



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**PARTICIPACION DE ENZIMAS ALDEHIDO DESHIDROGENASAS EN LA
GENERACIÓN DE CELULAS DENDRITICAS HUMANAS *IN VITRO*.**

Memoria para optar al título profesional de
Bioquímico.

Por

CARLOS ALBERTO CUEVAS LIZANA

Director de Memoria: Dr. Juan Carlos Aguillón G.

Programa de Inmunología, ICBM,

Universidad de Chile.

Profesor Patrocinante: Dr. Dante Miranda W.

Departamento de Bioquímica

y Biología Molecular.

SANTIAGO, CHILE

2008

INDICE GENERAL

| | |
|---|-------------|
| INDICE GENERAL | ii |
| INDICE DE TABLA..... | v |
| INDICE DE FIGURAS..... | vi |
| LISTA DE ABREVIATURAS | viii |
| RESUMEN..... | ix |
| ABSTRACT..... | xi |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 CELULAS DENDRÍTICAS | 1 |
| 1.2 ORIGEN DE LAS DC | 3 |
| 1.4 RETINOIDES Y SU METABOLISMO..... | 10 |
| 1.5 DESHIDROGENASAS DE RETINOIDES | 13 |
| 1.6 RETINOIDES Y SUS RECEPTORES EN EL SISTEMA INMUNE | 16 |
| 1.7 RETINOIDES Y SUS RECEPTORES EN LAS CELULAS DENDRITICAS | 18 |
| 2. MATERIALES..... | 21 |
| 2.1 Reactivos Generales | 21 |
| 2.2 Equipos..... | 22 |
| 3. METODOS | 23 |
| 3.1 Obtención de monocitos de sangre periférica | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2 Inducción de diferenciación de monocitos a células dendríticas | 24 |
| 3.3 Inducción de la diferenciación con ácido retinoico..... | 25 |
| 3.4 Inhibición de la diferenciación de monocitos a células dendríticas | 25 |
| 3.5 Análisis por citometría de flujo..... | 26 |
| 3.6 Diseño de partidores específicos para ALDH1A1 y ALDH1A2 | 27 |
| 3.7 Extracción de RNA total y RT-PCR..... | 28 |
| 3.8 PCR semicuantitativo para ALDH..... | 28 |
| 3.9 Medición de actividad enzimática..... | 29 |
| 3.10 Inmunofluorescencia..... | 30 |
| 3.11 Ensayo de fagocitosis | 30 |
| 3.12 Viabilidad celular | 31 |
| 3.13 Análisis estadístico..... | 31 |
| 4. RESULTADOS..... | 32 |
| 4.1 Caracterización fenotípica de células dendríticas humanas diferenciadas con IL-4 y GM-CSF, en ausencia y presencia de DEAB <i>in vitro</i> | 32 |
| 4.2 Evaluar el efecto de DEAB sobre células dendríticas generadas con ácido retinoico..... | 36 |
| 4.3 Evaluar la funcionalidad de las células tratadas con DEAB..... | 38 |
| 4.4 Determinación de la expresión de enzimas aldehído deshidrogenasas mediante RT-PCR semicuantitativo. | 40 |
| 4.5 Determinación de la actividad enzimática de aldehído deshidrogenasa ALDH1A1 y/o ALDH1A2..... | 44 |

| | |
|-----------------------------|-----------|
| 5. DISCUSIÓN | 46 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 56 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 57 |

INDICE DE TABLA

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Secuencia de partidores de ALDH humana..... | 27 |
|--|----|

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Árbol de diferenciación Célula Troncal – Célula Dendrítica..... | 5 |
| Figura 2: Plasticidad de las células dendríticas derivadas de monocitos..... | 9 |
| Figura 3: Pasos metabólicos catalizados por deshidrogenasas de retinoides en el metabolismo de la vitamina A. | 15 |
| Figura 4: Perfil fenotípico de la diferenciación de monocitos a células dendríticas en condiciones normales y bajo estímulo de DEAB..... | 33 |
| Figura 5: Caracterización fenotípica de los cultivos de células dendríticas en condiciones normales y mantenidas en cultivo con DEAB. | 35 |
| Figura 6: Comparación fenotípica de células dendríticas generadas con IL-4/GM-CSF, y ácido retinoico, en presencia y ausencia de DEAB..... | 37 |
| Figura 7: Análisis funcional de células dendríticas (DCs) generadas en condiciones normales, en presencia y ausencia de DEAB..... | 39 |
| Figura 8: Expresión de aldehído deshidrogenasa 1A1 (ALDH1A1) en monocitos y células a distintos días de diferenciación a células dendríticas..... | 41 |
| Figura 9: Expresión de aldehído deshidrogenasa 1A2 (ALDH1A2) en monocitos y células a distintos días de diferenciación a células dendríticas..... | 43 |
| Figura 10: Actividad enzimática de aldehído deshidrogenasa en células en proceso de diferenciación desde monocitos a células dendríticas..... | 45 |

Figura 11: Modelo propuesto de los eventos iniciales en la activación de monocitos, en el proceso de diferenciación a células dendríticas.55

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| DCs | Células Dendríticas |
| CTL | Linfocito T citotóxico |
| MHC | Complejo mayor de histocompatibilidad |
| Ig | Inmunoglobulina |
| GM-CSF | Factor estimulante de colonias de Granulocitos y Macrófagos |
| IL | Interleuquina |
| PBMC | Células mononucleares de sangre periférica |
| INF | Interferón |
| RA | Ácido retinoico |
| DEAB | Dietilaminobenzaldehido |
| All-trans | todos los isómeros trans |
| NAD ⁺ | Nicotinamida adenina dinucleótido |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| FSC | Forward Scatter |
| SSC | Side Scatter |
| MFI | Intensidad de fluorescencia media |

RESUMEN

Las células dendríticas (DCs) cumplen un rol fundamental en la ejecución y regulación de la respuesta inmune. En los últimos años su producción *in vitro* se ha convertido en una herramienta de gran utilidad en inmunología. En tanto, los retinoides son moléculas que han mostrado participar en procesos de diferenciación celular en diversos tejidos, siendo producidos por una variedad de células, incluidas las DCs. Se ha descrito que miembros de la familia de las aldehído deshidrogenasas (ALDH), son responsables de catalizar la oxidación irreversible de retinoides tales como el retinal a ácido retinoico. Los objetivos de esta memoria fueron: Estudiar las diferencias de expresión de marcadores de diferenciación en cultivos normales y cultivos mantenidos con el inhibidor dietilaminobenzaldehído (DEAB), específico de ALDHs; evaluar la acción de DEAB en cultivos diferenciados por una vía independiente de la enzima; definir si la adición del inhibidor tiene repercusiones en la viabilidad y funcionalidad normal de las DCs, y evaluar la expresión de mRNA y la actividad enzimática de ALDHs en cultivos normales de diferenciación.

Nuestros resultados indican que DCs generadas en presencia de DEAB muestran una expresión significativamente menor del marcador de superficie CD11c, mientras el marcador CD14 se expresa en niveles más elevados que en las DCs generadas en condiciones normales. La adición de DEAB a cultivos independientes de la enzima no tuvo efecto alguno en la diferenciación celular. La cantidad de células muertas para todas las condiciones de experimentación es invariable y funcionalmente las células mantenidas con DEAB presentan características propias de privación de retinoides.

También se pudo demostrar diferencias en la expresión de isoenzimas de ALDHs a distintos días de diferenciación, al igual que en los niveles de actividad enzimática.

Concluimos que las enzimas retinal deshidrogenasas cumplen un rol muy importante en la generación de células dendríticas humanas *in vitro*.

ABSTRACT

PARTICIPATION OF ALDEHYDE DEHYDROGENASE ENZYMES IN THE IN VITRO GENERATION OF HUMAN DENDRITIC CELLS.

