretoras de citoquinas inflamatorias (Steinbrink et al., 1997; Adler y Steinbrink, 2007).

También, la IL-10 puede actuar directamente en las células T CD4+, inhibiendo la proliferación y la producción de IL-2, IFN $\gamma$ , IL-4, IL-5 y TNF $\alpha$ . Entonces, la IL-10 puede regular directamente la respuesta innata y adaptativa Th1 y Th2, limitando la activación de las células T y su diferenciación en el nódulo linfático, así como también suprimiendo la respuesta pro-inflamatoria en tejidos (Moore et al., 2001; Couper et al., 2008).

En cuanto a la expresión de esta citoquina o su receptor en pacientes AR, se ha descrito una deficiencia del receptor de IL-10R $\alpha$  (IL-10R $\alpha$ ) en el tejido sinovial en enfermos AR, particularmente bajo la membrana basal y en la superficie de los fibroblastos, los cuales son incapaces de aumentar la expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-10R en respuesta al microambiente inflamatorio (Neidhart et al., 2005). Por otra parte, un estudio previo, demuestra que DC de fluido sinovial, provenientes de pacientes con AR, no expresan en forma constitutiva el mRNA de IL-10R $\alpha$  o cantidades detectable de proteínas de superficie. Esta deficiencia parece ser específica para el microambiente sinovial que se da en la AR, debido a que la expresión del mRNA de IL-10R $\alpha$  en células de sangre periférica se ha encontrado dentro de los rangos normales (Cairns et al., 2003).

### **1.5. Las DC en la tolerancia inmunológica.**

Las DC participan en la inducción y mantención de la tolerancia periférica, debido a que el proceso de deleción intra-tímico de timocitos auto-reactivos es incompleto y una proporción de células T auto-reactivas escapan a la selección negativa. Algunos auto-antígenos no tienen un acceso constante al timo, debido a que se expresan en etapas tardías del desarrollo (durante la pubertad), se producen transitoriamente (durante la preñez), o están secuestrados en tejidos periféricos (proteína básica de mielina). Entonces, un mecanismo efectivo de tolerancia periférica debe monitorear e inactivar y/o deleccionar cualquier linfocito T auto-reactivo en circulación, en tejidos periféricos, y en tejidos linfoides secundarios (Steinman y Nussenzweig, 2002; Morelli y Thomson, 2003).

Diferentes modelos se han propuesto para explicar el mecanismo por el cual las DC pueden inducir y mantener la tolerancia periférica de las células T. Éstos se basan en el hecho de que bajo “steady-state”, en ausencia de señales de inflamación, la ingesta de antígenos por parte de las DC inmaduras se traduciría en baja expresión en la superficie celular de moléculas MHC y moléculas co-estimuladoras, lo que podría inducir tolerancia a esos péptidos presentados a linfocitos T antígeno-específicos. Esta predicción se basa en el hecho que la unión del receptor de la célula T (TCR) del linfocito virgen al complejo MHC-péptido en la APC, en ausencia o baja expresión de moléculas co-estimuladoras lleva a anergia y/o apoptosis de los linfocitos antígeno-específicos, o bien, a la generación de linfocitos T con función reguladora (Tregs). En este modelo, las DC inmaduras transportan antígenos propios continuamente desde los tejidos periféricos a los nódulos linfáticos y el bazo. Estas DC migratorias de estado normal, se han denominado como DC semi-maduras; se caracterizan porque migran espontáneamente desde la periferia y pueden exhibir bajo nivel de expresión en su superficie de MHC, moléculas co-estimuladoras y moléculas de adhesión, bajo nivel de citoquinas pro-inflamatorias, producción de IL-10 y ausencia de síntesis de IL-12p70 bio-activa. Las DC periféricas residentes aisladas del tracto respiratorio y placas de

Peyer sintetizan bajos niveles de IL-12p70, alta concentración de mRNA de IL-10, son capaces de estimular débilmente a los linfocitos T y diferenciarlos en un tipo “Th2-like” *in vitro*. El mecanismo por el cual estas DC semi-maduras pueden inducir tolerancia específica no se conoce del todo, se sugiere que más de un mecanismo puede estar involucrado. Se ha demostrado que es posible generar células CD4+ *in vitro*, con características de Tregs (baja capacidad de proliferación, secreción de IL-10 y capacidad de inhibir la proliferación aloantígeno-específica de otras células T), después de estimular en forma repetida linfocitos T CD4+ vírgenes con DC alogénicas inmaduras (Jonuliet et al., 2000).

Durante la última década, numerosos estudios han revelado los mecanismos por los cuales diferentes subtipos de DC inducen o mantienen la tolerancia *in vivo*. Algunos de esos mecanismos se han utilizado para la generación de DC tolerogénicas *in vitro*, las cuales tendrían el potencial de inducir tolerancia con propósitos terapéuticos. Las DC tolerogénicas se podrían definir como aquellas células que cumplan con los siguientes requisitos: capacidad de adquirir y presentar antígenos a linfocitos T específicos, baja expresión de moléculas MHC y de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86, baja producción de IL-12 y alta expresión de IL-10 e indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), resistencia a la maduración mediada por señales de peligro como las proteínas del grupo 1 de alta movilidad (HMGB1), receptores del tipo Toll (TLR) o unión con CD40L. Además, la capacidad de generar, seleccionar y expandir células T reguladoras naturales o adaptativas, con capacidad de migrar a áreas T en tejidos linfoides secundarios, a través de la expresión en superficie de receptores de quimioquinas (como CCR7), y por último, capacidad de sobrevivir *in vivo*, mediante resistencia a muerte mediada por células NK (Morelli y Thomson, 2007).

Con respecto a CCR7, constantemente hay captura de auto-antígenos en los tejidos periféricos, pequeñas cantidades de DC semi-maduras continuamente viajan a los nódulos linfáticos para tolerizar células T específicas, potencialmente auto-reactivas para los antígenos de los tejidos presentados. CCR7 parece ser de crucial importancia

para esta migración homeostática de DC semi-maduras. Mientras las DC inmaduras carecen de expresión de CCR7, las DC semi-maduras de piel son parcialmente CCR7+, lo que indica una espontánea regulación positiva de este receptor en una subpoblación de DC semi-maduras tejido residentes, las cuales se encuentran en ausencia de señales inflamatorias (Worbs y Förster, 2007).

Diversas estrategias se han utilizado para generar DC *in vitro*, con propiedades tolerogénicas tanto en humanos como en ratones, estas incluyen protocolos en los cuales se utilizan citoquinas con propiedades inmunosupresoras como IL-10 o TGF $\beta$  (Steinbrink et al., 1997; Morelli y Thomson, 2003). También se ha utilizado TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ,  $\beta$ 2 microglobulina (Xie et al., 2003) y neuropéptidos como el péptido intestinal vaso-activo (VIP) (Gonzalez-Rey et al., 2007). Otras aproximaciones utilizan drogas inmunosupresoras como dexametasona, mitomicina C, ciclosporina A, ácido micofenólico y derivados del ácido acetilsalicílico (Hackstein y Thomson, 2004), inhibidores de NF- $\kappa$ B y vitaminas D3, C o E (Hewison et al., 2003). La ingeniería genética de DC también se ha utilizado para dirigir la expresión de IL-10 y/o TGF $\beta$  (Gorczyński et al., 2000; Moore et al., 2004), también se ha utilizado el receptor soluble de TNF $\alpha$  (Wang et al., 2006), CTLA-4 intracelular (Tan et al., 2005), ICOS-Ig murino (Wang et al., 2004) o alterando la vía de activación de NF- $\kappa$ B (Tomasoni et al., 2005; Calder et al., 2003).

En cuanto al uso de IL-10, el tratamiento de DC inmaduras con IL-10 genera DC semi-maduras que expresan bajos niveles de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86), marcadores de maduración (CD83) y moléculas de presentación antigénica (HLA-DR). Un hecho importante es que el estado de inmadurez de las DC diferenciadas en presencia de IL-10, no es revertido por estímulos inflamatorios, tales como LPS (Steinbrink et al., 1997; Adler y Steinbrink, 2007). También se ha informado de la capacidad de estas DC tolerogénicas de generar *in vitro* una población de linfocitos T con capacidad reguladora, que se caracterizan por ser productores principalmente de IL-

10 (no así de  $IFN\gamma$ ), poseen baja capacidad de proliferación y suprimen la proliferación de otras poblaciones de linfocitos T en forma antígeno-específica (Jonuleit et al., 2000).

### **1.6. Modelo experimental de artritis reumatoide.**

Uno de los modelos experimentales de AR, es el modelo murino de artritis inducida por colágeno tipo II (CIA), muy similar a la AR humana. Al igual que la AR, CIA es una enfermedad autoinmune y la susceptibilidad está ligada a alelos MHC clase II específicos ( $H2^r$  y  $H2^q$ ) (Brand et al., 2003). Este modelo se caracteriza por la inflamación de varias articulaciones, acompañada por hiperplasia sinovial, infiltración de células mononucleares, formación de pannus y destrucción del cartílago y del hueso subcondral. La enfermedad es gatillada mediante la inmunización de ratones, genéticamente susceptibles, con colágeno tipo II (bovino, humano) en coadyuvante de Freund completo (CFA) (Courtenay et al., 1980). En nuestro laboratorio, recientemente se ha publicado un trabajo realizado en ratones DBA1/lacJ ( $H2^q$ ), en los cuales después de inducir CIA se modula la severidad de la enfermedad utilizando DC con capacidad tolerogénicas, cargadas con colágeno tipo II, estas células son moduladas con LPS por un periodo de 4 horas, y se observa el efecto de estas DC en cuanto a la disminución de la sintomatología clínica de la enfermedad (Salazar et al., 2007).

### **1.7. DC en enfermedades autoinmunes.**

En cuanto a estudios realizados para generar DC, a partir de sangre periférica de individuos con enfermedades autoinmunes, los resultados son variables. Es así como al generar DC a partir de monocitos de sangre periférica de pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE), estas células muestran un fenotipo anormal, caracterizado por diferenciación acelerada, maduración y secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Entre otras anomalías se describe alta expresión del marcador de diferenciación CD1a, de los marcadores de maduración CD86, CD80 y HLA-DR, y de la citoquina pro-inflamatoria IL-8, por lo que se concluye que las DC mieloides de pacientes con SLE

muestran cambios significativos en el fenotipo, lo cual promueve una función aberrante de las células T, contribuyendo a la patogenia de la enfermedad (Ding et al., 2006). Al contrario, DC generadas a partir de monocitos de sangre periférica de pacientes con esclerosis múltiple (MS), y moduladas con IL-10, al igual que las DC inmaduras expresan bajos niveles de HLA-DR, CD86, CD80 y CD83; producen bajas cantidades de IL-12p70, IL-12p40, IL-6 y TNF $\alpha$  y son resistente a la maduración por LPS. Es así, que en este estudio se concluyó que no existen diferencias entre el fenotipo y perfil de citoquinas de DC obtenidas a partir de individuos con MS y controles sanos (Adikari et al., 2004).

En cuanto a la caracterización de las DC en pacientes AR, las DC se han identificado en líquido y tejido sinovial de pacientes por varios grupos durante los últimos 15 años, y su origen, función y potencial papel en la patogénesis no son plenamente entendidos. Uno de los primeros informes describe una población de DC maduras (CD33+, CD14-) presentes en el sinovio inflamado, con un fenotipo plenamente diferenciado que expresa altos niveles de MHC clase I y II, y de moléculas co-estimuladoras para linfocitos T. En vista de estas observaciones los autores sugieren que estas DC maduras podría ayudar a perpetuar la inflamación por la activación de células T auto-reactivas presentes en el sinovio reumatoideo. Este informe fue sólo el comienzo de una serie de estudios que investigaron el papel de la DC en las enfermedades reumáticas (Lebre y Tak, 2008), los estudios posteriores son descriptivos, definiendo el estado de activación y madurez de las DC que infiltran las articulaciones (Santiago-Schwarz et al., 2001; Walker et al., 2007; Lebre y Tak, 2008).

En base a lo expuesto anteriormente, en cuanto a la capacidad de generar DC con propiedades tolerogénicas mediante el uso de IL-10, y los estudios realizados generando DC a partir PBMC de individuos con enfermedades autoinmunes, con el desarrollo de esta Tesis se pretende demostrar que es posible generar DC a partir PBMC de pacientes con AR y además, que estas DC pueden ser moduladas mediante el uso de IL-10 para

que adquieran propiedades tolerogénicas, lo cual a futuro podría contribuir al desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad.

## **2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.**

### **2.1. Hipótesis.**

“Es posible producir células dendríticas con características tolerogénicas a partir de células mononucleares de sangre periférica de individuos con artritis reumatoide, mediante su cultivo en presencia de IL-10”.

### **2.2. Objetivo general.**

Generar y evaluar *in vitro* la capacidad inmunomoduladora de células dendríticas con características tolerogénicas producidas con IL-10 en pacientes con artritis reumatoide.

### **2.3. Objetivos específicos.**

2.3.1. Generar células dendríticas a partir de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide.

2.3.2. Caracterizar fenotípicamente las células dendríticas generadas *ex vivo*, mediante el cultivo en presencia de IL-10, a través de la expresión de marcadores de membrana por citometría de flujo y morfológicamente mediante microscopía confocal.

2.3.3. Evaluar las células dendríticas tratadas con IL-10 *in vitro*, en relación al patrón de citoquinas secretadas.

2.3.4. Evaluar las células dendríticas tratadas con IL-10 *in vitro*, mediante ensayos funcionales en cuanto a su capacidad fagocítica y alo-estimuladora.

### **3. MATERIALES Y METODOS.**

#### **3.1. Pacientes.**

Para este estudio se reclutaron cuatro pacientes con artritis reumatoide (AR) desde la cohorte de pacientes que mantiene la Sección de Reumatología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Éstos fueron informados por el médico tratante (Dr. Miguel Cuchacovich y Dra. Francisca Sabugo) y firmaron un consentimiento informado.

**3.1.1. Criterios de inclusión:** Individuos mayores de 18 años que cumplieran los criterios del American College of Rheumatology (ACR) (Arnett et al., 1988) para AR, que presentaran enfermedad activa a pesar del tratamiento con drogas anti-reumáticas modificadoras de la enfermedad (DMARDs), definido por la presencia de 6 ó más articulaciones inflamadas, 9 ó más articulaciones dolorosas, rigidez matinal mayor de 45 minutos, y velocidad de sedimentación hemática (VHS) mayor o igual a 28 mm/h (Hochberg et al., 1992).

**3.1.2. Criterios de exclusión:** Conocimiento de participación en otra investigación de terapias biológicas (uso de anticuerpos quiméricos o humanizados anti-TNF $\alpha$ ), enfermedades linfoproliferativas en cualquier etapa de su evolución, compromiso articular debido a enfermedad distinta de la AR, enfermedades cardiovasculares, insuficiencia renal (valores de creatinina >2 mg/dl), diabetes mellitus, infección por VIH, embarazo o lactancia. Como se utilizan volúmenes de sangre cercanos a 1 unidad (aproximadamente 450 ml de sangre) para generar las células dendríticas (DC), los individuos no fueron mayores de 65 años, con peso corporal menor de 50 kg, valores de hemoglobina menores a 12,5 g/dl, o personas con cirugía reciente.

### **3.2. Generación de células dendríticas a partir de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide.**

Se generaron DC a partir de concentrados leucocitarios provenientes de pacientes con AR. Éstos se produjeron en colaboración con el Dr. Milton Larrondo, Director del Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Para ello, los pacientes con AR reclutados, acudieron a donar una unidad de sangre a esta Sección. Además, se generaron DC a partir de concentrados leucocitarios provenientes de donantes sanos (n=2) obtenidos también en el Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron mediante separación con Ficoll-Hypaque (Axis-Shield, Oslo, Noruega), las que en número de  $30 \times 10^6$  se incubaron en medio AIM-V (Gibco, USA) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas en una placa de 6 pocillos (Falcon, USA). Las células no adherentes se removieron y las adherentes se incubaron en medio AIM-V (Gibco, USA) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 7 días con 500 U/ml de rhIL-4 (R&D System, USA) y con 800 U/ml de rhGM-CSF (Schering Plough, Irlanda). Para generar DC tolerogénicas, al día 5 se agregó al medio 600 U/ml de IL-10 (ProSpec-Tany TechnoGene LTD, Israel). Como controles se utilizaron DC tratadas con medio, IL-10 + 1µg/ml de lipopolisacárido (LPS) (Sigma, USA) (día 6) y células tratadas con 1µg/ml de LPS el día 6, todas las células se recuperaron al día 7.

**3.3. Caracterizar fenotípicamente las células dendríticas generadas *ex vivo*, mediante el cultivo en presencia de IL-10, a través de la expresión de marcadores de membrana por citometría de flujo y morfológicamente mediante microscopía confocal.**

### **3.3.1. Evaluación fenotípica:**

Al día 7 de cultivo las DC tratadas con IL-10, medio, IL-10 + LPS, y LPS se recuperaron, posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, se lavaron una vez con PBS 1x y luego se bloquearon los receptores Fc con PBS/Plasma humano al 10% por 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron dobles tinciones para CD11c-PE/CD83-FITC, CD11c-PE/CD86-FITC, CD11c-PE/CD40-FITC, CD11c-PE/MHC II-FITC y CD11c-PE/CCR7-FITC (eBioscience, USA), además de una tinción sólo con CD11c-PE (eBioscience, USA), para determinar el porcentaje de células positivas para este marcador al final del cultivo y cuantificar el rendimiento. Finalmente, las células se lavaron y fijaron en 100 µl de PBS 1x/BSA al 1%/paraformaldehído al 1% y se analizaron en el citómetro de flujo FACScan. Se analizaron 10.000 eventos de una región denominada R1, determinada a partir de los parámetros de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) y que correspondieron a células positivas a CD11c. El análisis de datos se realizó utilizando el programa Cell Quest.

### **3.3.2. Evaluación morfológica mediante microscopía confocal:**

Las DC y sus respectivos controles, obtenidos de acuerdo a lo descrito previamente, fueron procesadas para microscopía confocal. Así, al día 7 las DC fueron fijadas con metanol frío al 70% por 10 minutos y bloqueadas con PBS/BSA al 5% por 1 hora. Posteriormente, se incubaron toda la noche con el anticuerpo anti CD11c-PE (eBioscience, USA), diluido en PBS/BSA al 1% en una cámara húmeda a 4°C. Finalmente, las células fueron analizadas con un microscopio confocal Carl Zeiss MicroImaging en el Centro de Equipamiento y Servicios de Apoyo Tecnológico (CESAT) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### **3.4. Evaluar las células dendríticas tratadas con IL-10 *in vitro*, en relación al patrón de citoquinas secretadas.**

#### **3.4.1. Patrón de citoquinas mediante ensayos de ELISPOT:**

Un día antes del ensayo, placas de 96 pocillos de fondo plano (MAIPN1450; Millipore, Bedford, MA, USA), fueron sensibilizados con 75 µl/pocillo de anticuerpos de captura dirigidos contra las citoquinas IL-10 e IL-12 (eBioscience, USA), ajustados a una concentración de 2 µg/ml en buffer bicarbonato 0.1 M (pH 9.6) estéril e incubados toda la noche a 4°C. Al día siguiente la placa se lavó y bloqueó con PBS/BSA al 1%, posteriormente se agregaron las DC con las distintas condiciones, a una concentración de 20.000 células por pocillo, junto con 20.000 fibroblastos (transfectados con CD40L humano) por pocillo. Los cultivos se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> toda la noche. Después de la incubación, la placa se lavó y posteriormente se incubó con 1 µg/ml de un anticuerpo secundario biotinilado, específico para cada una de las citoquinas (eBioscience, USA) por 2 horas a 37°C. La placa se lavó nuevamente y se incubó con 0.5 µg/ml estreptavidina - fosfatasa alcalina (Mabtech, USA) por 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, se agregó el sustrato y los “spots”, que representan la secreción de las citoquinas, fueron contados utilizando el programa Image-Pro Plus.

#### **3.4.2. Determinación de TGFβ1 mediante citometría de flujo:**

Al día 7 de cultivo las DC tratadas con IL-10, medio, IL-10 + LPS, y LPS se recuperaron, posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, se lavaron una vez con PBS 1x y luego se bloquearon los receptores Fc con PBS/Plasma humano al 10% por 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizó primero la tinción de superficie con el anticuerpo anti CD11c-PE (eBioscience, USA) por 30 minutos en hielo, posteriormente las células se lavaron y fijaron con 100 µl de PBS 1x/BSA al 1%/paraformaldehído al 1% por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego

las células se lavaron nuevamente y se tiñeron con un anticuerpo anti TGFβ1 humano (R&D system, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron e incubaron con un anticuerpo secundario anti-Ig de ratón, teñido con fluoresceína (R&D system, USA), por 30 minutos a 4°C. Finalmente, las células se lavaron y fijaron con PBS 1x/BSA al 1%/paraformaldehído al 1% para ser luego analizadas por citometría de flujo. Como control de especificidad, se marcaron células con CD11c-PE más el anticuerpo secundario.

### **3.5. Evaluar las células dendríticas tratadas con IL-10 *in vitro*, mediante ensayos funcionales en cuanto a su capacidad fagocítica y alo-estimuladora.**

#### **3.5.1. Ensayo de endocitosis de células dendríticas utilizando dextran-FITC:**

Para medir la eficacia de la fagocitosis de proteínas, se colocó en un tubo eppendorf  $2.5 \times 10^5$  DC en 250 µl de medio AIM-V, por duplicado. Se incubaron con 30 µg de dextran-FITC, durante 2 horas a 37°C, en oscuridad. Luego las células se centrifugaron a 2000 rpm por 5 minutos, se lavaron dos veces con PBS 1x y, finalmente se fijaron con 100 µl de PBS 1x/BSA al 1%/paraformaldehído al 1%, para ser analizadas por citometría de flujo.

#### **3.5.2. Capacidad de las células dendríticas tolerogénicas de inhibir la alo-proliferación:**

DC tratadas con IL-10 y los controles tratados con medio, IL-10 + 1µg/ml de LPS y LPS, se recuperaron al día 7. Estas células se incubaron con PBMC alo-génico de individuos sanos, marcado con carboxi-fluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE) (Renovar, USA). Es importante destacar que, en esta metodología el CFSE se distribuye en forma igual entre las células hijas en cada división celular, por lo tanto nos permite examinar poblaciones específicas de células proliferantes ya que durante cada ciclo de división celular, la intensidad de fluorescencia media (MFI) se reduce a la mitad. De esta

forma la lectura en los “dot plots” se lee hacia el cuadrante superior izquierdo. Brevemente, se utilizaron 0.5  $\mu$ M de CFSE para marcar  $10 \times 10^6$  de PBMC en 1 ml de RPMI sin suero por 10 minutos a 37°C, posteriormente las células se lavaron 2 veces con PBS 1x/SFB al 10% y se incubaron con las DC a diferentes razones estimuladoras : respondedoras (1:4, 1:8 1:16, 1:32) por 5 días. Como control de la proliferación se utilizó PBMC estimulado con 3  $\mu$ g/ml de PHA. Después de recuperar las células, se marcaron con el anticuerpo anti-CD4-PE (eBioscience, USA) para posteriormente analizar las células mediante citometría de flujo. El análisis de datos se realizó utilizando el programa Cell Quest.

### **3.6. Análisis estadístico.**

Para determinar la significancia de las diferencias en la expresión de marcadores de superficie de las DC tratadas con IL-10, medio, IL-10 + LPS y LPS, los valores experimentales obtenidos en los ensayos de endocitosis, producción de citoquinas y ensayos de alo-proliferación se analizaron aplicando la prueba de ANOVA de dos vías, con corrección de Bonferroni. Se consideraron significativas aquellas diferencias con un valor de  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.001$  (\*\*\*). El análisis estadístico se realizó usando el software Prisma™.

## 4. RESULTADOS.

### 4.1a. Características demográficas de pacientes y controles.

En la Tabla 1(a) se describen las características de los pacientes AR en cuanto a la edad, sexo y tratamientos a los cuales estaban sometidos al momento de donar sangre para generar DC. En la Tabla 1(b) se detallan las características de los individuos controles sanos, en cuanto a edad y sexo.

Paciente	Edad	Sexo	Tratamiento
AR1	43	F	Celebra <sup>R</sup> , Metotrexato
AR2	50	F	Prednisona, Metotrexato
AR3	47	M	Prednisona, Metotrexato, Diclofenaco
AR4	35	F	Prednisona, Metotrexato, Meloxicam <sup>R</sup>

Celebra<sup>R</sup>: Celecoxib; Meloxicam<sup>R</sup>: Meloxicam.

**Tabla 1a:** Características demográficas de los pacientes con artritis reumatoide (AR) reclutados en este estudio.

<b>Control</b>	<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>
Control 1	39	M
Control 2	45	M

**Tabla 1b: Características demográficas de los individuos controles sanos incluidos en este estudio.**

En la Tabla 2(a) se detalla el rendimiento, en cuanto al número de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), obtenido a partir de 400 ml de sangre donada por los pacientes AR, el cual varía entre los individuos. La cantidad de DC recuperadas al día 7 de cultivo, varió entre los individuos, con un promedio de  $2,6 \times 10^6$ . En la Tabla 2(b) se detallan los mismos parámetros para los individuos controles sanos, hallándose que el promedio de DC fue de  $2,62 \times 10^6$ . Cabe señalar que no existen diferencias significativas entre los rendimientos de DC obtenidas en los pacientes AR y los controles ( $p > 0.05$ ).

<b>Paciente</b>	<b>Volumen de sangre (ml)</b>	<b>PBMC Obtenido (<math>\times 10^6</math>)</b>	<b>PBMC sembrado por placa (<math>\times 10^6</math>)</b>	<b>Número DC obtenidas (<math>\times 10^6</math>) por placa</b>
AR1	400	810	180	2.8-3.0
AR2	400	504	180	2.6-2.8
AR3	400	773	180	2.5-2.7
AR4	400	368	180	2.0-2.4

**Tabla 2a: Generación de células dendríticas a partir de concentrados leucocitarios de pacientes con artritis reumatoide (AR).** Se detalla el número de células dendríticas (DC) obtenidas al día 7 de cultivo, a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) sembradas en cada placa.

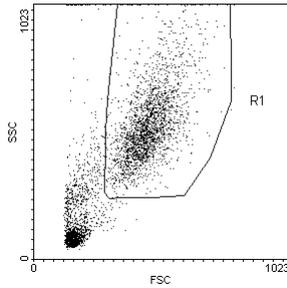
<b>Control</b>	<b>Volumen de sangre (ml)</b>	<b>PBMC Obtenido (x10<sup>6</sup>)</b>	<b>PBMC sembrado por placa (x10<sup>6</sup>)</b>	<b>Número DC obtenidas (x10<sup>6</sup>) por placa</b>
Control 1	400	470	180	2.3-2.7
Control 2	400	644	180	2.6-2.9

**Tabla 2b: Generación de células dendríticas a partir de concentrados leucocitarios de individuos controles sanos.** Se detalla el número de células dendríticas (DC) obtenidas al día 7 de cultivo, a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) sembradas en cada placa.

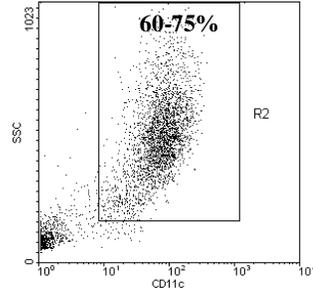
#### **4.1b. Generación de células dendríticas a partir de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide.**

En la Figura 1(a-d) se muestran “dot plots” representativos de los análisis realizados mediante citometría de flujo con las DC de pacientes AR, obtenidas al día 7 y que fueron sometidas a distintos tratamientos. Se señala la población R1 determinada a partir de los parámetros de tamaño y granularidad (a), la región R2 determinada con el marcador de lineaje CD11c y la granularidad (b). Un “dot plot” representativo, incluye a las regiones R1 y R2 (c), con el cual se analizaron las DC en los experimentos que se describen más adelante. Además, se incluyen los controles de isotipo marcados con FITC y PE (d).

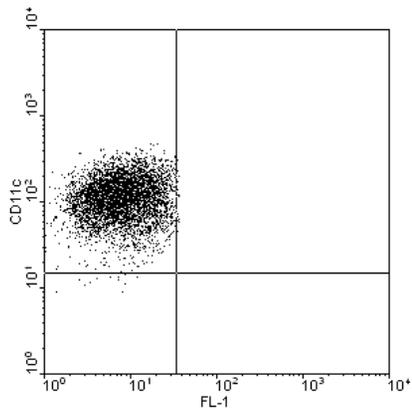
**1a.**



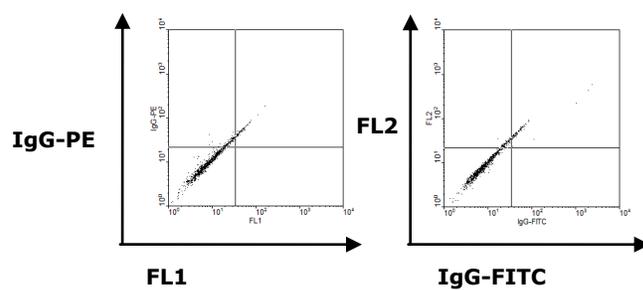
**1b.**



**1c.**



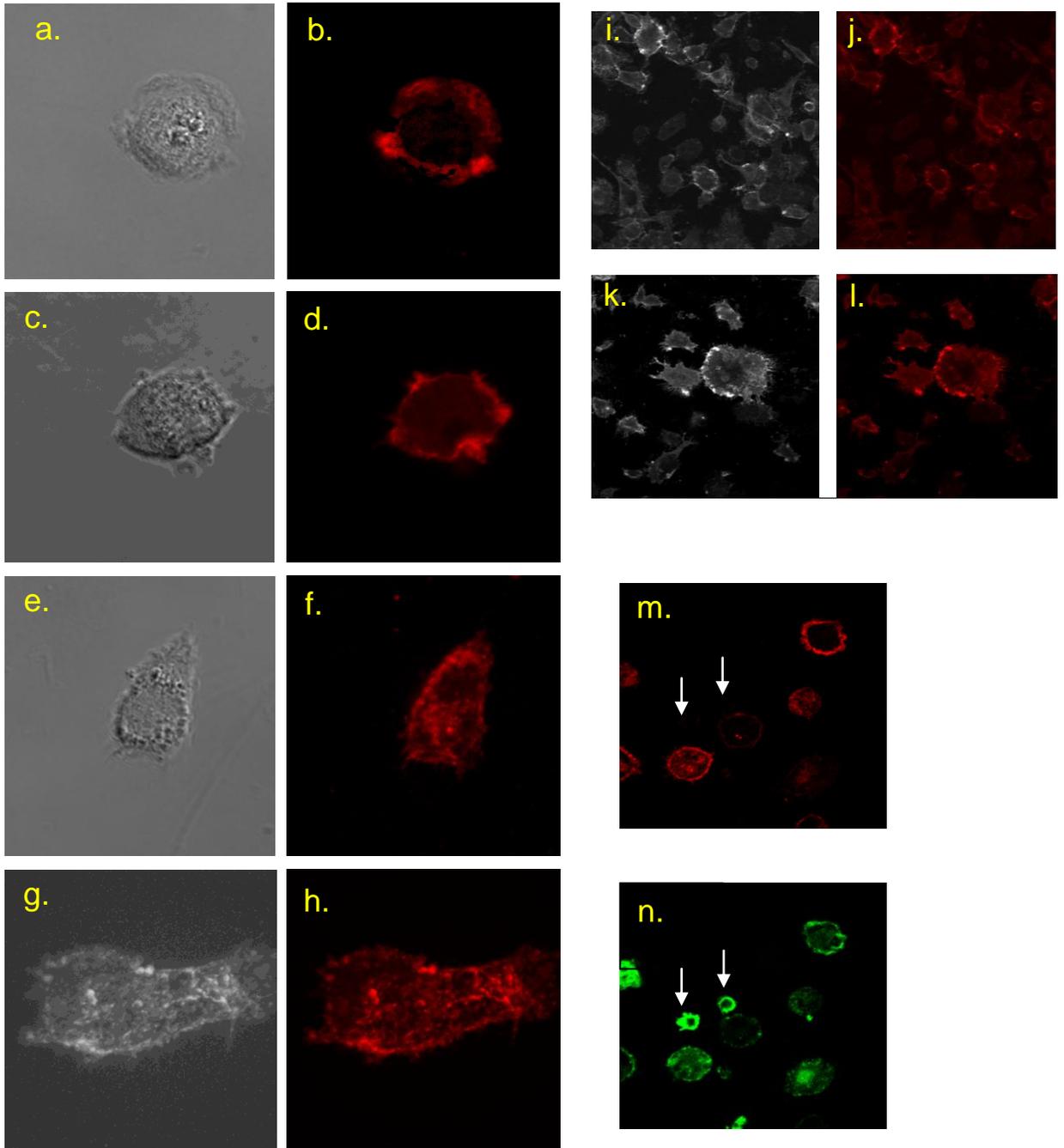
**1d.**



**Figura 1:** Dot plots representativos de las células dendríticas (DC) generadas a partir de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide. En (a) se muestra la region R1 que corresponde a las DC seleccionadas de acuerdo a las características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). En (b) se observa una región denominada R2 que corresponde a las DC seleccionadas de acuerdo al marcador CD11c y SSC. En (c) se representa el marcador CD11c seleccionado a partir de las regiones R1 y R2. En (d) se muestra los controles de isotipo, utilizando IgG control, marcada con ficoeritrina (PE) e isotiocianato de fluoresceína (FITC).