Dendritic cells (DCs) fulfill a fundamental role in the execution and regulation of the immune response. In the last years *in vitro* production has converted in a very useful tool in immunology. While, retinoids are molecules that had showed participation in cellular differentiation processes in diverse tissues, being produced by a variety of cells, included DCs. Reports have described that members of aldehyde dehydrogenase family (ALDH), are responsible for the catalysis of irreversible oxidation of retinoids like retinal to retinoic acid. The objective of this thesis was: To study the expression of differentiation markers in normal cultures and cultures kept with inhibitor diethylaminobenzaldehyde (DEAB), specific for ALDHs; to evaluate the DEAB action in an enzyme-independent differentiated cultures; to define if the addition of the inhibitor has repercussions in the viability and normal functionality of DCs, and to evaluate the expression of mRNA and the ALDH enzymatic activity in normal differentiation cultures.

Our results indicate that DC generated in the presence of DEAB show a significantly smaller CD11c surface marker expression, on the other hand CD14 marker is expressed in higher levels than in DCs generated in normal conditions. DEAB addition to enzyme-independent differentiated cultures had no effect in the cellular differentiation. The amount of dead cells, in all experimentation, is invariable and

functionally the cells kept with DEAB present own characteristics of retinoid deprivation. We also demonstrated differences in ALDH isoenzymes expression at distinct days of differentiation, and also in the levels of enzymatic activity.

We conclude that the retinal dehydrogenase enzymes fulfill a very important role in the generation of human denticric cells *in vitro*.

1. INTRODUCCIÓN

La defensa del organismo recae en la acción concertada de la inmunidad innata, que incluye a células fagocíticas, asesinas naturales (natural killers, NK), complemento e interferones, y la inmunidad adaptativa, que comprende a los linfocitos T ayudadores y citotóxicos. Para combatir eficientemente la invasión de patógenos deben existir mecanismos que conecten la inmunidad innata y la adaptativa, en este contexto las células dendríticas cumplen un papel crucial, puesto que en una primera etapa, responden a diferentes patógenos, tales como virus y bacterias, principalmente mediante la secreción de citoquinas. Además, participan en la activación y regulación de la respuesta de los linfocitos T.

1.1 CELULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígenos profesionales, con la habilidad única para inducir una respuesta inmune primaria (Bell et al., 1999). En la médula ósea se producen precursores que entran a la circulación y migran a los tejidos periféricos, donde residen como DCs inmaduras con gran capacidad fagocítica (Wu and Dakic, 2004). Tras un proceso inflamatorio o al dañarse un tejido, las DCs inmaduras capturan los antígenos y migran a los órganos linfoides secundarios, donde son capaces de activar a linfocitos T antígeno-específicos, iniciando la respuesta inmune. Las DCs presentan antígenos a linfocitos T citotóxicos CD8+ y ayudadores CD4+, pudiendo estos últimos regular subsecuentemente a linfocitos CD8+ y a linfocitos B, así como también, a macrófagos, eosinófilos y células NK (Bell et al.,

1999). Las DCs constituyen un sistema complejo de células, que dependiendo de las condiciones de microambiente, pueden promover respuestas tan distintas como la inducción de tolerancia y la regulación de la inmunidad mediada por linfocitos T (Bell et al., 1999; Wu and Dakic, 2004)

Las DCs pueden existir tanto *in vitro* como *in vivo* en dos formas funcional y fenotípicamente diferentes: (i) Como *DCs inmaduras*, estado de la mayoría de las DCs residentes que circulan por los tejidos (Pierre et al., 1997), presentando niveles altos de endocitosis y expresando niveles bajos en superficie de MHC de clase I y II, así como de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86), células que tras detectar productos microbianos o entrar en contacto con citoquinas proinflamatorias se transforman en (ii) *DCs maduras*, reduciendo al mínimo su capacidad de capturar antígenos, pero aumentando excepcionalmente su capacidad de estimulación de células T. Esta transición es acompañada de una gran reorganización celular, patente sobretudo por la redistribución del MHC II desde los compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática, se incrementa la expresión en la superficie celular de moléculas coestimuladoras, MHC de clase I y moléculas de adhesión a células T (Turley et al., 2000).

Las DCs han demostrado tener la capacidad de conducir todos los elementos de la orquesta inmune, y por eso son un blanco fundamental como herramienta para la generación de vacunas. Por lo mismo su generación *in vitro* se ha convertido en una herramienta de gran utilidad (Schuler et al., 2003).

1.2 ORIGEN DE LAS DCs

Las DCs son capaces de interactuar con muchos tipos celulares diferentes: células T, células B, células NK, entre otras (Bell et al., 1999). Pueden llevar a cabo su función tanto en los nódulos linfáticos como en los tejidos afectados por la inflamación (McWilliam et al., 1994). Son capaces de inducir una respuesta aguda contra un patógeno y también de controlar que los linfocitos T no actúen contra antígenos propios, es decir, regulan tanto la tolerancia como la inmunogenicidad (Suss and Shortman, 1996; Rissoan et al., 1999). Funciones tan distintas y opuestas difícilmente pueden llevarse a cabo al mismo tiempo por la misma clase de célula. Por ello parece necesaria la existencia de diferentes subtipos de DCs que sean capaces de realizar funciones distintas. Estos subtipos especializados de DCs, ya sean debido a diferentes estados de activación, o bien, a diferentes subpoblaciones, ponen de manifiesto el enorme grado de plasticidad funcional del que son capaces estas células.

Esta breve exposición sobre los subtipos celulares de DCs se centrará en las líneas humanas dejando de lado los subtipos murinos por no haberse empleado DCs murinas en la realización de esta memoria.

En la Figura 1 se pueden apreciar los diferentes tipos de DCs y su desarrollo a partir de sus progenitores. Las DCs humanas se subdividen en dos grandes subtipos según provengan directamente de células madre de la médula ósea o de células precursoras que se encuentran en el torrente sanguíneo. Las primeras son producidas continuamente a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Las células madre hematopoyéticas (Stem Cells) se diferencian a Progenitores Linfoides Comunes

(CLP) y a Progenitores Mieloides Comunes (CMP). Las CMPs se diferencian a su vez en células CD34+CLA- y CD34+CLA+ y estas a su vez en **CD11c+CD1a-** y **CD11c+CD1a+**, respectivamente (Strunk et al., 1997). Las CD11c+CD1a+ migran a la epidermis de la piel donde se transforman en células de Langerhans (iDC). Las CD11c+CD1a-, migran a la dermis de la piel y a otros tejidos y se transforman en DCs intersticiales inmaduras (iDC) (Ito et al., 1999). Tanto las DCs de Langerhans como las DCs intersticiales poseen diferentes fenotipos y funciones, por ejemplo, estas últimas, a diferencia de las DCs de Langerhans, poseen la habilidad de procesar grandes cantidades de antígeno a través de receptores de manosa y de producir IL-10, lo cual puede contribuir a la activación de células B “naïve” y a la producción de IgM en presencia de CD40L e IL-2 (Banchereau et al., 2000). Además, de estos dos tipos celulares, las células madre generan durante la hematopoyesis dos tipos de precursores (preDCs): los monocitos (de línea mieloide) denominados preDC1 y las células plasmacitoides (de línea linfoide) o preDC2 (Rissoan et al., 1999). Aunque tanto las preDCs como las iDCs parecen compartir progenitores celulares bastante cercanos existen diferencias entre ambos tipos, como por ejemplo, las iDCs expresan cantidades moderadas de moléculas coestimuladoras e inducen una moderada activación de células T *in vitro*. Las células preDCs expresan niveles muy bajos de moléculas coestimuladoras y no son capaces de producir respuestas significativas con linfocitos T naïve.