#### **4.1c. Evaluación morfológica mediante microscopía confocal.**

La Figura 2(a-j) muestra la morfología de DC teñidas con anticuerpos anti CD11c-PE, generadas *in vitro* a partir de PBMC de pacientes AR, de acuerdo a distintos tratamientos como se describe en Materiales y Métodos. En cada uno de los casos se aprecia una distribución del marcador CD11c en la superficie celular, independiente del tratamiento al cual fueron sometidas. En relación al tratamiento, se observa cambios en la morfología, de modo que las DC tratadas con sólo medio (a y b); IL-10 (c y d), IL-10 + LPS (e y f), corresponden a DC inmaduras, presentando una forma más bien redondeada. En tanto, las DC tratadas con LPS (g y h), corresponden a DC maduras, lo que es consistente con una morfología alargada y con más prolongaciones en la superficie celular. Estas mismas características morfológicas se aprecian en DC inmaduras (i, j) y maduras (k, l) de individuos controles. Con el fin de evaluar la especificidad para el marcador CD11c (i), se tiñó las mismas muestras con un anticuerpo dirigido contra moléculas MHC II, conjugado a FITC (j). Se puede apreciar que las muestras contienen tanto DC como linfocitos (j), teñidas con anti-MHC (verde), mientras CD11c-PE (rojo), sólo tiñe a las DC y no a los linfocitos (i). En estas figuras se señalan con flechas, a los linfocitos teñidos con MHC II, pero no con CD11c.

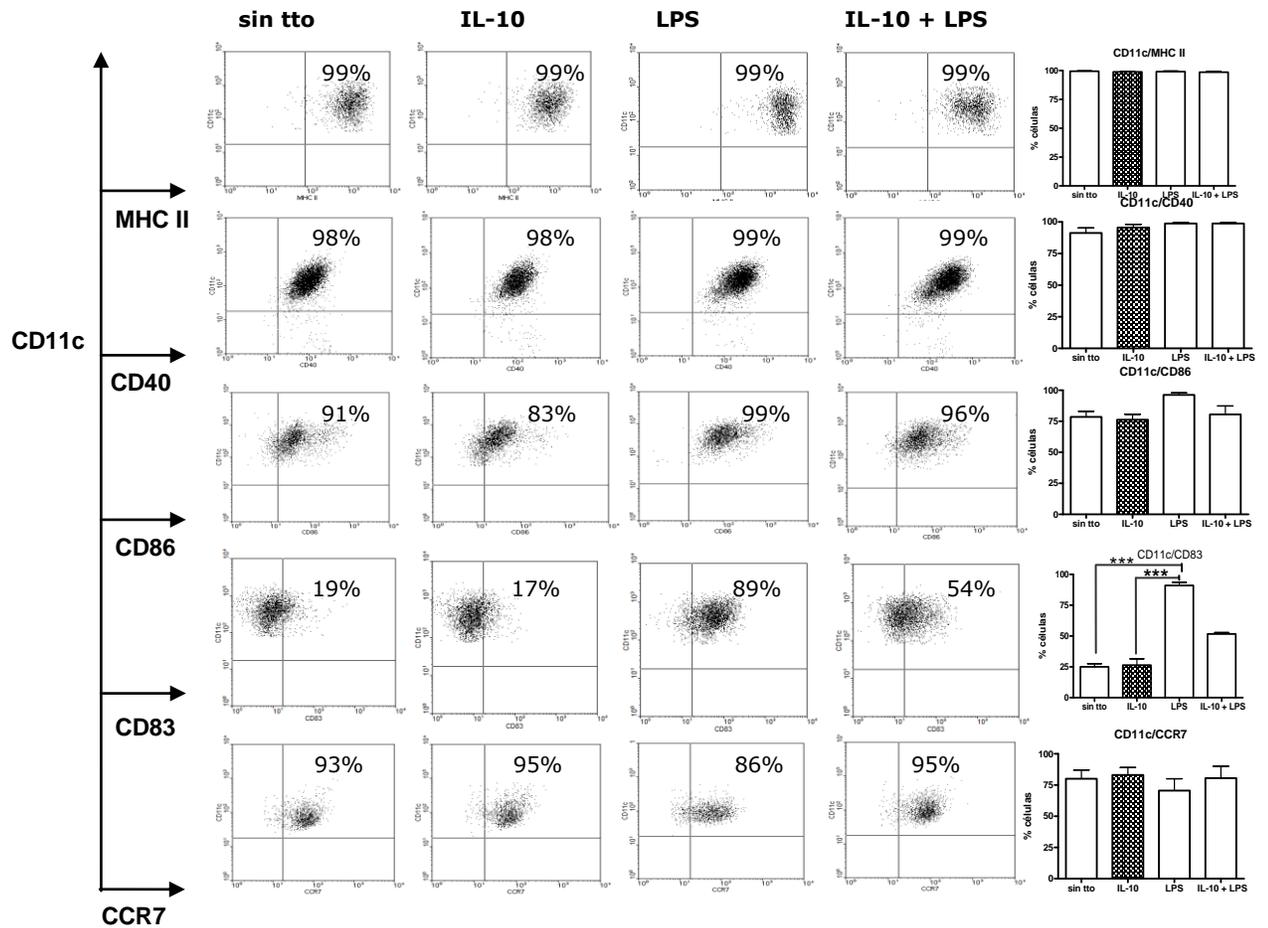


**Figura 2: Microscopía confocal de células dendríticas (DC) de pacientes con artritis reumatoide e individuos controles.** Al día 7 de cultivo, DC obtenidas de células mononucleares de sangre periférica, fueron incubadas en presencia de: Medio de cultivo (a y b); IL-10 (c y d); IL-10 + lipopolisacárido (LPS) (e y f) y LPS (g y h). Las células se tiñeron con anticuerpos anti CD11c-PE (b, d, f y h); las figuras a, c, e y g corresponden al contraste de fase. Además se incluyen figuras correspondientes a DC inmaduras (j) y DC maduras (l) de individuos controles teñidas con anticuerpo anti CD11c; las figuras i y k corresponden al contraste de fase. La especificidad para CD11c (i) se comprobó usando un anticuerpo-FITC contra moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II, presente tanto en DC como en linfocitos T y B (j). Las flechas indican una población que corresponde a linfocitos (m y n), que sólo se tiñen con anti-MHC y no con anti-CD11c.

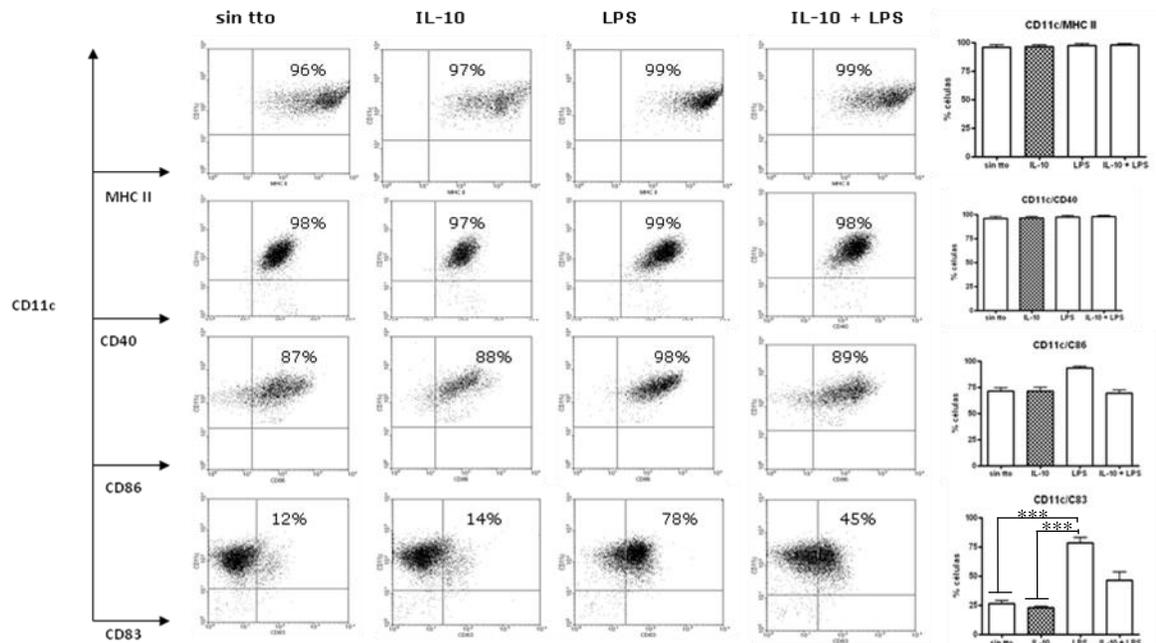
#### **4.2. Caracterización fenotípica de las células dendríticas generadas *ex vivo*, mediante el cultivo en presencia de IL-10, a través de la expresión de marcadores de membrana por citometría de flujo.**

Las DC fueron generadas a partir de PBMC de individuos AR. Las DC fueron cultivadas por 7 días en presencia de IL-4 y GM-CSF. Durante el cultivo fueron sometidas a los siguientes tratamientos: día 5, con 600U de IL-10 (IL-10); día 6, con 1µg/ml de LPS (LPS); día 5, 600U de IL-10, además de 1µg/ml de LPS, al día 6, (IL-10 + LPS). Como control se dejó DC sin tratamiento [sólo con medio de cultivo] (sin tto). Al día 7 de cultivo, mediante citometría de flujo con doble tinción, se evaluó el porcentaje de DC (CD11c+) que expresaron los siguientes marcadores: Moléculas de histocompatibilidad clásicas (MHC II); moléculas co-estimuladoras (CD86 y CD40); CD83, característico de DC activadas y, el receptor de quimioquinas CCR7, el cual dirige a las DC hacia órganos linfoides secundarios.

En la Figura 3, de los “dot plots” representativos y de los gráficos de barra se puede observar, que independiente del tratamiento que recibieron las DC, no se encontró diferencias estadísticamente significativas para los marcadores MHC II, CD40, CD86 y CCR7 ( $p > 0.05$ , en cada uno de los casos). Esta misma observación fue obtenida, cuando se analizó a individuos controles sanos (Figura 4) ( $p > 0.05$ , en cada uno de los marcadores analizados). Contrariamente, tanto en individuos AR (Figura 3) como en individuos sanos (Figura 4), las DC tratadas con IL-10 y aquellas tratadas con medio, mostraron un porcentaje significativamente menor de células doble positivas para CD11c/CD83, respecto de las DC tratadas con LPS ( $p < 0.001$ , para cada tratamiento, tanto en AR como en controles). Aunque no significativo, en los individuos AR y en los controles, el pretratamiento de las DC con IL-10, imposibilitó que un mayor porcentaje de DC expresaran CD83, como el que se logró con sólo LPS como estímulo.

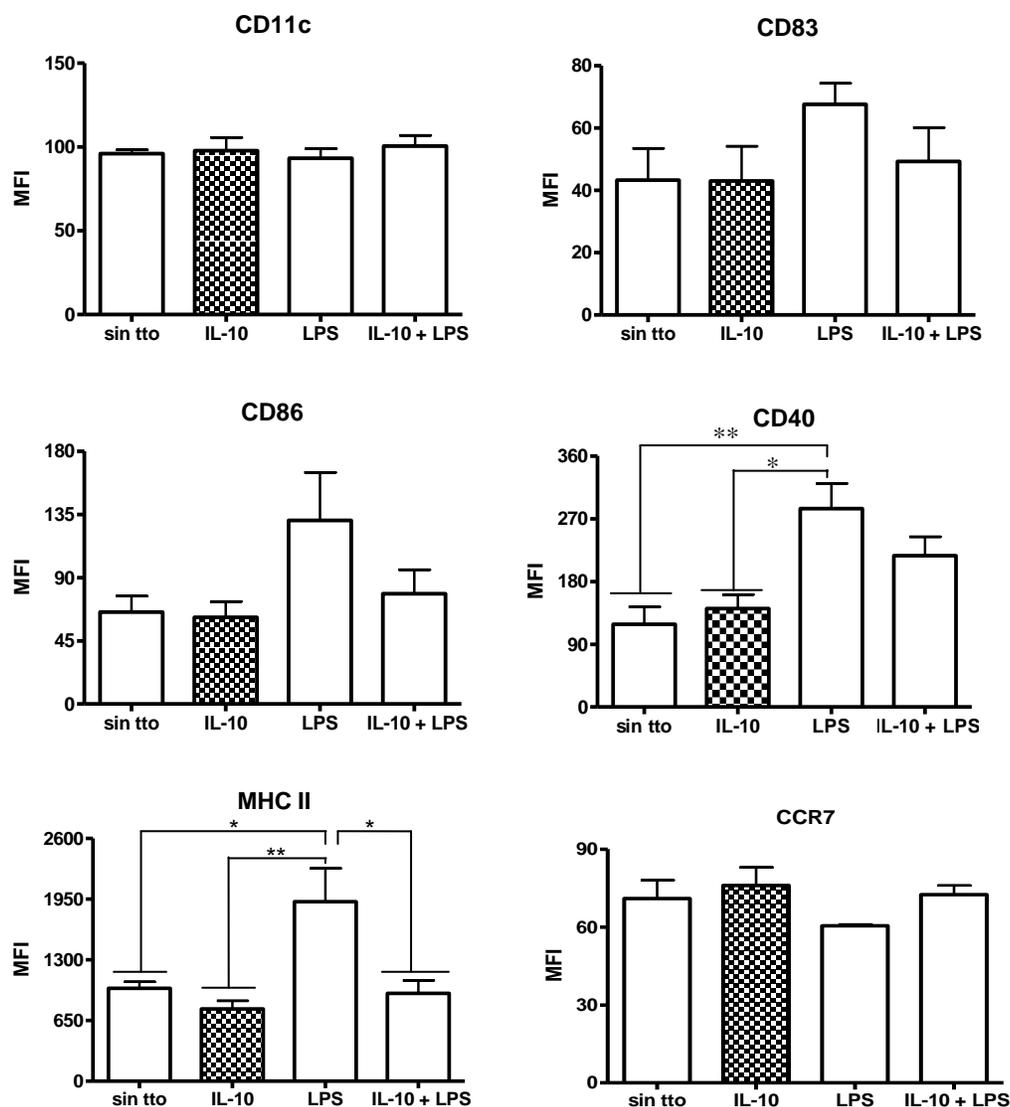


**Figura 3: Porcentaje de células dendríticas (DC) (CD11c+) expresando distintos marcadores de superficie en pacientes con artritis reumatoide (AR).** Las DC fueron generadas a partir de células mononucleares de sangre periférica de individuos AR. Las DC fueron cultivadas por 7 días en presencia de IL-4 y GM-CSF. Durante el cultivo fueron sometidas a los siguientes tratamientos: día 5, con con IL-10 (IL-10); día 6, con LPS (LPS); día 5, IL-10 y al al día 6, LPS (IL-10 + LPS). Como control se dejó DC sin tratamiento -sólo con medio de cultivo- (sin tto). Mediante citometría de flujo y doble marcación, se evaluó el porcentaje de expresión para los marcadores MHC II, CD40, CD86, CD83 y CCR7. A la izquierda se muestran “dot plot” representativos para cada uno de los marcajes, mientras a la derecha, los gráficos de barra resumen los resultados obtenidos. Las diferencias entre las DC tratadas se consideraron estadísticamente significativas a un  $p < 0.001$  (\*\*\*) .