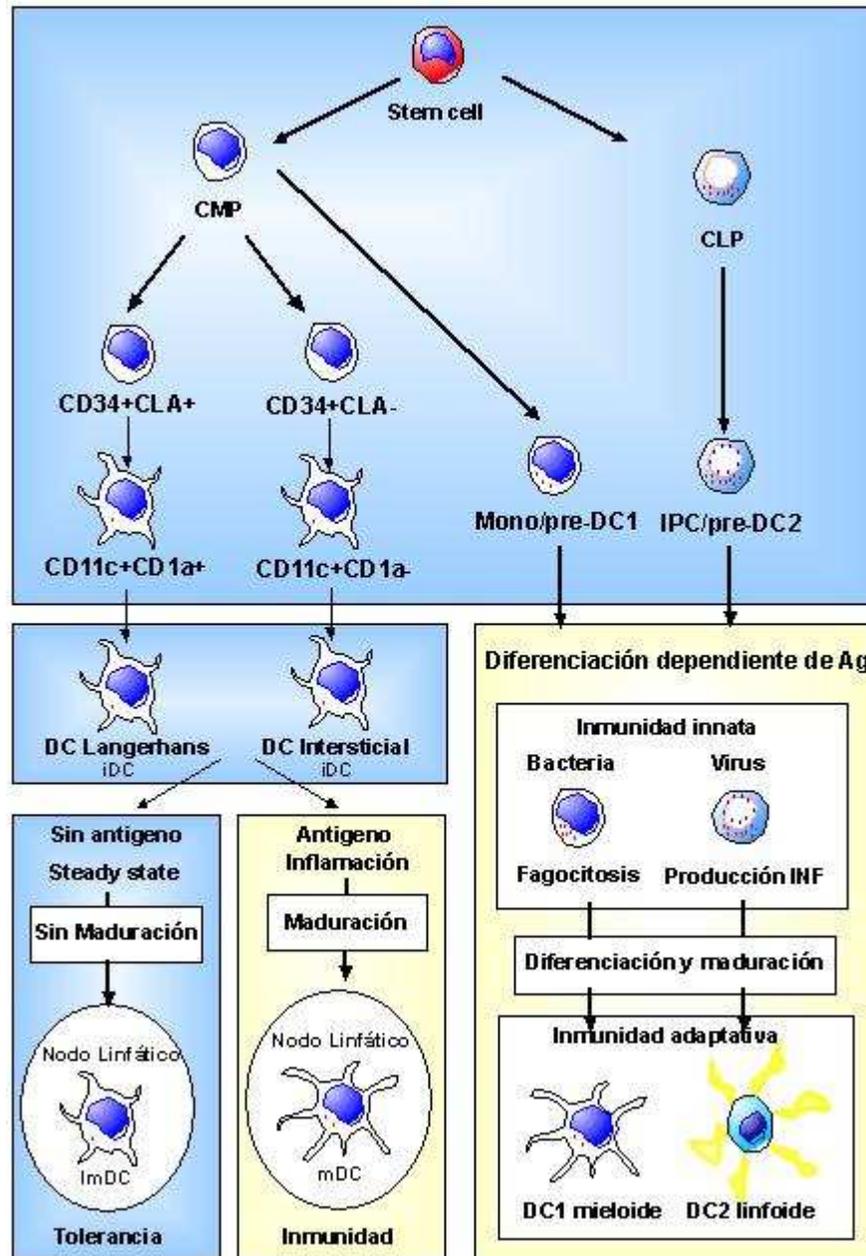


Figura 1: Árbol de diferenciación Célula Troncal – Célula Dendrítica.

Desarrollo, diferenciación, diversificación, maduración y función a partir de células madre hematopoyéticas CD34+ de diferentes tipos de células dendríticas [Adaptado de (Rissoan et al., 1999)].

Las preDC1 y las preDC2 presentan también diferentes propiedades, en sus marcadores de superficie, patrón de migración y secreción de citoquinas. PreDC1 se diferencia a DCs mieloides inmaduras (DC1) en cultivo con GM-CSF e IL-4 o luego de la fagocitosis de bacterias. Las preDC2 son capaces de diferenciarse a DC2 en cultivo con IL-3 o siguiendo una respuesta inmune innata a una estimulación viral. DC1 y DC2 presentan diferentes propiedades después de su activación por CD40L. Las primeras son capaces de producir grandes cantidades de IL-12 e inducir fuertes respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL), mientras que las segundas, DC2, producen moderadas concentraciones de IL-12 e inducen respuestas Th2, o bien, la generación de células CD8 T supresoras, productoras de IL-10 (Ito et al., 1999; Risoan et al., 1999).

1.3 GENERACIÓN DE DCs *IN VITRO*

Las DCs derivadas de monocitos, cargadas con diversos antígenos se están evaluando como posibles vacunas en terapias que van desde el cáncer (Bell et al., 1999; Escobar et al., 2005) hasta enfermedades infecciosas (McCormick et al., 2006). Por esta razón, se requiere una producción a gran escala de DCs, para uso clínico, siguiendo los protocolos estandarizados. Hay varios métodos para aislar monocitos: adherencia a plástico (Thurner et al., 1999), selección positiva utilizando esferas magnéticas acopladas a CD14 (Padley et al., 2001), o por depleción utilizando esferas acopladas a anticuerpos contra CD2 y CD19 para remover los no-monocitos (Suen et al., 2001). La selección positiva resulta la de mayor pureza de DCs inmaduras ($97 \pm 1\%$), pero la de menor rendimiento ($8 \pm 3\%$). Al contrario, la depleción de no-monocitos da un buen

rendimiento ($21 \pm 6\%$) pero pureza insuficiente ($42 \pm 10\%$). El procedimiento convencional de adherencia resulta en un buen rendimiento ($25 \pm 5\%$) y pureza razonable ($72 \pm 4\%$) (Felzmann et al., 2003). Métodos experimentales para la generación de DCs humanas funcionales se han desarrollados a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o células CD34+ progenitoras (Bender et al., 1996).

El método más utilizado y conocido como estándar en la generación de DCs es el descrito por Sallusto y Lanzavechia en 1994 (Sallusto and Lanzavecchia, 1994), el cual consiste en cultivar PBMC en presencia de GM-CSF e IL-4 por un periodo de seis días para obtener DCs inmaduras, siendo necesario un estímulo de maduración como lipopolisacárido (LPS) o Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α). Se han reportado muchos métodos adicionales, tal como se señala en la Figura 2, de los que presentaremos los mas importantes:

INF- α / GM-CSF: Monocitos cultivados en presencia de GM-CSF e INF- α pueden diferenciarse a DCs las que exhiben una morfología típica y expresan, además de los marcadores clásicos, un elevado nivel de moléculas MHC clase I, maduran en presencia de CD40L y endotoxinas, exhibiendo marcadores característicos. Además, estas DCs secretan elevadas concentraciones de IL-6, IL-10 y promueven una respuesta inmune de tipo Th1, independiente de IL-12. Expresan varios receptores de tipo Toll, incluyendo TLR-7, receptor clásico de las DCs plasmocitoides (Mohty et al., 2003)

IL-3/IL-4: DCs generadas con IL-3 e IL-4 (sin GM-CSF) no presentan CD1a, siendo el único marcador afectado. En cuanto a la secreción de citoquinas en su estado maduro,

estas células producen menos IL-12, pero más IL-10. Frente a linfocitos T, estas DCs inducen una alta producción de IL-5 e IL-4 y menores niveles de INF- γ , induciendo preferentemente una respuesta de tipo Th2 (Ebner et al., 2002).

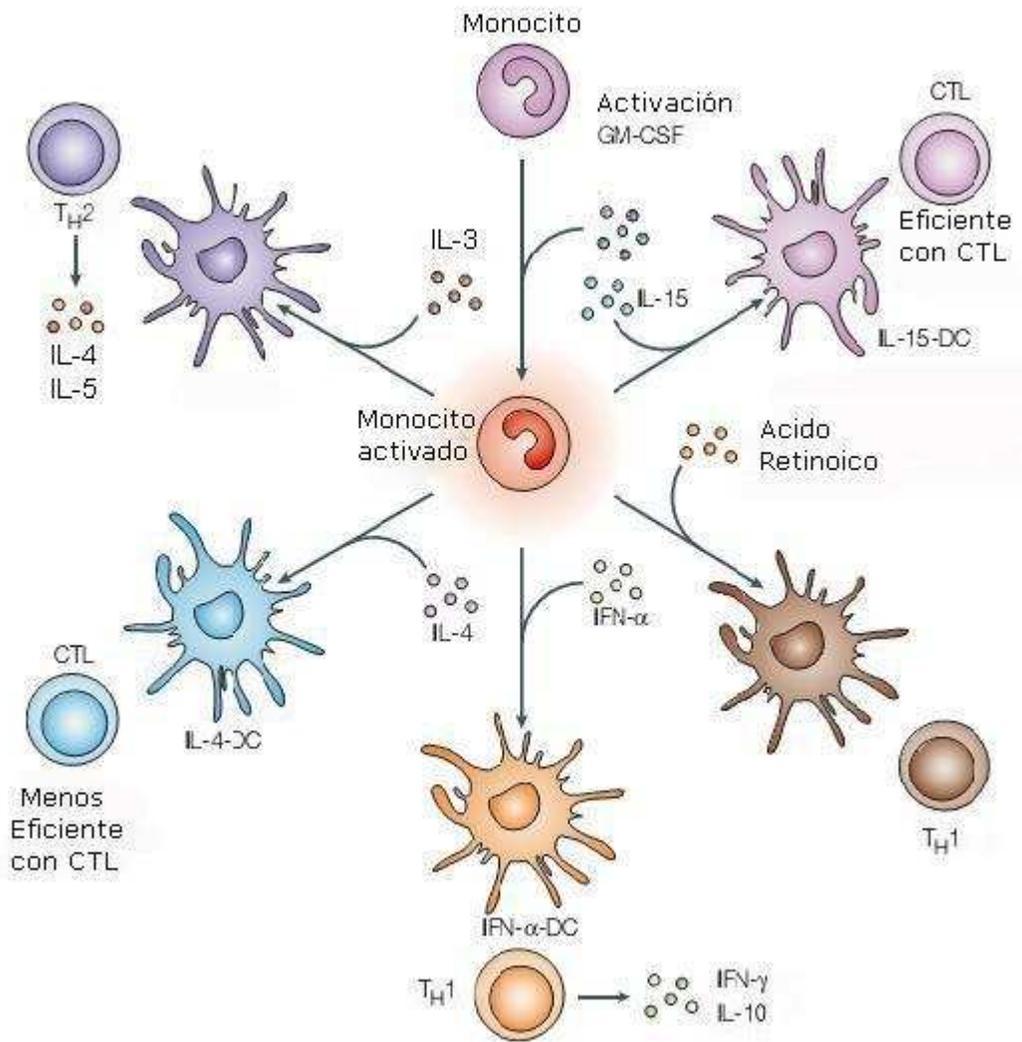


Figura 2: Plasticidad de las células dendríticas derivadas de monocitos.

Monocitos activados pueden diferenciarse en diferentes tipos de DCs después de enfrentarse a distintas moléculas inductoras. [Adaptado de (Bell et al., 1999)]

IL-15: Esta citoquina transforma a los monocitos en DCs maduras directamente, teniendo las mismas características que las cultivadas con GM-CSF/IL-4 y maduras con TNF- α , presentando una alta capacidad aloestimuladora (Saikh et al., 2001).

Ácido Retinoico/GM-CSF: Las DCs generadas con este retinoide tienen un fenotipo de DCs inmaduras, manteniendo la expresión de moléculas de adhesión y coestimuladoras. Pueden inducir una respuesta proliferativa en linfocitos T CD4+ y son capaces de secretar IL-12 sin la necesidad de un agente madurativo (Mohty et al., 2003).

Diferentes microambientes durante la diferenciación pueden modificar las características de las DCs producidas, y por lo tanto las propiedades de la respuesta inmune que se induce.

1.4 RETINOIDES Y SU METABOLISMO

Los retinoides son capaces de regular un amplio espectro de sistemas biológicos. Se trata de una serie de pequeños lípidos capaces de contener y comunicar una extensa y dispar cantidad de información a las células. Los retinoides, incluyendo la vitamina A y sus análogos, regulan la morfogénesis, desarrollo, crecimiento y diferenciación celular (Napoli, 1996). Regulan la expresión génica, controlan los procesos de diferenciación, proliferación y apoptosis desde el momento de la concepción de los vertebrados hasta su muerte. La reproducción (espermatogénesis, concepción, formación placentaria), embriogénesis, la formación de los huesos, la diferenciación epitelial y el sistema inmune están programados de algún modo por los retinoides (Stephensen, 2001;

Blomhoff and Blomhoff, 2006). Para conseguir todos estos efectos los retinoides utilizan diversos mecanismos: interacción con hormonas, enzimas biosintéticas y catabólicas, unión a receptores (actuando solos o combinados con otros receptores de hormonas lipofílicas) y elementos de respuesta a receptores (De Luca, 1991; Blomhoff and Blomhoff, 2006). Toda esta sinfonía es conducida en todos los vertebrados siguiendo deliberados patrones espaciales y temporales.

La principal fuente de retinoides es la dieta, es a partir del metabolismo de β -carotenos o a partir de la hidrólisis de esteres retinil procedentes de la dieta como el organismo se provee de la mayor cantidad del principal retinoide natural: el retinol. El retinol no posee ninguna actividad biológica por sí mismo, pero sirve de sustrato para la biosíntesis de muchos retinoides funcionales (Napoli, 1996). Estos se pueden dividir en dos categorías:

(i) Los cofactores, tales como 11-cis-retinal, un lípido unido covalentemente a la molécula de opsina para formar rodopsina, fundamental en el proceso visual, y (ii) Los agentes humorales que regulan la expresión génica. En este grupo se incluyen el ácido retinoico (RA) y el ácido 9-cis-retinoico (9cRA) (Blomhoff and Blomhoff, 2006).

Tanto RA como 9cRA se unen específicamente a los factores de transcripción activados por ligando, el receptor clásico de ácido retinoico (RAR) y el receptor de retinoides X (RXR), regulando de esta manera muchos genes involucrados en procesos dependientes de retinoides. Tanto RAR como RXR se encuentran ampliamente distribuidos por todos los tejidos, entre las células de cada tejido, pudiéndoseles

encontrar en todas las fases del ciclo de la vida de un vertebrado (Bastien and Rochette-Egly, 2004).

Tanto RAR como RXR se clasifican en subfamilias de receptores pertenecientes a la superfamilia de receptores hormonales Esteroidales – Tiroideos de vitamina D y retinoides. Cada subfamilia de receptores de retinoides esta formada a su vez por tres receptores diferentes α , β y γ , codificados por genes distintos (Ballow et al., 2003; Szanto et al., 2004). Los RARs son activados tanto por RA como por 9cRA, con eficiencias similares, mientras que los RXRs son activados exclusivamente por 9cRA. Estos receptores nucleares de retinoides comúnmente se unen a sus elementos de respuestas (RARE) como heterodímeros RAR/RXR, mientras que bajo ciertas condiciones ocurrirá la homodimerización de RXR (Crabb et al., 2001; Ballow et al., 2003). Por ello, al receptor RXR se le atribuye un rol regulador en la activación génica en respuesta a las concentraciones de RA (Ikeda et al., 1998; Bastien and Rochette-Egly, 2004; Szanto et al., 2004). Además de la formación de heterodímeros con RAR, RXR también heterodimeriza con receptores de vitamina D (VDR) y con receptores activadores del proliferador de peroxisomas (PPAR), extendiendo el rango de señales retinoidales y el impacto de las concentraciones moduladoras de RA (Bastien and Rochette-Egly, 2004).