**Figura 4: Porcentaje de células dendríticas (DC) (CD11c+) expresando distintos marcadores de superficie en individuos controles sanos.** Las DC fueron generadas a partir de células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos. Las DC fueron cultivadas por 7 días en presencia de IL-4 y GM-CSF. Durante el cultivo fueron sometidas a los siguientes tratamientos: día 5, con con IL-10 (IL-10); día 6, con LPS (LPS); día 5, IL-10 y al al día 6, LPS (IL-10 + LPS). Como control se dejó DC sin tratamiento -sólo con medio de cultivo- (sin tto). Mediante citometría de flujo y doble marcación, se evaluó el porcentaje de expresión para los marcadores MHC II, CD40, CD86 y CD83. A la izquierda se muestran “dot plot” representativos para cada uno de los marcajes, mientras a la derecha, los gráficos de barra resumen los resultados obtenidos. Las diferencias entre las DC tratadas se consideraron estadísticamente significativas a un  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

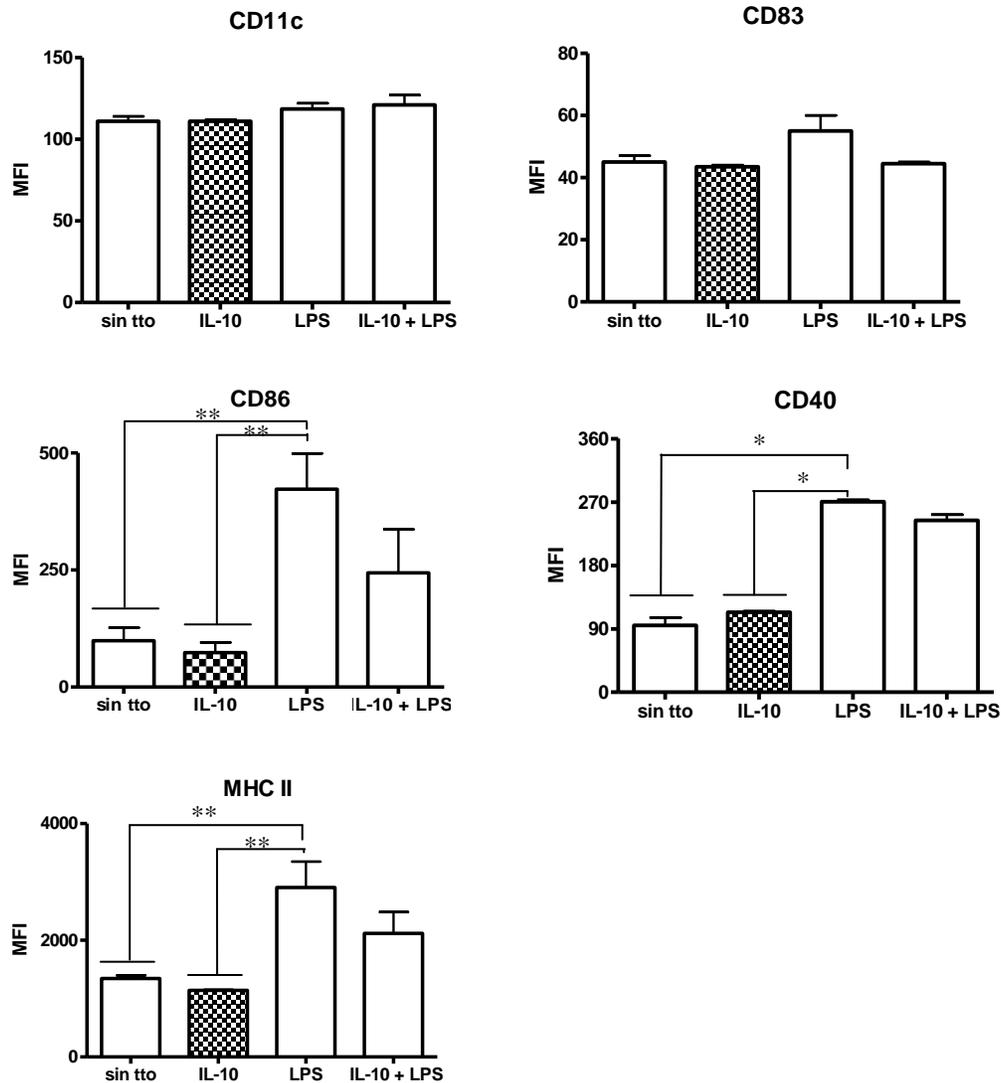
Paralelamente, en las DC generadas desde pacientes AR, al día 7 de cultivo, se evaluó la expresión (representado por el MFI) de los marcadores CD11c, CD83, CD86, CD40, MHC II y CCR7. Al analizar las DC tratadas con IL-10 (día 5), en relación a las DC tratadas con medio o IL-10 (día 5) + LPS (día 6) y LPS sólo (día 6), no se observan diferencias significativas en los niveles de expresión para los marcadores CD11c, CD86 y CCR7 ( $p > 0.05$ ) (Figura 5). En contraste a lo anterior, en la expresión de MHC II se observan diferencias marcadas entre las DC tratadas con IL-10 y las maduras con LPS ( $p < 0.01$ ) y entre las células tratadas con medio y las tratadas con LPS ( $p < 0.05$ ). Además, se observa que el efecto de IL-10 no se revierte en las DC cuando posteriormente fueron tratadas con LPS ( $p < 0.05$ ) (Figura 5). Una situación parecida se observó para CD40, en donde tanto las DC sin tratamiento como las tratadas con IL-10 mostraron menor expresión de este marcador, respecto de las DC maduras con LPS ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$ , respectivamente). Tanto la expresión de CD86 como la de CD83, mostraron un perfil similar que el observado para MHC II, sin embargo, ninguna diferencia fue significativa ( $p > 0.05$ , en cada uno de los casos y para cada uno de los marcadores).



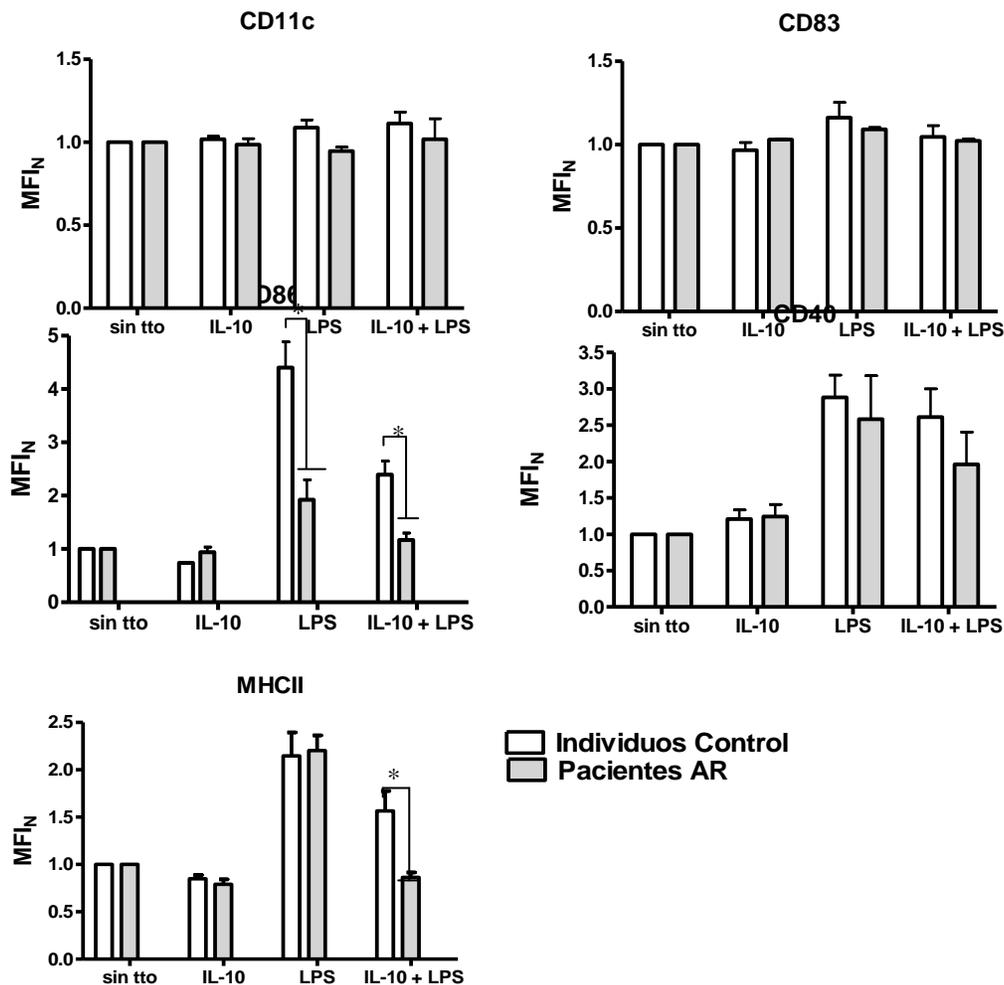
**Figura 5:** Expresión de marcadores de superficie en células dendríticas (DC) de pacientes con artritis reumatoide (AR). Las DC fueron generadas a partir de células mononucleares de sangre periférica de pacientes AR. Las DC fueron cultivadas por 7 días en presencia de IL-4 y GM-CSF. Durante el cultivo fueron sometidas a los siguientes tratamientos: día 5, con con IL-10 (IL-10); día 6, con LPS (LPS); día 5, IL-10 y al al día 6, LPS (IL-10 + LPS). Como control se dejó DC sin tratamiento -sólo con medio de cultivo- (sin tto). Mediante citometría de flujo se evaluó la expresión (intensidad media de fluorescencia -MFI-) para los marcadores CD11c, CD83, CD86, CD40, MHC II y CCR7. Los resultados representan promedios de datos obtenidos para 4 pacientes AR. Las diferencias entre los valores de MFI se consideraron estadísticamente significativas a un  $p < 0.05$  (\*) o  $p < 0.01$  (\*\*).

La evaluación de expresión de los marcadores CD11c, CD83, CD86, CD40 y MHC II, en DC generadas desde individuos controles sanos, no mostró diferencias significativas (representado por el MFI) para los marcadores CD11c y CD83 ( $p > 0.05$ ) (Figura 6). A diferencia de lo anterior, la expresión de CD86 y MHC II mostró diferencias marcadas entre las DC tratadas con IL-10 y las maduras con LPS ( $p < 0.01$ ) y entre las células tratadas con medio y las tratadas con LPS ( $p < 0.01$ ). Un perfil muy parecido mostró la expresión de CD40, ya que tanto las DC sin tratamiento como las tratadas con IL-10 mostraron una menor expresión, respecto de las DC maduras con LPS ( $p < 0.05$ , en ambos casos).

Al comparar los resultados de DC de pacientes con los obtenidos con individuos sanos, bajo las mismas condiciones experimentales, no se observó diferencias significativas en los niveles de expresión (representado por el MFI) para los marcadores CD11c, CD83, y CD40, en relación a los distintos tratamientos (Figura 7) ( $p > 0.05$ , en cada uno de los casos). En cambio, para CD86 se observó una expresión significativamente superior en las DC provenientes de individuos controles, comparada con la expresión observada en aquellas de pacientes AR, tanto frente al tratamiento con LPS ( $p < 0.05$ ) como con IL-10+LPS ( $p < 0.05$ ). Para MHC II, las DC tratadas con IL-10+LPS provenientes de pacientes AR, mostraron una expresión disminuida de este marcador, respecto de las DC de individuos controles ( $p < 0.05$ ) (Figura 7).



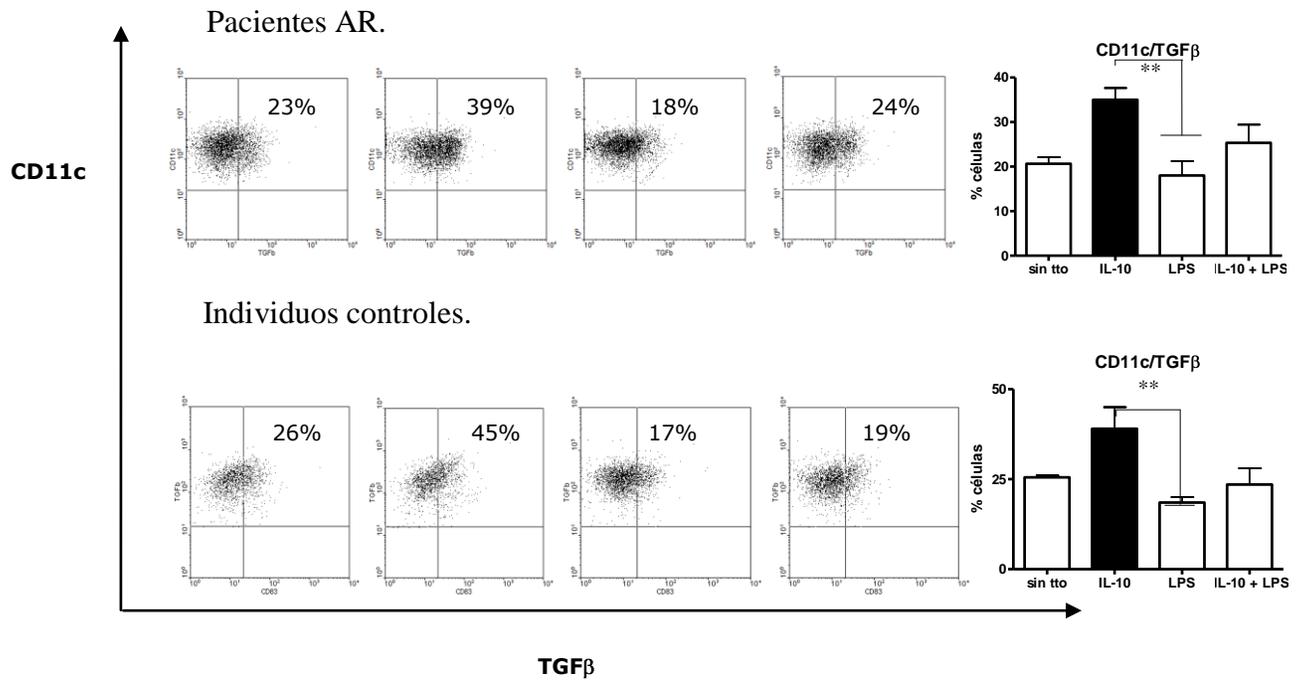
**Figura 6: Expresión de marcadores de superficie en células dendríticas (DC) de individuos controles sanos.** Las DC fueron generadas a partir de células mononucleares de sangre periférica de individuos controles. Las DC fueron cultivadas por 7 días en presencia de IL-4 y GM-CSF. Durante el cultivo fueron sometidas a los siguientes tratamientos: día 5, con con IL-10 (IL-10); día 6, con LPS (LPS); día 5, IL-10 y al al día 6, LPS (IL-10 + LPS). Como control se dejó DC sin tratamiento -sólo con medio de cultivo- (sin tto). Mediante citometría de flujo se evaluó la expresión (intensidad media de fluorescencia -MFI-) para los marcadores CD11c, CD83, CD86, CD40 y MHC II. Los resultados representan promedios de datos obtenidos para 2 individuos. Las diferencias entre los valores de MFI se consideraron estadísticamente significativas a un  $p < 0.05$  (\*) o  $p < 0.01$  (\*\*).