Por otra parte, las investigaciones del metabolismo de los retinoides han dado entre otros resultado la identificación de numerosas deshidrogenasas de retinoides que pueden contribuir al metabolismo de varios isómeros activos.

1.5 DESHIDROGENASAS DE RETINOIDES

Estas enzimas se clasifican dentro de cuatro grandes familias. Las que catalizan la reacción reversible oxidación / reducción de retinol a retinal siendo miembros de la familia de las alcohol deshidrogenasas (ADH) o de las deshidrogenasas-reductasas de cadena corta (SDR). En tanto, las que catalizan la oxidación irreversible de retinal a ácido retinoico son miembros de la familia de las aldehído deshidrogenasas (ALDH), las cuales se revisarán con mas detalle más adelante. Por ultimo, destacan algunas enzimas miembros de las citocromos P450 (CYP) que participan activamente en la degradación del RA (figura 3), aunque se ha descrito que algunas podrían sintetizar el RA a partir de retinal (Duester, 1996).

Las ADH son miembros de la familia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena mediana, que consisten mayoritariamente en enzimas que contienen subunidades de alrededor de 350 residuos aminoacídicos con un Zinc en el sitio activo (Persson et al., 1994). Tienen una muy amplia variedad de sustratos y algunos miembros de esta familia conocidos en humanos son ADH1, ADH2, ADH4 (Duester et al., 1999). Las SDR son enzimas que contienen típicamente cerca de 250 residuos con sitio catalítico YXXXX sin iones metálicos y, al igual que las ADH presentan una amplia variedad de sustrato. Miembros de esta familia conocidos en humanos son RoDH5 y retSDR1 (Jornvall et al., 1995).

Las enzimas deshidrogenasas de aldehídos contienen alrededor de 500 residuos de aminoácidos y poseen una cisteína en su sitio activo. Al igual que las otras familias, esta tiene una amplia especificidad de sustrato, metabolizando acetaldehído, retinoides y

muchos otros aldehídos fisiológicamente importantes a su respectivo ácido carboxílico (Perozich et al., 1999). Dentro de esta familia se han identificado las retinal deshidrogenasas (EC 1.2.1.36) citosólicas, capaces de oxidar el retinal a ácido retinoico, llamadas ALDH1 (ALDH1A1) en el humano (Sladek, 2003) y RALDH1 en rata (Hsu et al., 1999). ALDH1 cataliza la oxidación irreversible dependiente de NAD⁺ del all-trans retinal y el 9-cis retinal a ácido all-trans retinoico y ácido 9-cis retinoico, respectivamente, con eficiencias muy cercanas (Labrecque et al., 1995). Así, la ALDH1 participa en procesos críticos de producción de retinoides que regulan la homeostasis fisiológica y un normal desarrollo. Además de las ALDH1 encontramos también dentro de esta familia a ALDH6 y RALDH2 (ALDH1A2) (Sladek, 2003).

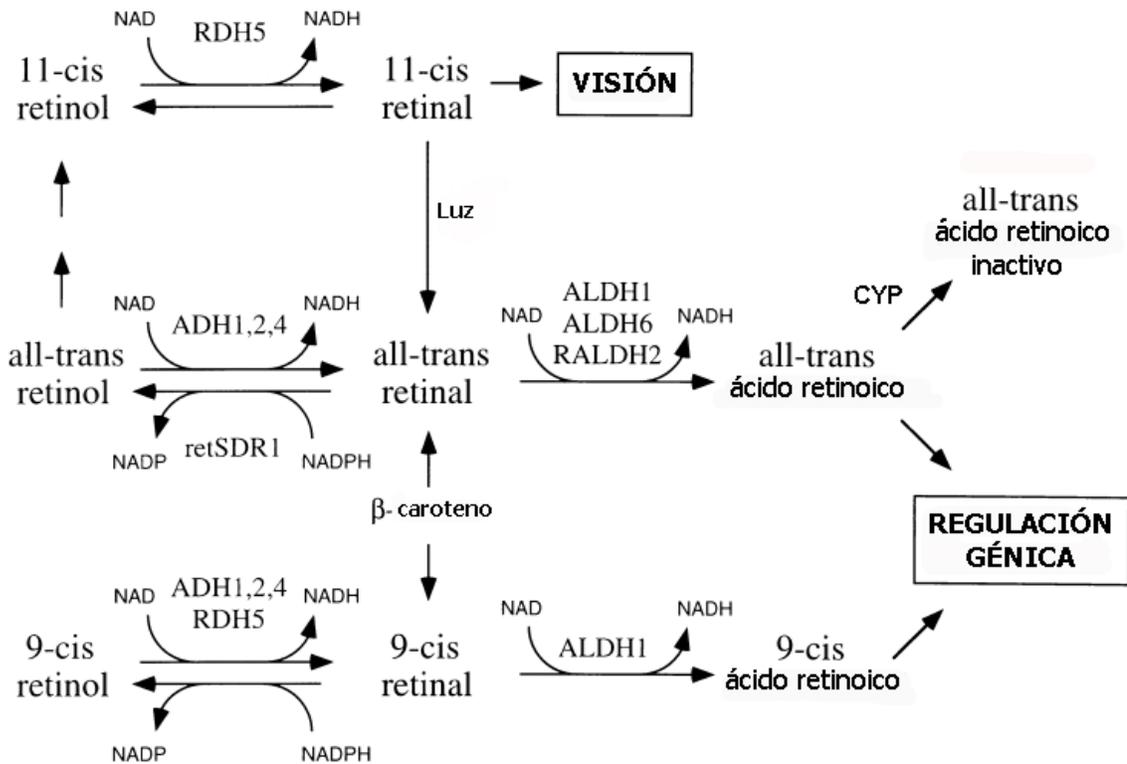


Figura 3: Pasos metabólicos catalizados por deshidrogenasas de retinoides en el metabolismo de la vitamina A.

Se ha demostrado que diversos miembros de la familia de las ADH y de las SDR catalizan la oxidación reversible de retinol a retinal. La conversión irreversible de los isómeros de retinal al correspondiente isómero de ácido retinoico (RA) ha sido demostrada para miembros de la familia de las ALDH. Las citocromos P450 (CYP) son enzimas involucradas en la desactivación del metabolito RA [Adaptado de (Duester, 2000)].

1.6 RETINOIDES Y SUS RECEPTORES EN EL SISTEMA INMUNE

La vitamina A se ha considerado importante desde que a principios del siglo XIX se le asignó la propiedad de prevenir infecciones, pero no fue sino hasta iniciado los años 80 que se comenzó a investigar su metabolismo y funciones dentro de muchas áreas científicas, incluyendo su rol en el sistema inmune, en donde tiene efectos importantes sobre mucosas, inmunidad innata e inmunidad antígeno-específica (Stephensen, 2001). Variados antecedentes de sus efectos sobre órganos y células del sistema inmune, tanto en el modelo murino, como en humanos se han recopilado.

Utilizando ratones se ha demostrado que la deficiencia de vitamina A compromete las barreras mucosas oculares, respiratorias, gastrointestinales y urogenitales debido a pérdida de células productoras de mucus (Chandra, 1988; Shoda et al., 1995; Wiedermann et al., 1995). Esto disminuye la resistencia a infecciones causadas por patógenos que normalmente quedarían atrapados en el mucus y eliminados por el flujo (Sommer, 2003). Es difícil determinar los efectos directos de la deficiencia de vitamina A en humanos, pero hay reportes que al suplementar vitamina A a niños con fuertes diarreas, se recompone la integridad normal de la mucosa entérica con mayor facilidad (Thurnham et al., 2000). Otro efecto comprobado sobre células epiteliales intestinales es la necesidad de RA para la expresión de receptores poliméricos de inmunoglobulinas (pIgR) mediada por IL-4 (Sarkar et al., 1998).