**Figura 7:** Comparación de los niveles de expresión de los marcadores de superficie entre células dendríticas (DC) de pacientes con artritis reumatoide (AR) e individuos controles sanos. Las DC fueron cultivadas por 7 días en presencia de IL-4 y GM-CSF. Durante el cultivo fueron sometidas a los siguientes tratamientos: día 5, con IL-10 (IL-10); día 6, con LPS (LPS); día 5, con IL-10, además de LPS, al día 6 (IL-10 + LPS). Como control se dejó DC sin tratamiento -sólo con medio de cultivo- (sin tto). Mediante citometría de flujo se evaluó la expresión (intensidad media de fluorescencia - MFI-) para los marcadores CD11c, CD83, CD86, CD40 y MHC II (Figuras 5 y 6). Los resultados representan valores obtenidos mediante la normalización (N) de los valores de MFI (MFI<sub>N</sub>), en la cual los valores individuales de MFI fueron divididos por el valor obtenido para la condición sin tto, para cada uno de los marcadores estudiados. Las diferencias entre los valores de MFI<sub>N</sub> se consideraron estadísticamente significativas a un  $p < 0.05$  (\*).

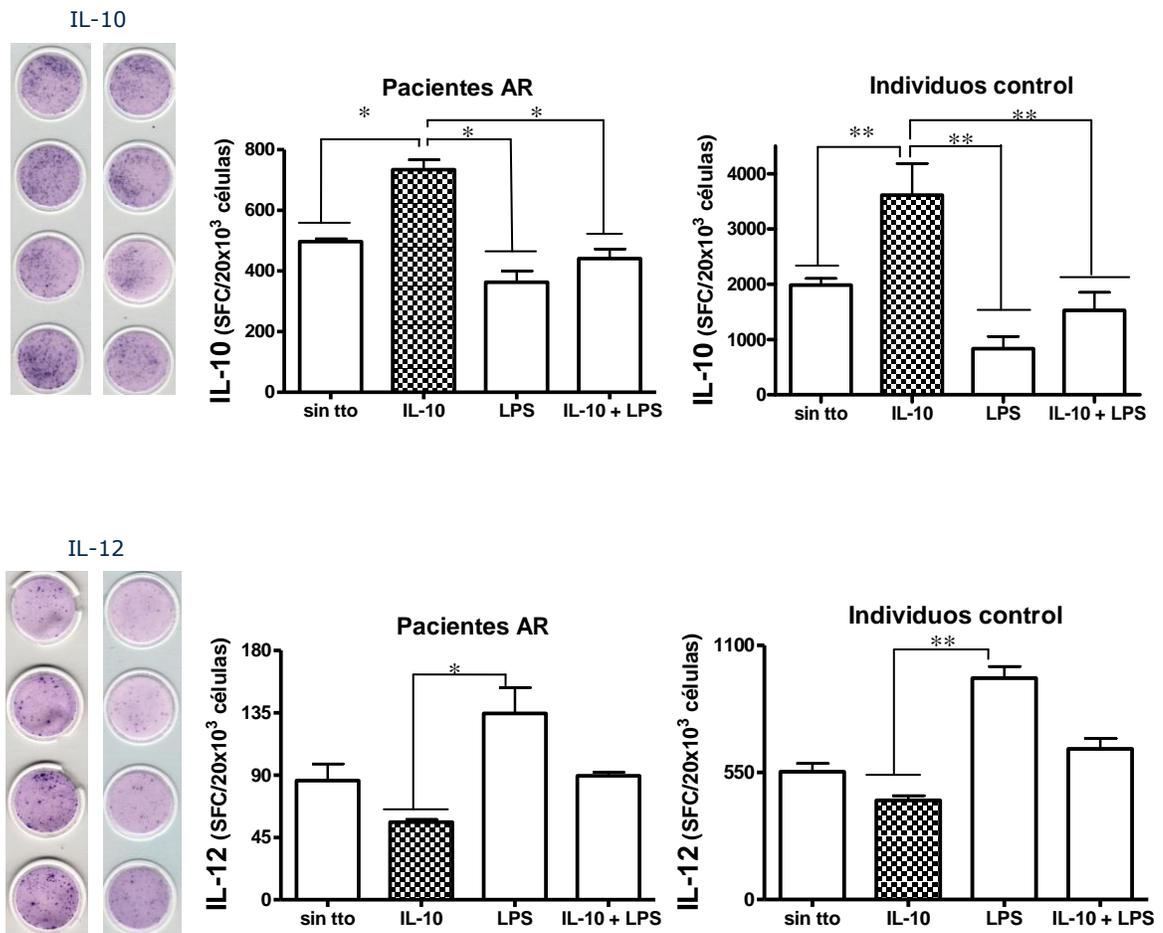
### **4.3. Evaluar las células dendríticas tratadas con IL-10 *in vitro*, en relación al patrón de citoquinas secretadas.**

El perfil de citoquinas que las DC expresen, nos pueden dar información importante que las caractericen funcionalmente (Figura 8). Así, niveles elevados de expresión de IL-12, nos indica que se trata de DC inmunogénicas, mientras que la producción elevada de TGF $\beta$  y/o IL-10, dan cuenta de un perfil tolerogénico. De este modo, en las DC generadas desde pacientes AR y controles, las que fueron sometidas a los tratamientos diferenciales descritos previamente (Objetivos 1 y 2), se evaluó, mediante citometría de flujo con doble tinción, el porcentaje de DC (CD11c+) que expresaron TGF $\beta$  en la superficie celular. Se muestran “dot plots” representativos para los individuos AR (a) y controles (b), además, de los gráficos de barra correspondientes en cada caso. Tanto en individuos AR como en controles, las DC tratadas con IL-10 expresan un porcentaje significativamente mayor de células doble positivas para CD11c y TGF $\beta$ , en relación a las DC tratadas con LPS, DC sin tratamiento, y DC tratadas con IL-10+LPS ( $p \leq 0.01$ , en ambos grupos).



**Figura 8: Porcentaje de células dendríticas (DC) (CD11c+) que expresan TGFβ en pacientes con artritis reumatoide (AR) e individuos controles sanos.** Las DC fueron cultivadas por 7 días en presencia de IL-4 y GM-CSF. Durante el cultivo fueron sometidas a los siguientes tratamientos: día 5, con IL-10 (IL-10); día 6, con LPS (LPS); día 5, IL-10, además de LPS, al día 6, LPS (IL-10 + LPS). Como control se dejó DC sin tratamiento -sólo con medio de cultivo- (sin tto). Mediante citometría de flujo y doble marcación, se evaluó el porcentaje de expresión de CD11c y TGFβ. A la izquierda se muestran “dot plots” representativos para cada uno de los marcajes, mientras a la derecha, los gráficos de barra resumen los resultados obtenidos. Las diferencias entre los valores de porcentaje de células doble positivas se consideraron estadísticamente significativas a un  $p < 0.01$  (\*\*).

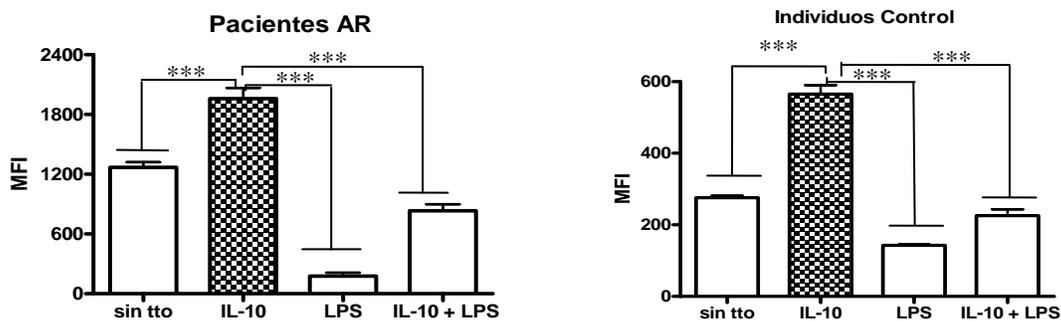
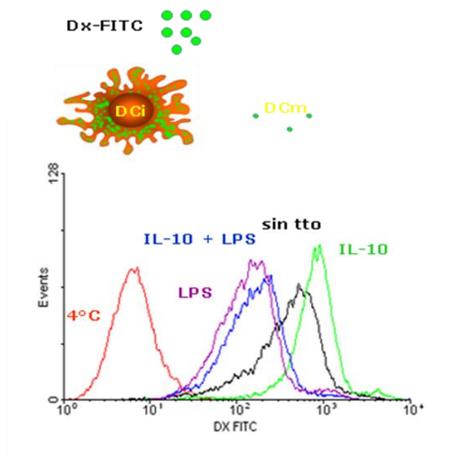
Por su parte, para la evaluación de citoquinas antiinflamatorias (IL-10) y proinflamatorias (IL-12), mediante ELISPOT, las DC fueron sometidas a los distintos tratamientos y posteriormente enfrentadas con fibroblastos murinos transfectados con CD40L humano en una proporción 1 : 1. Se pudo observar, que las DC tratadas con IL-10, producen niveles significativamente mayores de IL-10, en comparación a DC sin tratamiento, LPS, o bien, IL-10 + LPS, tanto en los pacientes AR ( $p < 0.05$ , en cada una de las comparaciones) como en los individuos controles ( $p < 0.01$ , en cada una de las comparaciones). En cuanto a la producción de IL-12, las DC tratadas con IL-10, secretaron niveles de IL-12 significativamente menores que los producidos por las DC tratadas con LPS, tanto en pacientes AR ( $p < 0.05$ ) como en los individuos controles ( $p < 0.01$ ). Aunque la producción de IL-12 en las DC tratadas con IL-10, fue menor que la observada en las DC sin tratamiento o en aquellas DC tratadas con IL-10 + LPS, estas diferencias no fueron significativas ( $p > 0.05$ , en cada caso).



**Figura 9:** Determinación de citoquinas mediante ELISPOT en células dendríticas (DC) de pacientes con artritis reumatoide (AR) e individuos sanos. Las DC fueron cultivadas por 7 días en presencia de IL-4 y GM-CSF. Durante el cultivo fueron sometidas a los siguientes tratamientos: día 5, con IL-10 (IL-10); día 6, con LPS (LPS); día 5, con IL-10 además de LPS, al día 6 (IL-10 + LPS). Como control se dejó DC sin tratamiento -sólo con medio de cultivo- (sin tto). La producción de IL-10 e IL-12 se realizó por ELISPOT co-cultivando las DC con fibroblastos que expresan CD40L humano. A la izquierda se muestran figuras representativas de los resultados de ELISPOT para IL-10 y para IL-12. A la derecha se grafica la producción de estas citoquinas, la que se cuantificó en la nitrocelulosa, mediante recuento de las células formadoras de “spots” (SFC). Las diferencias en la producción de citoquinas frente a los distintos tratamientos, por parte de las DC, se consideraron estadísticamente significativas a un  $p < 0.05$  (\*) o  $p < 0.01$  (\*\*).

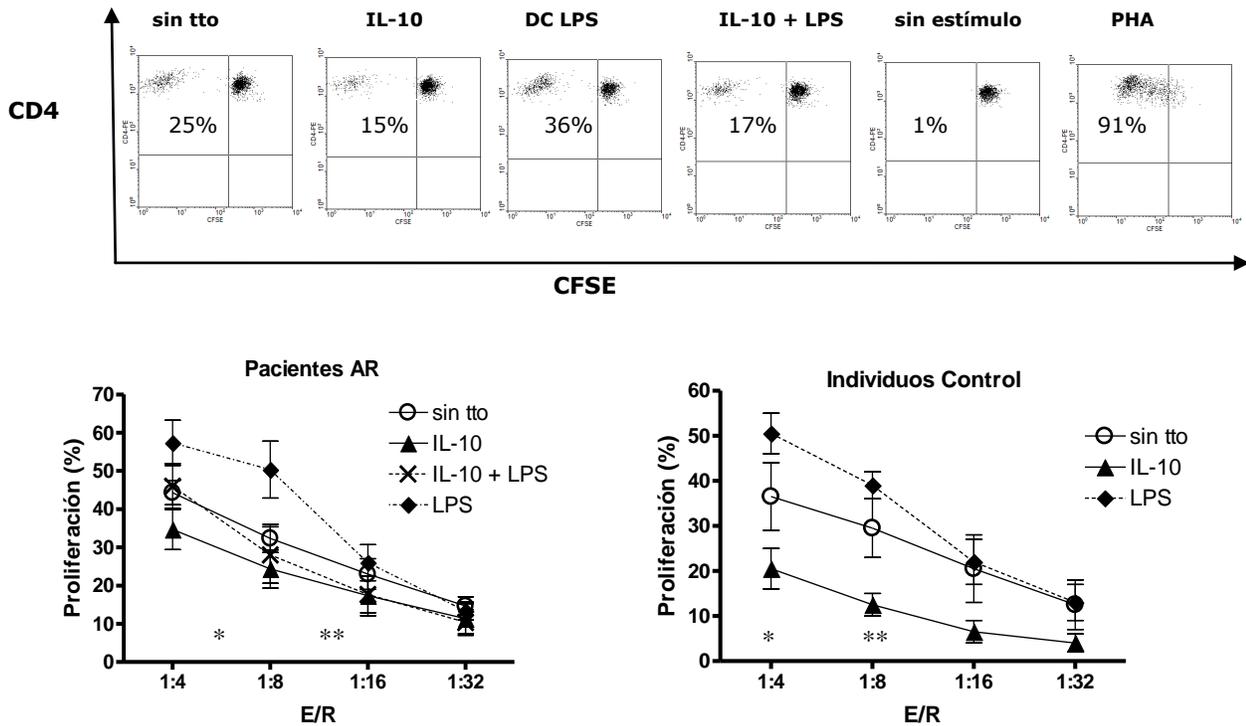
#### **4.4. Evaluar las células dendríticas tratadas con IL-10 *in vitro*, mediante ensayos funcionales en cuanto a su capacidad fagocítica y alo-estimuladora.**

Para determinar las propiedades funcionales de las DC de pacientes con AR e individuos controles, se realizaron ensayos de endocitosis con dextran conjugado con FITC (Figura 10). Se sabe que las DC inmaduras se caracterizan por una gran capacidad endocítica, mientras que las DC maduras prácticamente carecen de esta propiedad. Se muestra un histograma representativo de las DC sometidas a los distintos tratamientos y se grafican los resultados expresados en MFI, asociados a cada una de las condiciones. Como control de endocitosis inespecífica, se utilizó DC incubadas a 4°C. Las DC provenientes de individuos AR, tratadas con IL-10, mostraron una actividad endocítica significativamente mayor en relación a las DC sin tratamiento ( $p < 0.001$ ), tratadas con LPS ( $p < 0.001$ ), y las DCs tratadas con IL-10 + LPS ( $p < 0.001$ ). Un comportamiento similar fue observado en DC provenientes de los controles, en donde la mayor capacidad endocítica fue desplegada por las DC tratadas con IL-10, en relación a las DC sin tratamiento ( $p < 0.001$ ), con LPS ( $p < 0.001$ ) e IL-10 + LPS ( $p < 0.001$ ).