En ratas la disminución de los niveles de vitamina A afecta el desarrollo de neutrófilos y otros granulocitos, aumentando el número de células en sangre periférica aparentemente por disminución de la apoptosis (Kuwata et al., 2000), sin embargo, se ha

demostrado una disminución de su capacidad fagocítica y de destruir bacterias (Twining et al., 1997). En el mismo modelo se ha reportado que esta deficiencia provoca un aumento significativo en el número total de macrófagos en órganos linfoides secundarios (Smith et al., 1987), condición que también afecta a las células NK, las que disminuyen en número y capacidad lítica frente a células tumorales o infectadas por virus (Ross and Stephensen, 1996). Por otro lado, la adición de retinoides inhibe la producción de IL-4 inducida por antígeno en mastocitos (Hirasawa et al., 2001), e induce la expresión de receptores de quimioquinas (CCRs) en monocitos (Kim et al., 2004). Tanto en ratones como en humanos la administración de RA favorece la actividad de células de línea mieloide (Hengesbach and Hoag, 2004; Leung and Verfaillie, 2005) y en polimorfonucleares humanos en cultivo, se ha detectado un aumento en la traducción de los mRNA constitutivos de los receptores de retinoides, tras la activación con PAF *in vitro* (Yost et al., 2004).

En distintas cepas de ratones, la administración de retinoides, ha demostrado variados efectos sobre la inmunidad adaptativa. Estas moléculas aumentarían el *homing* tejido específico al incrementar la expresión de integrinas y quimioquinas en linfocitos T (Iwata et al., 2004; Johansson-Lindbom and Agace, 2004; Mora and von Andrian, 2004), aunque el efecto más notorio demostrado ha sido sobre el balance Th1/Th2, en donde el RA suprime el desarrollo de linfocitos Th1 y aumenta el de Th2 (Cantorna et al., 1994; Iwata et al., 2003). En cultivo de linfocitos B humanos, la administración de retinoides tiene como efecto la inhibición de la producción de inmunoglobulina E (Scheffel et al., 2005). En patologías humanas la administración de RA ha tenido resultados destacables,

en donde inhibe la proliferación celular, en el caso de linfoma no Hodgkin de células B (Guidoboni et al., 2005), mejora la estimulación alogénica en pacientes con cáncer, aumentando la diferenciación de células mieloides (Mirza et al., 2006), y en el caso de la leucemia aguda promielocítica, donde también se observa una diferenciación mieloide de las células que presentan un bloqueo en su maduración (Witcher et al., 2004), se ha observado incluso marcadores fenotípicos de DCs (Park et al., 2004).

1.7 RETINOIDES Y SUS RECEPTORES EN LAS CELULAS DENDRITICAS

En DCs humanas se han observado altos niveles de mRNA de los receptores RAR- α y RXR- α (Fritsche et al., 2000). La adición de altas concentraciones de RA en DCs inmaduras *in vitro*, induce apoptosis y en concentraciones adecuadas mejora la presentación antigénica a linfocitos T en presencia de TNF- α (Geissmann et al., 2003). Además, se ha demostrado que es posible generar DCs a partir de monocitos, al ser cultivados en presencia de RA y GM-CSF (Mohty et al., 2003). Este hecho también a sido demostrado en ratones, en cultivos de células de médula ósea, donde se favorece el desarrollo de DCs mieloides (Hengesbach and Hoag, 2004). Un antecedente muy importante es el hallazgo en el modelo murino, que las DCs producen RA para inducir *homing* en los linfocitos T (Iwata et al., 2004).

HIPÓTESIS

La diferenciación de monocitos a células dendríticas humanas *in vitro*, ocurre mediante un mecanismo que involucraría la participación de las enzimas **aldehído deshidrogenasas**, productoras de ácido retinoico.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Investigar si la diferenciación de monocitos a células dendríticas ocurre vía producción enzimática de ácido retinoico.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- i. Generar células dendríticas *in vitro* a partir de monocitos humanos utilizando las citoquinas IL-4 y GM-CSF, y caracterizar fenotípicamente estos cultivos a los días 0 (monocitos), día 2, 4, 6 mediante citometría de flujo, en función de la expresión de marcadores de diferenciación CD11c y CD14.

- ii. Caracterizar fenotípicamente cultivos de células dendríticas obtenidos en presencia de dietilaminobenzaldehído (DEAB), inhibidor específico de aldehído deshidrogenasas, al día 0 (monocitos), día 2, 4, 6 mediante citometría de flujo, en función de la expresión de marcadores de diferenciación CD11c y CD14.

2. MATERIALES

2.1 Reactivos Generales

Tubos cónicos 15 y 50 ml, placas de cultivo 6 pocillos; FALCON, Becton-Dickinson, USA.

Azul de Tripán de Merck, Darmstadt.

Metanol, etanol, Xilol; TCL Ltda, Chile.

Paraformaldehído, Isopropanol, Marcador DNA ladder preteñido. Winkler, Ltda. Santiago Chile.

DMSO. Sigma, St Louis, MO, USA.

RPME-1640 Penicilina/estreptomicina, L-glutamina, suero fetal bovino, BSA; Gibco BRL, Gaithersburg, NY, USA.

Ficoll-Histopaque. Axis-Shield, Oslo, Noruega.

Citoquinas recombinantes humanas, IL-4, GM-CSF, TNF- α ; USBiological, USA.

2.2 Equipos

Citómetro de Flujo FACSscan, Becton Dickinson, USA.

Centrífuga Eppendorf modelo 5810R, Hamburg, Alemania.

Microscopio Leica microsystems, Wetzlar GMBH, Alemania.

Cámara digital Canon S700 5,0 megapixels, Japon.

Espectrofotómetro Jenway 6310, USA.

Termociclador PxE, Equilab Ltda., Santiago, Chile.

3. METODOS

3.1 Obtención de monocitos de sangre periférica

La obtención de monocitos de sangre periférica se realizó a partir de concentrados leucocitarios de donantes normales (“buffy coats”), donados por el Banco de Sangre del Hospital San José y el Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. El primer paso fue aislar la fracción de células mononucleares (principalmente linfocitos, monocitos y células NK) presente en el “buffy coat” y separarlas de las plaquetas, de los eritrocitos y de los polimorfonucleares (granulocitos). Para ello, se distribuyeron los aproximadamente 50 ml de sangre presentes en el “buffy coat” en tres tubos cónicos de 50 ml, cada tubo fue llenado con tampón fosfato salino (PBS) 1X (KH_2PO_4 0,4 mM, NaHPO_4 0,6 mM, pH 7,0) y centrifugado sin freno a 1500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Al acabar la centrifugación se obtienen dos fases: una superior de un color amarillento (fase plasmática) y otra inferior de color rojo (fase celular). Se eliminó el plasma y la fase celular fue resuspendida enrasando a 35 ml con PBS 1X, luego se adicionó al tubo 10 ml de Ficoll Paque, el que se depositó directamente y lentamente en el fondo del tubo, de manera de crear una fase separada de la fase celular. A continuación se centrifugó sin freno a 1200 rpm a temperatura ambiente por 20 min.

Luego de la centrifugación el contenido se encuentra separado en tres fases: una fase superior donde se encuentran grandes cantidades de plaquetas, una fase inferior rojiza donde se depositan la mayoría de los eritrocitos y una fase intermedia blanca donde se encuentran las células mononucleares (PBMC), estas células fueron removidas,

con cuidado, y llevadas a un tubo limpio para diluirlas hasta 40 ml con PBS 1X, luego se centrifugaron a temperatura ambiente a 1200 rpm por 5 min. Posteriormente, se realizó un lavado adicional del PBMC, para eliminar los glóbulos rojos, resuspendiéndolo en 5 ml de tampón de lisis ACK (NH_4Cl 0,15M, KHCO_3 y EDTA 0,1mM) y luego de 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó durante 5 min a 1200 rpm. Posteriormente, el PBMC fue resuspendido en 30 ml de PBS 1X y centrifugando 5 min a 1200 rpm como último lavado. El PBMC obtenido fue resuspendido en medio de cultivo RPMI conteniendo 10% suero fetal bovino (SFB), realizando un conteo de células en una cámara de Neubauer. A continuación se sembraron 30×10^6 células en 3 ml de RPMI 10% SFB, por pocillo en una placa de cultivo de 6 pocillos (Falcon). Después de 2 horas de incubación a 37 °C en estufa de CO_2 , se removieron las células no adherentes y los monocitos adheridos a la placa se lavaron varias veces de forma suave con PBS 1X, temperado para eliminar el máximo número de linfocitos de los pocillos. Los monocitos fueron utilizados para ser diferenciados a DCs como se describe a continuación.