**Figura 10:** Comparación de la capacidad endocítica de células dendríticas (DC) de pacientes con artritis reumatoide (AR) e individuos sanos. Las DC fueron cultivadas por 7 días en presencia de IL-4 y GM-CSF. Durante el cultivo fueron sometidas a los siguientes tratamientos: día 5, con IL-10 (IL-10); día 6, con LPS (LPS); día 5, con IL-10 además de LPS, al día 6 (IL-10 + LPS). Como control se dejó DC sin tratamiento -sólo con medio de cultivo- (sin tto). Las DC, diferencialmente tratadas, fueron cosechadas al día 7, e incubadas con 30  $\mu$ g de Dextran (Dx)-FITC durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, las DC lavadas y fijadas, fueron analizadas mediante citometría de flujo. En (a) se muestra un histograma representativo del comportamiento de las DC frente a los distintos tratamientos, como control se incluyen DC incubadas a 4°C. Se grafican los valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) asociados a cada una de las condiciones. Las diferencias entre los valores de MFI se consideraron estadísticamente significativas a un  $p < 0.001$  (\*\*\*).

Otro ensayo utilizado para determinar las propiedades funcionales de las DC proveniente de pacientes con AR y de individuos controles sanos, corresponde a los ensayos de alo-proliferación (Figura 11). Así, se evaluó la capacidad de las DC de inhibir la alo-proliferación de linfocitos CD4+, presentes en PBMC alo-génico, marcado con CFSE, a diferentes razones de DC (Estimuladoras) y PBMC (Respondedoras) (E/R: 1:4, 1:8 1:16, 1:32). Se muestran “dot plots” representativos, como porcentaje de células doble positivas (CD4+/CFSE), para cada una de las condiciones, más los controles sin estímulo y estimulados con PHA. De la evaluación indirecta de la proliferación de los linfocitos CD4+ en los pacientes AR, se puede apreciar que las DC tratadas con IL-10, muestran una menor capacidad de inducir proliferación de los linfocitos T CD4+, respecto de las DC tratadas con LPS. Esta diferencia fue significativa a las razones 1:4 y 1:8 ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente). Aunque tanto las DC sin tratamiento como las tratadas con IL-10 + LPS muestran una capacidad disminuida de inducir proliferación de los linfocitos T CD4+, respecto a las DC tratadas con LPS, esta diferencia no es significativa ( $p > 0.05$  en ambos casos). Un resultado equivalente se obtuvo en las DC provenientes de individuos sanos.



**Figura 11:** Capacidad de inhibición de la alo-proliferación de las células dendríticas (DC) de pacientes con artritis reumatoide (AR) e individuos controles sanos. Las DC fueron cultivadas por 7 días en presencia de IL-4 y GM-CSF. Durante el cultivo fueron sometidas a los siguientes tratamientos: día 5, con IL-10 (IL-10); día 6, con LPS (LPS); día 5, con IL-10 además de LPS, al día 6 (IL-10 + LPS). Como control se dejó DC sin tratamiento -sólo con medio de cultivo- (sin tto). Al día 7, las DC se recuperaron y se co-cultivaron con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) alogénicas, marcadas con carboxi-fluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE). Al cabo de 5 días de co-cultivo de DC (Estimuladoras -E-) enfrentadas a PBMC (Respondedoras -R-), a diferentes razones (1:4, 1:8, 1:16, 1:32), se evaluó la proliferación de los linfocitos CD4+, mediante citometría de flujo y doble marcación (CFSE y CD4-ficoeritrina). Se muestran “dot plots” representativos de los linfocitos CD4+CFSE+ para cada una de las condiciones, y los controles sin estímulo y estimulados con PHA (5µg/ml) y se grafica el porcentaje de proliferación de los linfocitos CD4+, enfrentados a las DC. Las diferencias entre las DC tratadas con IL-10 y LPS se consideraron estadísticamente significativas a un  $p < 0.05$  (\*) o  $p < 0.01$  (\*\*).

## 5. DISCUSIÓN.

En esta Tesis se ha analizado el efecto de la IL-10 sobre las DC de pacientes con artritis reumatoide (AR), se caracterizaron estas DC morfológicamente mediante microscopía confocal; fenotípicamente, mediante citometría de flujo, cuantificando la expresión de marcadores de superficie: moléculas co-estimuladoras, de presentación antigénica, activación y receptores de quimioquinas. Además, se caracterizaron estas DC en cuanto al patrón de citoquinas y funcionalmente mediante ensayos de endocitosis y de alo-proliferación.

En este estudio se incluyó pacientes AR que cumplieron con los criterios clínicos y de laboratorio descritos para AR por la American College of Rheumatology (Materiales y Métodos), caracterizándolos de acuerdo a edad, sexo y tratamientos a los cuales estaban sometidos (Tabla 1a). En relación a los individuos controles, se utilizó sangre de donantes sanos del Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, los cuales previamente fueron sometidos a un cuestionario de salud, lo que nos permitió seleccionar la sangre de aquellos individuos que concordaran con las características de los pacientes AR (Tabla 1b).

Con respecto a la generación de las DC a partir de monocitos en pacientes AR, como se aprecia en la Tabla 2a, el rendimiento en cuanto a la cantidad de PBMC obtenido a partir de los 400 ml de sangre proveniente de los concentrados leucocitarios es altamente variable (rango entre 368 a 810 millones de células). Esto es similar a lo descrito en otros estudios, en individuos sanos (Lopez et al., 2002) y en pacientes con cáncer (Escobar et al., 2005). Lo anterior, lo pudimos corroborar en nuestros resultados en individuos sanos y que se detalla en la Tabla 2b. Una situación similar ocurrió con el número de DC obtenidas al día 7 de cultivo, donde se observa una gran variabilidad en el número de DC tanto en pacientes AR ( $2.0-3.0 \times 10^6$  células) como en individuos controles ( $2.3-2.9 \times 10^6$  células). Esto es concordante con lo publicado por otros grupos, donde también describen una alta variabilidad el rendimiento tanto del PBMC como el número de DC obtenidas al final del cultivo en individuos normales (Berger et al., 2002).

Al analizar las DC obtenidas al día 7 mediante citometría de flujo, se selecciona la primera región de análisis (R1), de acuerdo a los parámetros de tamaño (FSC) y granularidad (SSC)

(Figura 1a), que corresponde aproximadamente al 99% de las células seleccionadas con el marcador de linaje CD11c y el parámetro de granularidad (CD11c/SSC), y que define la segunda región de análisis denominada R2 (Figura 1b). Cabe destacar que en los “dot plots” mencionados anteriormente se observa una pequeña población de tamaño y granularidad reducido, esta población correspondería a linfocitos que sobreviven durante el cultivo y que quedan después de la separación de los monocitos mediante adherencia. En este caso, la población de DC analizadas, se corresponde a la regiones R1 y R2, quedando excluida la población de linfocitos de estas regiones, como se muestra en la Figura 1c (CD11c/FL-1), que corresponde al análisis de citometría que se utilizó en los experimentos que se describen posteriormente. Se incluyen además “dot plots” de los controles de isotipo, tanto para PE como FITC (Figura 1d), lo que da cuenta de la especificidad de los marcadores utilizados posteriormente. A través de esta metodología, se pudo establecer que el porcentaje de pureza de nuestras DC fluctuó entre un 60 – 75% (Figura 1b), lo que guarda relación con lo descritos en otros trabajo, empleando protocolos similares (Adikari et al., 2004).

Morfológicamente, las DC de los pacientes AR no difieren de lo observado en individuos sanos, como se aprecia en la microscopía confocal (Figura 2). Como se ha informado previamente, las DC inmaduras (sin tratamiento) mostraron un aspecto redondeado, a diferencia de las DC maduras con LPS, que se apreciaron más grandes y con prolongaciones citoplasmáticas (Ling-ling et al., 2005). Una situación interesante es lo observado en las DC tratadas con IL-10 sólo, o bien, con IL-10 + LPS, las que mostraron una morfología muy similar y prácticamente igual a la de las DC inmaduras. Cabe destacar la ausencia de efecto del LPS sobre la morfología de las DC, una vez que a éstas se les ha agregado IL-10, obteniéndose DC con morfología equivalente a la de inmaduras.

En cuanto a la expresión de marcadores de superficie, no se aprecian diferencias significativas en el porcentaje de células doble positivas para CD11c y los marcadores MHC II, CD40, CD86 y CCR7, entre las DC de pacientes AR (Figura 3) e individuos controles (Figuras 4). En cambio, para CD83, el porcentaje de células doble positivas es menor en el caso de las DC tratadas con IL-10 (24%, en promedio), tanto en pacientes AR como individuos control, en comparación con las DC tratadas con LPS (84%, en promedio), lo cual es coincidente con lo reportado por otros autores (Sato et al., 2002

Adikari et al., 2004). Derivado de estos resultados, se cuantificó la densidad en superficie de estos mismos marcadores, expresado como intensidad de fluorescencia media (MFI). El hecho que no existan diferencias en los porcentajes de células doble positivas (CD11c vs los distintos marcadores de superficie), no implica que no existan diferencias en la densidad en superficie (MFI) asociada a cada marcador. Las DC de pacientes AR (Figura 5) e individuos controles (Figura 6), son susceptibles de ser moduladas al día 5 con IL-10; por ejemplo, en las moléculas de presentación antigénica MHC II, si bien la mayor parte de las DC para los distintos tratamientos se encuentran en el cuadrante superior derecho (Figuras 3 y 4), existen diferencia en la ubicación de estas células en el cuadrante y que dan cuenta del valor distinto de MFI en cada caso. Así, las células tratadas con IL-10 y sin tratamiento se ubican más a la derecha en el cuadrante, por lo tanto el MFI asociado es mucho más bajo (MFI promedio: 775) que el cuantificado en las células tratadas con LPS donde la fluorescencia asociado a este marcador es más alta (MFI promedio: 1923). Esta misma observación se puede apreciar en el caso de la molécula coestimuladora CD40 (Steinbrink et al., 1997; McBride et al., 2002; Sato et al., 2002). Distinto es lo que se observó en el caso de CD86, donde sólo se observó diferencias en las células tratadas con LPS de individuos normales, respecto de las DC no tratadas, o tratadas con IL-10 (Figura 6), sin embargo, en las DC de pacientes AR, esta diferencia no fue significativa (Figura 5). Esto se corrobora al normalizar los valores de MFI con respecto al valor obtenido en las DC sin tratamiento (Figura 7), donde se aprecia que en los controles, las DC tratadas con LPS fueron capaces de aumentar los niveles de expresión en forma significativamente mayor que las DC de pacientes AR tratadas, lo que cual ha sido previamente descrito para individuos controles (McBride et al., 2002; Sato et al., 2002). Cabe señalar, que esta misma diferencia en la expresión de CD86 entre pacientes y controles, se observó en las DC tratadas con IL-10 y que posteriormente fueron estimuladas con LPS, dando cuenta de la adquisición de un fenotipo estable por parte de las DC, luego de recibir el tratamiento con IL-10. Estas diferencias de expresión de CD86, observadas en pacientes y controles, podrían ser el resultado del tratamiento inmunosupresor al que están sometidos los pacientes AR (entre otros, el uso de corticoides), lo cual podría influir en la capacidad de modular este marcador, por lo tanto estas células no tendrían la capacidad de expresar niveles mayores de CD86 cuando son estimuladas con LPS, y que es coincidente con lo observado al

modular DC *in vitro* con dexametasona con el fin de generar células tolerogénicas (Piemonti et al., 1999). Para el marcador MHC II, se observó una situación semejante a la descrita para CD86, en donde DC de pacientes, pre-tratadas con IL-10 y luego estimuladas con LPS expresaron menores niveles de este marcador que las DC de controles. Este hecho es consistente con la acción ejercida por dexametasona *in vitro* sobre DC. En cuanto al marcador de linaje CD11c, las DC generadas en pacientes AR e individuos controles no sufre cambios en los niveles de expresión, independiente del tratamiento al cual fueron sometidas (Figuras 5 y 6).

En cuanto a la producción de citoquinas (Figuras 8 y 9), las DC de pacientes AR e individuos controles muestran características similares, las DC tratadas con IL-10 tienen baja secreción de IL-12, alta secreción de IL-10 y TGF $\beta$ , lo cual coincide con el concepto de DC tolerogénicas que últimamente ha sido definido (Morelli y Thomson, 2007). En cuanto a la producción de IL-12 e IL-10, en DC tratadas con IL-10 de, nuestros resultados son coincidentes con lo publicado en estudios con individuos normales (McBride et al., 2002) y para individuos con enfermedades autoinmunes, como es la esclerosis múltiple (Adikari et al., 2004). Además, en otros modelos de inducción de DC tolerogénicas, utilizando dexametasona, se logran también DC similares a las DC moduladas con IL-10, con baja secreción de IL-12 y alta secreción de IL-10 (Xia et al., 2005). Cabe destacar que a pesar de tener un comportamiento similar, en cuanto a la producción de IL-10 e IL-12, los niveles de estas citoquinas son claramente inferiores en los pacientes AR, respecto a los obtenidos en los individuos controles. En cuanto a TGF $\beta$ , al analizar su expresión en la superficie celular (Figura 8), se aprecia que la expresión de esta citoquina con características inmunosupresoras se encuentra aumentada en las DC tratadas con IL-10 con respecto a las DC maduras, lo cual podría contribuir a la generación de células T reguladoras (Morelli y Thomson, 2007).

En cuanto a los ensayos funcionales, en el caso de los ensayos de endocitosis con dextran-FITC (Figura 10), las DC provenientes tanto de pacientes AR como de individuos controles, tratadas con IL-10, mostraron una actividad endocítica significativamente mayor en relación a las DC sin tratamiento, tratadas con LPS, y las DC tratadas con IL-10 + LPS. Por lo tanto, las DC se comportarían funcionalmente como DC inmaduras, aunque tienen

mayor capacidad de endocitosis que las DC inmaduras (sin tratamiento); esto resulta un poco sorprendente aunque coincide con lo descrito por otros autores (Sato et al., 2002), y también con lo observado en DC moduladas con dexametasona, donde estas células tienen mayor capacidad de endocitosis que las DC inmaduras (Xia et al., 2005). Esto podría en parte deberse a que tal vez exista cierto grado de maduración espontánea por parte de las DC inmaduras, y en este caso las DC tratadas con IL-10 mostrarían un fenotipo más estable, siendo más refractaria a la maduración, y que se podría correlacionar con lo descrito en los experimentos anteriores con los marcadores de superficie (Figuras 5 y 6).

En cuanto a los ensayos de alo-proliferación (Figura 11), las DC tratadas con IL-10 tanto en pacientes AR como individuos controles, poseen la capacidad de disminuir la alo-proliferación de linfocitos CD4+ alogénicos. Este resultado también ha sido descrito por otros autores en el caso de individuos controles, tanto en ensayos de aloproliferación (Mc Bride et al., 2002) como en ensayos de inhibición de respuesta antígeno-específica ya sea linfocitos CD4+ como en linfocitos CD8+ (Steinbrink et al., 2002). Lo anterior, puede deberse a que estas células muestran baja expresión de moléculas MHC II y moléculas coestimuladoras CD40 y CD86, lo cual podría generar células anérgicas en el caso de inhibición de la respuesta antígeno-específica (Sato et al., 2002). Más aun, en DC moduladas con IL-10 de individuos controles se propone que además de las moléculas mencionadas, existirían una disminución de la actividad quinasa (ERK2, SAP/JNK y p38) en las DC y que serían importantes para la activación de las células T (Sato et al., 2002).

De acuerdo a los resultados obtenidos, tomando en cuenta que las DC jugarían un rol importante en dirigir la respuesta inmunopatogénica que lleva al establecimiento de la destrucción articular en la AR (Santiago-Schwarz et al, 2001), además de los antecedentes que avalan la participación de estas célula en otras enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico (Ding et al, 2006), y síndrome de Sjögren (Vogelsang et al., 2006), su modulación hacia un fenotipo tolerogénico es una aspecto interesante a desarrollar. Es importante comparar estos resultados con lo descrito en otros modelos de enfermedades autoinmunes donde también se ha buscado modular las DC con distintos factores. Es así como los resultados obtenidos en esta Tesis coinciden con lo descrito por Adikari et al., 2004, con DC generadas a partir de sangre periférica en pacientes con esclerosis múltiple, y moduladas con IL-10. Al igual que las DC inmaduras, las DC tratadas con IL-10 expresan

bajos niveles de HLA-DR, CD86, CD80 y CD83, producen bajas cantidades de IL-12p70, IL-12p40, IL-6 y TNF $\alpha$ , siendo resistentes a la maduración por LPS. Por lo tanto, no existirían diferencias entre el fenotipo y el perfil de citoquinas de las DC obtenidas a partir de individuos con esclerosis múltiple y controles sanos (Adikari et al, 2004). Cabe destacar que los autores del trabajo descrito, generaron DC utilizando la misma metodología que empleamos en esta Tesis, es decir, mediante adherencia en placas a partir de células mononucleares de sangre periférica.

Distinto es lo que se describe en pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE), en donde las DC, generadas a partir de monocitos de sangre periférica, muestran un fenotipo anormal, caracterizado por diferenciación acelerada, maduración y secreción de citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-8. Adicionalmente, se describe en las DC sin tratamiento una alta expresión del marcador de diferenciación CD1a, de los marcadores de maduración CD86, CD80 y HLA-DR, y de la citoquina pro-inflamatoria IL-8. Esas anomalías tienen relevancia funcional, ya que estas DC derivadas de pacientes con SLE tienen mayor capacidad que las DC de individuos controles de incrementar la activación y proliferación de linfocitos T en ensayos de alo-proliferación. Por lo que se concluye que las DC mieloides de pacientes con SLE muestran cambios significativos en el fenotipo, lo cual promueve una función aberrante de las células T, lo que contribuiría a la patogenia de la enfermedad (Decker et al., 2006; Ding et al., 2006). Ahora, cuando se ha intentado modular las DC de pacientes con SLE utilizando IL-10, se describen niveles elevados de expresión de HLA-DR y CD80, entre otros marcadores, por lo que existiría un fenotipo distinto entre DC de SLE y controles sanos (Figueroa-Vega et al., 2006). Esto tiene significancia ya que las DC sin tratamiento de los pacientes AR se comportan tanto fenotípica como funcionalmente como las DC de individuos controles. En un trabajo no publicado, se describe una metodología de generación de DC a partir de células mononucleares de sangre periférica en pacientes AR, estas DC se modulan con dexametasona y vitamina D3 lo cual genera DC con propiedades tolerogénicas capaces de reducir la respuesta antígeno-específica cuando estas DC son cargadas con líquido sinovial (Hilkens et al., 2006).

Con el fin de buscar una aplicación de las DC con fenotipo tolerogénico generadas en esta Tesis, se ha intentado diseñar un ensayo clínico de Fase I para pacientes AR, en el cual las

DC, cargadas con un auto-antígeno específico pudieran ejercer un efecto regulatorio *in vivo*. Para ello, se eligió al colágeno tipo II (CII) como auto-antígeno, dado que es uno de los más descritos y estudiados en la literatura. Paralelamente, fue necesario establecer a aquellos pacientes AR que mostraran respuesta inmune específica para el CII, de acuerdo a lo descrito por otros autores que demostraron que en pacientes AR se puede detectar una respuesta específica y predominante frente a este antígeno, mediante ensayos de proliferación y citometría de flujo (Zhu et al., 2004). Utilizando PBMC de pacientes AR, en presencia de ChII, se detectó la producción de citoquinas (CD4+/IFN $\gamma$  y la activación temprana y tardía de los linfocitos (CD4+/CD69+ y CD4+/CD25+, respectivamente). En una cohorte de 8 pacientes, no detectamos respuesta específica frente a CII, en comparación a individuos normales. Sin embargo, se pudo demostrar respuesta específica frente a antígenos controles como el toxoide tetánico y el derivado de proteína purificada (PPD). Creemos que la falta de reconocimiento de la respuesta a CII en pacientes AR podría deberse, en parte, a que el antígeno seleccionado no sería inmunodominante en la cohorte de pacientes AR analizados. Posiblemente un conjunto de auto-antígenos desencadenan una respuesta autoinmune, es así como además del CII, se ha descrito otras moléculas como posibles autoantígenos, como es el caso de proteínas de unión de cartílago, dominio G1 del proteoglicano agregan, gp39 de cartílago y más recientemente la participación de proteínas citrulinadas (Banerjee et al., 1992; Zhang et al., 1998b; Cope et al., 1999 Union et al., 2002, Klareskog et al., 2008). Otra variable importante, es que estos pacientes poseen un tiempo de enfermedad promedio de más de 10 años, estando sometidos a drogas con fuerte carácter inmunosupresor, como es el caso de la prednisona y el metotrexato, los cuales afectan principalmente la capacidad de activación y de proliferación de los linfocitos T, que es lo que buscamos en los ensayos efectuados. Esto nos lleva a concluir que tal vez podríamos detectar una respuesta antígeno-específica en individuos con menos tiempo de enfermedad, que concuerda con reportes que indican que la respuesta específica frente a auto-antígenos disminuye en relación a los años de enfermedad (Kim et al., 1999b).

La mayoría de los ensayos clínicos con DC están orientados a buscar una respuesta inmune activa, principalmente en terapias contra el cáncer (Nestle et al., 1998; Baar, 1999; Schuler-Thurner et al., 2000; Lau et al., 2001; Escobar et al., 2005); los únicos trabajos

publicados hasta la fecha que logran disminuir la respuesta inmune corresponden a trabajos en los cuales se inmunizan voluntarios sanos con DC inmaduras pulsadas con un péptido de la matriz del virus influenza, la respuesta inmune, aun cuando continuó por la vía de las células T CD8+, se observó una pérdida de su capacidad efectora, una disminución de la respuesta de memoria expresada en niveles de IFN $\gamma$  y un aumento de las células T productoras de IL-10 antígeno-específica, pudiendo observarse que el efecto sobre las células CD8+ se prolongó hasta 6 meses después de la inmunización (Dhodapkar et al., 2001; 2002). Estos resultados indicarían que es posible aplicar esta metodología de manera de disminuir la respuesta inmune, sin embargo, el problema en AR es la elección del antígeno o los antígenos a los cuales se inducirá una respuesta tolerogénica *in vivo*. En individuos normales, se ha descrito que las DC tratadas *in vitro* con IL-10 serían capaces de provocar una respuesta de linfocitos T con capacidad reguladora, principalmente del tipo Tr1 (Levings et al., 2004).

Recientemente se ha descrito un fenotipo DC humanas conocido como DC alternativamente activadas (aaDC), en este modelo las DC generadas a partir de PBMC son tratadas con dexametasona el día 3 de cultivo, las que posteriormente se activan el día 6 con Vitamina D3 y LPS por un periodo de 24 hrs. Estas aaDC expresan niveles bajos de CD86 y CD83, además el perfil de citoquinas de estas aaDC corresponde a células con niveles no detectables de IL-12, pero niveles elevados de IL-10, funcionalmente tienen la capacidad de modular tanto linfocitos vírgenes como de memoria. Lo interesante de este trabajo es que este grupo de investigadores ha anunciado recientemente que comenzarán ensayos clínicos con estas DC en pacientes con AR, lo que claramente avala este tipo de terapias en enfermedades autoinmune y es coincidente con los resultados mostrados en esta Tesis (Anderson et al., 2008).

Por lo tanto, en base a los resultados presentados en esta Tesis, el modelo que se propone corresponde a que: las DC de pacientes con AR al ser tratadas con IL-10 dan cuenta de un fenotipo estable, resistente a estímulos de maduración, por lo tanto correspondería a DC tolerogénica, con baja expresión de moléculas coestimuladoras y de presentación antigénica, junto con la expresión principalmente de IL 10 y TGF $\beta$ . Estas DC *in vivo*

podrían inducir apoptosis o anergia en linfocitos T específicos o bien activar poblaciones de linfocitos regulatorios, principalmente del tipo Tr1.

Finalmente, la posibilidad de llegar a utilizar DC con la finalidad de buscar una disminución de la respuesta inmune en enfermedades como la AR va por la vía de reconocer y caracterizar uno o más antígenos inmunodominantes y que puedan ser capaces de producir una respuesta tolerogénica, por lo cual es necesario en base a los resultados generados, ensayar estas DC tratadas con IL-10 en cuanto a la capacidad de generar linfocitos T con propiedades reguladoras.

## **6. CONCLUSIONES.**

- 1.-** A partir de células mononucleares de sangre periférica proveniente de pacientes con artritis reumatoide se ha generado células dendríticas, que estimuladas con IL-10, tienen menor expresión en superficie celular de los marcadores CD83, CD40 y CD86 y de las moléculas MHC clase II con relación a las células dendríticas maduras.
  
- 2.-** El uso de IL-10 permite generar células dendríticas altas productoras de TGF $\beta$  e IL-10 y baja producción de IL-12 con relación a las células dendrítica maduras.
  
- 3.-** Utilizando IL-10 se logró generar células dendríticas con una elevada capacidad endocítica y con una capacidad de inducción de alo-proliferación disminuida.
  
- 4.-** El estímulo con IL-10, permite generar células dendríticas con características tolerogénicas en pacientes con artritis reumatoide.
  
- 5.-** Las células dendríticas generadas en pacientes con artritis reumatoide no difieren a las generadas en individuos normales en cuanto a las características fenotípicas y funcionales ya mencionadas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Adikari S, Pettersson A, Soderstrom M, Huang Y, Link H. 2004. Interleukin-10-Modulated Immature Dendritic Cells Control the Proinflammatory Environment in Multiple Sclerosis *Scandinavian Journal of Immunology*. 59: 600–606.
- 2.- Adler H, Steinbrink K. 2007. Tolerogenic dendritic cells in health and disease: friend and foe! *Eur J Dermatol*. 17: 476-491.
- 3.- Anderson AE, Sayers BL, Haniffa MA, Swan DJ, Diboll J, Wang XN, Isaacs JD, Hilkens CM. 2008. Differential regulation of naïve and memory CD4+ T cells by alternatively activated dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 84: 124-133.
- 4.- Ardavín C, Amigorena S, Reis E, Souza C. 2004. Dendritic cells. Immunobiology and cancer immunotherapy. *Immunity*. 20: 17-23.
- 5.- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS. 1988. The American Rheumatism Association revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 31: 315-324.
- 6.- Baar J. 1999. Clinical applications of dendritic cell cancer vaccines. *Oncologist*. 4: 140–144.
- 7.- Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392: 245–252.
- 8.- Banerjee S, Webber C, Poole A. 1992. The induction of arthritis in mice by the cartilage proteoglycan aggrecan: roles of CD4+ and CD8+ T cells. *Cell Immunol*. 144: 347.
- 9.- Bayry J, Thirion M, Delignat S, Misra N, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine M, Kaveri S. 2004. Dendritic cells and autoimmunity *Autoimmunity Reviews*. 3: 183–187.
- 10.- Berger TG, Feuerstein B, Strasser E, Hirsch U, Schreiner D, Schuler G, Schuler-Thurner B. 2002. Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories. *J Immunol Methods*. 268: 131-140.
- 11.- Bläß S, Engel JM, Burmester GR. 1999. The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 42: 2499-2506.
- 12.- Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. 2003. Immunopathogenesis of Collagen Arthritis. *Springer Semin Immunopathol*. 25: 3–18.
- 13.- Breedveld F. 1998. New insights in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 25: 3-7.

- 14.-** Brennan FM, Maini RN, Feldman M. 1992. TNF $\alpha$ : a pivotal role in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 31: 293-298.
- 15.-** Calder V, Bondeson J, Brennan F, Foxwell B, Feldmann M. 2003. Antigen-specific T-cell downregulation by human dendritic cells following blockade of NF-kappa B. *Scand J Immunol.* 57: 261-270.
- 16.-** Cairns A, Crockard A, Bell A. 2003. Interleukin-10 receptor expression in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 21: 83–86.
- 17.-** Choy E, Panayi G. 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 344: 907-916.
- 18.-** Cope A, Patel S, Hall F, Congia M, Hubers H, Verheijden G, Boots A, Menon R, Trucco M, Rijnders A, Sonderstrup G. 1999. T cell responses to a human cartilage autoantigen in the context of rheumatoid arthritis-associated and nonassociated HLA-DR4 alleles. *Arthritis Rheum.* 42: 1497.
- 19.-** Couper K, Blount D, Riley E. 2008. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol.* 180: 5771–5777.
- 20.-** Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. 1980. Immunization against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature.* 283: 666-668.
- 21.-** Cua D, Sherlock J, Chen Y, Murphy C, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira S, Gorman D, Kastelein R, Sedgwick J. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 421: 744-748.
- 22.-** Decker P, Kötter I, Klein R, Berner B, Rammensee HG. 2006. Monocyte-derived dendritic cells over-express CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 45: 1087-1095.
- 23.-** Ding D, Mehta H, McCune W, Kaplan M. 2006. Aberrant Phenotype and Function of Myeloid Dendritic Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Immunol.* 177: 5878–5889.
- 24.-** Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. 2001. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med.* 193:233–238.
- 25.-** Dhodapkar MV, Steinman RM. 2002. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood.*; 100: 174-177.

- 26.-** Donnelly R, Sheikh F, Kotenko S, Dickensheets H. 2004. The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. *J. Leukoc. Biol.* 76: 314–321.
- 27.-** Drakesmith H, Chain B, Beverley P. 2000. How can dendritic cells cause autoimmune disease? *Immunol Today.* 21:214–217.
- 28.-** Dubois B, Barthelemy C, Durand I, Liu YJ, Caux C, Briere F. 1999. Toward a role of dendritic cells in the germinal center reaction: Triggering of B cell proliferation and isotype switching. *J Immunol.* 162: 3428–3436.
- 29.-** Escobar A, López M, Serrano A, Ramirez M, Perez C, Aguirre A, González R, Alfaro F, Larrondo M, Fodor M, Ferrada C, Salazar-Onfray F. 2005. Dendritic cells immunizations combines with low doses interleukin-2 induce immune responses in melanoma patients. *Clinical and Experimental Immunology.* 142: 555–568.
- 30.-** Feldmann M, Maini R. 2001. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol.* 19: 163-196.
- 31.-** Ferrero E, Bondanza A, Leone B, Manici S, Poggi A, Zocchi M. 1998. CD14+CD34+ peripheral blood mononuclear cells migrate across endothelium and give rise to immunostimulatory dendritic cells. *J Immunol.* 160: 2675–2683.
- 32.-** Figueroa-Vega N, Galindo-Rodríguez G, Bajaña S, Portales-Pérez D, Abud-Mendoza C, Sánchez-Torres C, González-Amaro R. 2006. Phenotypic analysis of IL-10-treated, monocyte-derived dendritic cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol.* 64: 668-676.
- 33.-** Firestein G. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 423: 356-361.
- 34.-** Fujinami R, Nelson J, Walker L, Oldstone M. 1988. Sequence homology and immunologic cross-reactivity of human cytomegalovirus with HLA-DR -chain: a means for graft rejection and immunosuppression. *J Virol.* 62: 100.
- 35.-** Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. 2007. *Nature Rev Immunol.* 7: 52-63.
- 36.-** Gorczynski R, Bransom J, Cattral M, Huang X, Lei J, Xiaorong L, Min W, Wan Y, Gauldie J. 2000. Synergy in induction of increased renal allograft survival after portal vein infusion of dendritic cells transduced to express TGF beta and IL-10, along with administration of CHO cells expressing the regulatory molecule OX-2. *Clin Immunol.* 95: 182-189.
- 37.-** Grouard G, Durand I, Filuegira L, Banchereau J, Liu Y-J. 1999. Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal center reaction: Triggering of B cell proliferation and isotype switching. *J Immunol.* 162: 3428-3436.