3.2 Inducción de diferenciación de monocitos a células dendríticas

Para diferenciar la población de monocitos a DCs, una vez obtenidos los monocitos y estando adheridos a la placa de 6 pocillos, fueron añadidos 2,5 ml de medio RPMI 1640, suplementado con 10% SFB, una mezcla de antibióticos (penicilina 100U/l, estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$) y L-glutamina 1 mM a cada pocillo. Adicionalmente se agregó citoquinas recombinantes 500 U/ml de IL-4 (Sigma) y 800 U/ml de GM-CSF (Leucomax 400, Novartis) para inducir la diferenciación celular. Al día dos de cultivo,

se agregaron 2,5 ml de RPMI 1640 por pocillo, suplementado de la misma manera, cuidando de mantener todas las concentraciones invariables. Al día 4 de cultivo, se removieron 2,5 ml de RPMI 1640, por pocillo, para restituir esa misma cantidad de nuevo medio de cultivo con los suplementos necesarios. Las células pudieron ser removidas al día 6, en un estado de DCs inmaduras, o bien, se agregó LPS en concentración de 1 ug/ml para inducir maduración, estado en el que fueron recuperadas 24 horas después (día 7).

3.3 Inducción de la diferenciación con ácido retinoico

Para diferenciar la población de monocitos a DCs utilizando RA, se procedió de la misma manera descrita anteriormente, con la diferencia de que para este experimento no se adicionó al cultivo la citoquina IL-4, la que fue reemplazada por RA en concentración final de 1pM.

3.4 Inhibición de la diferenciación de monocitos a células dendríticas

Para generar la condición de inhibición de la diferenciación, a un cultivo realizado con IL-4 y GM-CSF (cultivo estándar) o al realizado con RA y GM-CSF (cultivo RA) se le adicionó junto con el RPMI 1640 suplementado, 30 μ M de dietilaminobenzaldehído (DEAB) de concentración final, por pocillo. Las células mantenidas bajo estas condiciones fueron removidas al día 6 para compararlas con las DCs inmaduras, o al día 7 luego de ser enfrentadas a LPS para compararlas con las DCs maduras.

3.5 Análisis por citometría de flujo

Las células fueron despegadas de la placa de cultivo utilizando un “cell scraper”, depositándolas luego en tubos cónicos, por separado las células estimuladas con IL-4 y GM-CSF, las sometidas al estímulo de RA y GM-CSF y las que estuvieron bajo inhibición con DEAB. Las células se contaron en cámara de Neubauer verificando la viabilidad celular mediante la exclusión de azul de Tripán y se lavaron posteriormente con PBS 1X, después de centrifugar las células fueron resuspendidas en PBS 1X en volumen adecuado para asegurar 3×10^5 células por 100 μ l, este volumen se agregó por pocillo en una placa de 96 pocillos, fondo V. Se centrifugó la placa durante dos minutos a 2000 rpm, se eliminó el sobrenadante y cada pocillo se incubó con 100 μ l de solución PBS-plasma humano al 10%, a temperatura ambiente, durante 15 min. Luego de centrifugar la placa, se eliminó el sobrenadante y fueron agregados los anticuerpos anti-CD11c, y anti-CD14. Pocillos a los que no se agregó anticuerpo fueron utilizados como controles. Esto se realizó para todas las condiciones de cultivo celular. Después de 30 min de incubación en oscuridad a 4° C, la placa fue centrifugada y lavadas las células en sus pocillos con 200 μ l de PBS 1X – SFB 1%, en 3 oportunidades y luego fijadas con PBS-paraformaldehído al 2% en SFB al 0,1% y guardadas a 4°C en oscuridad hasta su análisis. Las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo (FACSort; BDPharmingen) y analizadas utilizando el software CellQuest.

3.6 Diseño de partidores específicos para ALDH1A1 y ALDH1A2

Actina sirvió como gen control y la secuencia de sus partidores se obtuvo de secuencias publicadas en la literatura. Todos los partidores para ALDH fueron diseñados en nuestro laboratorio utilizando el programa VectorNTI, o la utilidad OligoAnalyzer 3.0 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>), usando secuencias de mRNA obtenidas de GenBank (secuencias y números de registro en Tabla 1). Ambos partidores para ALDH1A2 fueron diseñados de manera de incluir las posibles variantes de “splicing”. Todos los partidores fueron sintetizados por AlphaDNA (Montreal).

Tabla 1. Secuencia de partidores de ALDH humana.

| Gen | Secuencia partidores 5' → 3' | Tamaño producto PCR | Registro Gene |
|---------|---|---|----------------------------------|
| ALDH1A1 | F → GGCCGCAAGACAGGCTTTTCAGA R → GCTCAGTGCAGGCCCTATCTTCCA | 361pb | 25777722 |
| ALDH1A2 | F → GGAACTTCCCCCTGCTGATGTTT R → GACTTTTGCCTCCAAGTTCCAGAG | variante1 318pb variante2 204pb variante3 318pb | 25777723 25777725 25777727 |

3.7 Extracción de RNA total y RT-PCR

Entre 1 – 6 millones de monocitos sin tratamiento o con estímulo de diferenciación, al día 2, día 4, día 6 o día 7 de tratamiento, se utilizaron para la extracción de RNA total utilizando el método de Trizol (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA obtenido se determinó por espectrofotometría. La reacción de síntesis de la primera hebra de cDNA mediante RT-PCR se efectuó a 1 µg de RNA total de cada muestra en 20 µl de mezcla de reacción, que contenía: 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 500 µg/ml oligo (dT), 1 µl de dNTP Mix 10 mM (10 mM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 2 µl de ditiotretitol (DTT) 0,1 M y 200 unidades de enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). La mezcla se incubó, según las indicaciones del fabricante, durante 50 min a 37°, y luego 15 min a 70° para terminar la reacción. Bajo estas condiciones de RT-PCR, los niveles de mRNA de cada muestra se pudieron determinar semicuantitativamente.

3.8 PCR semicuantitativo para ALDH

La reacción de PCR semicuantitativo se realizó por 38 ciclos; 1 min desnaturalización a 94°, 1 min de alineamiento a 60° y 1 min de extensión a 72° utilizando un termociclador (PxE, Equilab Ltda., Santiago, Chile). El resultado de la reacción de PCR fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 2% - bromuro de etidio. Los niveles de mRNA para las ALDH y actina se cuantificaron por escaneo densitométrico utilizando el programa ImageJ 1.38 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). La razón de las

densidades de mRNA de ALDH versus la densidad de mRNA de actina, gen control, es la que se ha calculado para cada condición.

3.9 Medición de actividad enzimática

Se extrajeron proteínas de cada una de las condiciones de cultivo establecidas. Para ello, se resuspendieron aproximadamente 2 millones de células en tampón fosfato 50mM pH 7,5 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), se sonicaron en hielo 3 veces por 10 seg enfriando a intervalos de 10 seg y se centrifugaron durante 30 min a 14000 rpm, del sobrenadante se efectuó determinación de proteínas utilizando el “kit” de BioRad (BioRad D_c Protein Assay), para lo cual se tomó una alícuota de 5 μL y se le agregó 25 μL de una mezcla de los reactivos A y S en la proporción 50 A: 1 S y luego 200 μL del reactivo B, agregados en pocillos de una placa de 96. La placa se analizó en un lector de ELISA a 630 nm. Para medir la actividad enzimática se preparó una mezcla de reacción tampón fosfato 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 100 mM, NAD^+ 100 μM y 1 μg de proteína. La reacción se inicia por la adición de retinal 20 μM , sustrato de la enzima ALDH. La actividad se evaluó espectrofotométricamente, a 340 nm, por la aparición de NADH, utilizando un coeficiente de extinción de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La determinación se efectuó por un periodo de 8 min, comprobándose la existencia de un comportamiento lineal. Los valores fueron expresados como μmoles de NADH producido por minuto por cada μgramo de proteína.