- 38.-** Hackstein H, Thomson A. 2004. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol.* 4: 24-34.
- 39.-** Harrington L, Hatton R, Mangan P, Turner H, Murphy T, Murphy K, Weaver C. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 6: 1123-1132.
- 40.-** Harrington L, Mangan P, Weaver C. 2006. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol.* 18: 349-356.
- 41.-** Hay F, Jones M, Bond A, Soltys A. 1991. Rheumatoid factors and complex formation. The role of light-chain framework sequences and glycosylation. *Clin Orthop.* 265: 54-62.
- 42.-** Hewison M, Freeman L, Hughes SV, Evans KN, Bland R, Eliopoulos AG, Kilby MD, Moss PA, Chakraverty R. 2003. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocytederived dendritic cells. *J Immunol.* 170: 5382-5390.
- 43.-** Hilkens CMU, Sayers B, Haniffa MA, Diboll J, Anderson A, Isaacs JD. Tolerogenic dendritic cells therapy for rheumatoid arthritis. 9th International Conference Dendritic Cells. Edimburgo, ESCOCIA. 16-20 de Septiembre, 2006. Resumen en Abstract Book: P8.045. pp 135.
- 44.-** Hochberg M, Chang R, Dwosh I, Lindsey S, Pincus T, Wolfe F. 1992. The American College of Rheumatology revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 35: 498-502.
- 45.-** Isler P, Vey E, Zhang J, Dayer J. 1993. Cell surface glycoproteins expressed on activated human T cells induce production of interleukin-1 beta by monocytic cells: a possible role of CD69. *Eur Cytokine Netw.* 4: 15-23.
- 46.-** Iwakura Y, Ishigame H. 2006. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest.* 116: 1218-1222.
- 47.-** Jonuliet H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4 T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med.* 192: 1213-1222.
- 48.-** Kim HJ, Krenn V, Steinhauser G, Berek C. 1999a. Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J Immunol.* 162: 3053-3062.
- 49.-** Kim HY, Kim WU, Cho ML, Lee SK, Youn J, Kim SI, Yoo WH, Park JH, Min JK, Lee SH, Park SH, Cho CS. 1999b. Enhanced T cell proliferative response to type II

collagen and synthetic peptide CII (255-274) in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 42: 2085-2093.

**50.-** Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. 2008. Immunity to Citrullinated Proteins in Rheumatoid Arthritis. *Ann Rev Immunol.* 26: 651-675.

**51.-** Koenders M, Lubberts E, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Helsen M, Di Padova F, Boots A, Gram H, Joosten L, van den Berg W. 2005. Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing RANKL and interleukin-1. *Am J Pathol.* 167: 141-149.

**52.-** Kong Y, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch E, Van G, Nguyen L, Ohashi P, Lacey D, Fish E, Boyle W, Penninger J. 1999. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature.* 402: 304-309.

**53.-** Lanchbury J. 1992. The HLA association with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 10: 301-314.

**54.-** Lau R, Wang F, Jeffery G, Marty V, Kuniyoshi J, Bade E, Ryback ME, Weber J. 2001. Phase I trial intravenous peptidepulsed dendritic cell as in patients with metastatic melanoma. *J Immunother;* 24:66–78.

**55.-** Lebre M, Tak P. 2008. Dendritic cell subsets: their roles in rheumatoid arthritis. *Acta Reumatol Port.* 33: 35-45.

**56.-** Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, Roncarolo MG. 2005. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood.* 105: 1162-1169.

**57.-** Ling-ling T, Zhe Z, Jie-sheng Z, Ji-fang S, Ke-zhou L. 2005. Phenotypic and functional characteristics of dendritic cells derived from human peripheral blood monocytes. *J Zhejiang Univ SCIENCE B* 6: 1176-1181.

**58.-** López JA, Crosbie G, Kelly C, McGee A, Williams K, Vuckovic S, Schuyler R, Rodwell R, Wright S, Taylor K, Hart D. 2002. Monitoring and isolation of blood dendritic cells from apheresis products in healthy individuals: a platform for cancer immunotherapy. *J Immunol Methods.* 267: 199– 212.

**59.-** Lubberts E, Koenders M, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo C, Joosten L, van den Berg W. 2004. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum.* 50: 650-659.

- 60.-** Ludewig B, Odermatt B, Landmann S, Hengartner H, Zinkernagel R. 1998. Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue. *J Exp Med.* 188: 1493-1501.
- 61.-** MacDonald K, Nishioka N, Lipsky P, Thomas R. 1997. Functional CD40-ligand is expressed by T cells in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 100: 2404–2414.
- 62.-** McBride J, Jung T, de Vries J, Aversa G. 2002. IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cell Immunol.* 215: 162-172.
- 63.-** Moore K, deWaal Malefyt R, Coffman R, O’Garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 19: 683–765.
- 64.-** Moore F, Buonocore S, Paulart F, Thielemans K, Goldman M, Flamand V. 2004. Unexpected effects of viral interleukin-10-secreting dendritic cells in vivo: preferential inhibition of Th2 responses. *Transplant Proc.* 36: 3260-3266.
- 65.-** Morel P, Feili-Hariri M, Coates P, Thomson A. 2003. Dendritic cells, T cell tolerance and therapy of adverse immune reactions. *Clin Exp Immunol* 133: 1–10.
- 66.-** Morelli A, Thomson A. Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. 2003. *Immunol. Rev.* 196: 125–146.
- 67.-** Morelli A, Thomson A. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. 2007. *Nature Rev Immunol.* 7: 610-621.
- 68.-** Morhenn V. 1997. Langerhans cells may trigger the psoriatic disease process via production of nitric oxide. *Immunol Today.* 18: 433–436.
- 69.-** Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. 2003. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol.* 171: 6173-6177.
- 70.-** Neidhart M, Jungel A, Ospelt C, Michel B, Gay R, Gay S. 2005. Deficient expression of interleukin-10 receptor  $\alpha$  chain in rheumatoid arthritis synovium: limitation of animal models of inflammation. *Arthritis & Rheumatism.* 52: 3315–3321.
- 71.-** Nestle FO, Aljagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumour lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 4: 328–332.
- 72.-** Nishioka K, Hasunuma T, Kato T, Sumida T, Kobata T. 1998. Apoptosis in rheumatoid arthritis: A novel pathway in the regulation of synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 41: 1–9.

- 73.-** Pestka S, Krause C, Sarkar D, Walter M, Shi Y, Fisher P. 2004. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol.* 22: 929–979.
- 74.-** Pettit A, Thomas R. 1999. Dendritic cells: the driving force behind autoimmunity in rheumatoid arthritis? *Immunol Cell Biol.* 77: 420-427.
- 75.-** Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone B, Socci C, Di Carlo V. 1999. Glucocorticoids Affect Human Dendritic Cell Differentiation and Maturation. *J Immunol.* 162: 6473–6481.
- 76.-** Quadbeck B, Eckstein K, Tews S, Walz M, Hoermann R, Mann K. 2002. Maturation of thyroidal dendritic cells in Graves' disease. *Scand J Immunol.* 55:612 –20.
- 77.-** Randolph J, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman M, Muller A. 1998. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science.* 282: 480-483.
- 78.-** Roudier J, Rhodes G, Petersen J, Vaughan J, Carson D. 1988. The Epstein-Barr virus glycoprotein gp110, a molecular link between HLA DR4, HLA DR1, and rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol.* 27: 367.
- 79.-** Rosloniec E, Brand D, Myers L, Esaki Y, Whittington K, Zaller D, Woods A, Stuart J, Kang A. 1998. Induction of autoimmune arthritis in HLA-DR4 (DRB1\*0401) transgenic mice by immunization with human and bovine type II collagen. *J Immunol.* 160: 2573-2578.
- 80.-** Rosloniec E, Whittington K, Zaller D, Kang A. 2002. HLA-DR1 (DRB1\*0101) and DR4 (DRB1\*0401) use the same anchor residues for binding an immunodominant peptide derived from human type II collagen. *J Immunol.* 168: 253-259.
- 81.-** Rubin A, Healy C, Martin L, Baskin G, Roberts E. 1987. Experimental arthropathy induced in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) by intradermal immunization with native bovine type II collagen. *Lab Invest.* 57: 524.
- 82.-** Salazar L, Aravena O, Abello P, Escobar A, Contreras J, Rojas N, Catalán D, Aguirre A, Zúñiga R, Pesce B, González C, Cepeda R, Cuchacovich M, Molina MC, Salazar F, Delgado M, Toes R, Aguillón JC. Modulation of established murine collagen-induced arthritis by a single inoculation of short-term lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells. *Ann Rheum Dis.* Published Online First: 4 December 2007. doi:10.1136/ard.2007.072199
- 83.-** Sallusto F, Lanzavecchia A. 1999. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming and chronic inflammation. *J. Exp. Med.* 189: 611–14.

- 84.-** Santiago-Schwarz F, Anand P, Liu S, Carsons S. 2001. Dendritic Cells (DCs) in Rheumatoid Arthritis (RA): Progenitor Cells and Soluble Factors Contained in RA Synovial Fluid Yield a Subset of Myeloid DCs That Preferentially Activate Th1 Inflammatory-Type Responses. *Journal of Immunol.* 167: 1758–1768.
- 85.-** Sato K, Yamashita N, Matsuyama T. 2002. Human peripheral blood monocyte-derived interleukin-10-induced semi-mature dendritic cells induce anergic CD4(+) and CD8(+) T cells via presentation of the internalized soluble antigen and cross-presentation of the phagocytosed necrotic cellular fragments. *Cell Immunol.* 215: 186-194.
- 86.-** Schirmer M, Vallejo A, Weyand C, Goronzy J. 1998. Resistance to apoptosis and elevated expression of Bcl-2 in clonally expanded CD4+CD28– T cells from rheumatoid arthritis patients. *J. Immunol.* 161: 1018–1025.
- 87.-** Schuler-Thurner B, Dieckmann D, Keikavoussi P, Bender A, Maczek C, Jonuleit H, Röder C, Haendle I, Leisgang W, Dunbar R, Cerundolo V, von Den Driesch P, Knop J, Bröcker EB, Enk A, Kämpgen E, Schuler G. 2000. Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A2.1+ melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 165: 3492–3496.
- 88.-** Smolen JS, Steiner G. 2003. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov.* 2: 473-488.
- 89.-** Steinman R, Nussenzweig M. 2002. Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *PNAS.* 99: 351–358.
- 90.-** Steinman R, Hawiger D, Nussenzweig M. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 685–711.
- 91.-** Steiner G, Smolen J. 2002. Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance. *Arthritis Res.* 4 Suppl 2: S1-S5.
- 92.-** Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol.* 159: 4772-4780.
- 93.-** Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. 2002. CD4+ and CD8+ anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood.* 99: 2468-2476.
- 94.-** Summers K, Daniel P, O'Donnell J, Hart D. 1995. Dendritic cells in synovial fluid of chronic inflammatory arthritis lack CD80 surface expression. *Clin Exp Immunol.* 100: 81-89.
- 95.-** Summers K, O'Donnell J, Heiser A, Highton J, Hart D. 1999. Synovial fluid transforming growth factor beta inhibits dendritic cell–T lymphocyte interactions in patients with chronic arthritis. *Arthritis Rheum.* 42: 507-518.

- 96.-** Szekanecz Z, Strieter R, Kunkel S, Koch A. 1998. Chemokines in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol.* 20: 115-132.
- 97.-** Tan P, Yates J, Xue S, Chan C, Jordan W, Harper J, Watson M, Dong R, Ritter M, Lechler R, Lombardi G, George AJ. 2005. Creation of tolerogenic human dendritic cells via intracellular CTLA4: a novel strategy with potential in clinical immunosuppression. *Blood.* 106: 2936-2943.
- 98.-** Thomas R, Davis LS, Lipsky PE. Rheumatoid synovium is enriched in mature antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 1994; 152: 2613-23.
- 99.-** Thomas R, Lipsky P. 1996a. Could endogenous self-peptides presented by dendritic cells initiate rheumatoid arthritis? *Immunol Today.* 17: 559-564.
- 100.-** Thomas R, Lipsky P. 1996b. Presentation of self-peptides by dendritic cells: Implications for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39: 183-190.
- 101.-** Thomas R. 1998. Antigen presenting cells in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol.* 20: 53-72.
- 102.-** Tomasoni S, Aiello S, Cassis L, Noris M, Longaretti L, Cavinato RA, Azzollini N, Pezzotta A, Remuzzi G, Benigni A. 2005. Dendritic cells genetically engineered with adenoviral vector encoding dnIKK2 induce the formation of potent CD4+ T-regulatory cells. *Transplantation.* 79: 1056-1061.
- 103.-** Union A, Meheus L, Humbel R, Conrad K, Steiner G, Moereels H, Pottel H, Serre G, De Keyser F. 2002. Identification of citrullinated rheumatoid arthritis-specific epitopes in natural filaggrin relevant for antifilaggrin autoantibody detection by line immunoassay. *Arthritis Rheum.* 46: 1185-1195.
- 104.-** Vogelsang P, Jonsson MV, Dalvin ST, Appel S. 2006. Role of dendritic cells in Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol.* 64: 219-226.
- 105.-** Walker J, Ahern M, Coleman M, Weedon H, Papangelis V, Beroukas D, Roberts-Thomson P, Smith M. 2007. Characterisation of a dendritic cell subset in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis which strongly express Jak/ STAT transcription factors *Ann Rheum Dis* published online 12 Jan 2007.
- 106.-** Wang G, Zhu L, Hu P, Zhu H, Lei P, Liao W, Yu B, Gong F, Shen G. 2004. The inhibitory effects of mouse ICOS-Ig gene-modified mouse dendritic cells on T cells. *Cell Mol Immunol.* 1: 153-157.
- 107.-** Wang Q, Liu Y, Wang J, Ding G, Zhang W, Chen G, Zhang M, Zheng S, Cao X. 2006. Induction of allospecific tolerance by immature dendritic cells genetically modified to express soluble TNF receptor. *J Immunol.* 177: 2175-2185.

- 108.-** Wicks I, McColl G, Harrison L. 1994. New propeptics on Rheumatoid Arthritis. *Immunol Today*. 15: 553-556.
- 109.-** Worbs T, Förster R. 2007. A key role for CCR7 in establishing central and peripheral tolerance. *Trends Immunol*. 28: 274-280.
- 110.-** Xia CQ, Peng R, Beato F, Clare-Salzler MJ. 2005. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scand J Immunol*. 62: 45-54.
- 111.-** Xie J, Wang Y, Freeman M, Barlogie B, Yi Q. 2003. Beta 2-microglobulin as a negative regulator of the immune system: high concentrations of the protein inhibit in vitro generation of functional dendritic cells. *Blood*. 101: 4005-4012.
- 112.-** Zhang Y, Guerassimov A, Leroux J, Cartman A, Webber C, Lalic R, de Miguel E, Rosenberg L, Poole A. 1998a. Induction of arthritis in BALB/c mice by cartilage link protein: involvement of distinct regions recognized by T and B lymphocytes. *Am J Pathol*. 153: 1283.
- 113.-** Zhang Y, Guerassimov A, Leroux J, Cartman A, Webber C, Lalic R, de Miguel E, Rosenberg L, Poole A. 1998b. Arthritis induced by proteoglycan aggrecan G1 domain in BALB/c mice: evidence for T cell involvement and the immunosuppressive influence of keratan sulfate on recognition of T and B cell epitopes. *J Clin Invest*. 101: 1678.
- 114.-** Zhang L, Wang X. 2006. Interleukin-10 and chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 12: 1681-1685.
- 115.-** Zhu P, Li X, Ding J, Fan C, Wang Y, Wang H, Chen Z. 2004. Simultaneous detection of DNA synthesis, activation and cytokine secretion in collagen II (250-270)-activated T lymphocytes by flow cytometry. *Cell Biol Int*. 28: 765-772.