3.10 Inmunofluorescencia

Se preparó un cubre objetos estéril, incubándolo durante una hora con 100 μ l de polilisina para proveer una adhesión celular apropiada, y lavando 3 veces con PBS. 200.000 DCs provenientes de un cultivo estándar como control o DCs mantenidas bajo inhibición con DEAB, se fijaron sobre el cubre objetos con 70% metanol frío durante 10 min, se lavaron 2 veces con PBS, para luego bloquear con 5% BSA-PBS durante 1 hora. Posteriormente, se lavo con PBS para luego agregar faloidina y el anticuerpo primario CD11c, en buffer fosfato- BSA 1%, se incubó a 4°C toda la noche. Antes de incubar con el anticuerpo secundario conjugado por 1 hora, se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 min. Finalmente, las células se analizaron por microscopía confocal (Objective X63, LSM 510; Carl Zeiss MicroImaging).

3.11 Ensayo de fagocitosis

Tanto DCs provenientes de un cultivo estándar como DCs mantenidas bajo inhibición con DEAB, fueron mantenidas en cultivo con 0,05 μ g/ μ l de dextran-FITC durante 2 horas a 4°C como control basal de fagocitosis, y otro grupo de células se mantuvo a 37°C para observar la fagocitosis real. Posteriormente, las células fueron lavadas en dos oportunidades con PBS para luego ser fijadas con paraformaldehído al 2% y analizarlas por citometría de flujo.

3.12 Viabilidad celular

La cantidad de células muertas se analizó midiendo la incorporación de yoduro de propidio (PI) en los cultivos. Para ello, DCs provenientes de cultivo estándar y DCs mantenidas bajo inhibición con DEAB, se prepararon para ser analizadas por citometría de flujo como se indicó anteriormente, realizando el análisis inmediatamente después de la extracción. Previo a la medición en el equipo, se adicionó a cada muestra 10 μ l de PI (solución “stock” de 0.5 mg/ml). Una muestra de DCs estándar y otra de DCs inhibidas sin marcar con PI se utilizaron como blancos en el análisis.

3.13 Análisis estadístico

Los resultados fueron presentados como el promedio de las mediciones + su desviación estándar (DS), gráficamente las barras de error representan la DS. El análisis estadístico fue hecho con el programa GraphPad Prism 4. Se utilizó análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia. Todos los datos son representativos de por lo menos tres experimentos independientes.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización fenotípica de células dendríticas humanas diferenciadas con IL-4 y GM-CSF, en ausencia y presencia de DEAB *in vitro*.

A medida que los monocitos (Mo) se diferencian a DCs, la población celular aumenta su tamaño (FSC) y su granularidad (SSC) en el tiempo, de manera que la población inicial se desplaza hacia arriba y a la derecha. Este cambio en FSC y SSC no es tan evidente en el cultivo de monocitos en presencia de DEAB (Figura 4a). Las diferencias de tamaño se hacen patentes en la microscopía, en donde se aprecia una diferencia estructural entre las células cultivadas en condiciones normales, las que se presentan como células grandes y con proyecciones citoplasmáticas, en tanto que las células mantenidas con DEAB se observan más pequeñas y redondas (Figura 4b).

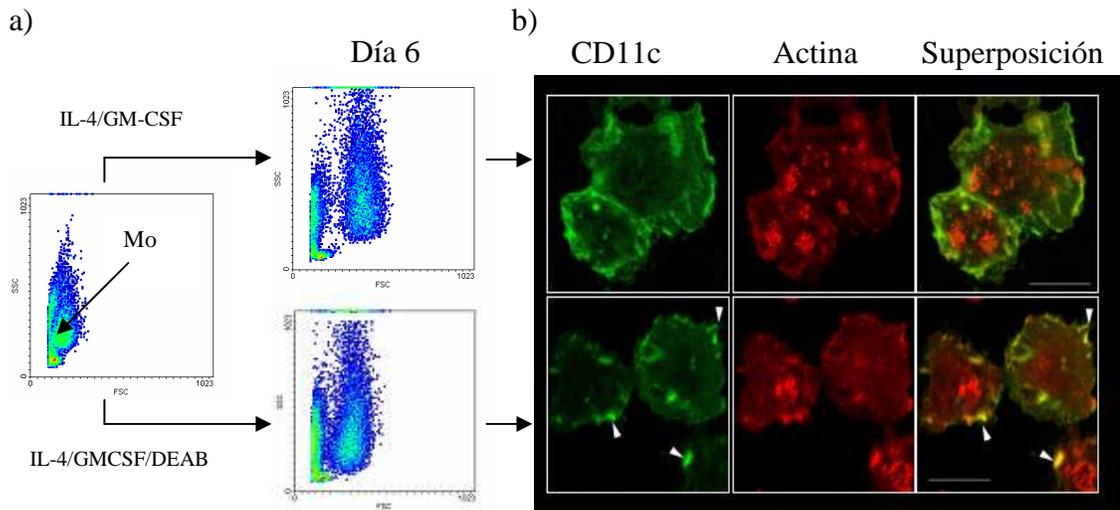


Figura 4: Perfil fenotípico de la diferenciación de monocitos a células dendríticas en condiciones normales y bajo estímulo de DEAB.

a) “Dotplots” representativos de la diferenciación de un cultivo de monocitos (Mo) a DCs (día 6) *in vitro*, bajo condiciones normales de IL-4 y GM-CSF, en ausencia y presencia de DEAB. b) Morfología de un cultivo diferenciado al día 6, en ausencia (panel superior) y presencia de DEAB (panel inferior), se muestra inmunofluorescencia para CD11c (verde) y actina (rojo). Flechas blancas indican sitios de colocalización de CD11c y actina.

Para verificar si existen diferencias en la expresión de marcadores de superficie entre los cultivos normales y los estimulados con DEAB, cuantificamos mediante citometría de flujo su aparición a diferentes días a lo largo del cultivo. Se determinó CD11c, proteína propia de DCs y de muy baja expresión en un linaje de monocitos, y CD14 proteína expresada preferencialmente en monocitos y muy poco en DCs.

El nivel de CD11c, a medida que ocurre la diferenciación a DC, en condiciones normales, aumenta considerablemente hasta alcanzar una media de $60,4 \pm 3,6$ % de células positivas, del total de la población al día 6, mientras que en el cultivo con DEAB se detecta una media de $36 \pm 1,6$ %. Para CD14, al día 6 de cultivo en condiciones normales, se observa una media de $10 \pm 2,4$ % de células positivas del total de la población, mientras que para el cultivo con DEAB, el porcentaje de células positivas es de $47,1 \pm 2,4$ % del total (Figura 5a).

La intensidad de fluorescencia media (MFI), indicador de la densidad de proteínas que poseen las células en la membrana, en nuestros cultivos mostró un patrón similar al obtenido por porcentaje de población. Las células mantenidas con DEAB presentaron menos densidad de proteínas CD11c en su superficie que las producidas en condiciones normales a lo largo de todo el cultivo (día 2, día 4 y día 6). También se detectó diferencias en la localización de CD11c, según lo observado en la inmunofluorescencia (Figura 4b). En tanto, la intensidad de CD14 en los cultivos normales disminuyó, en presencia de DEAB se mantuvo prácticamente invariable a lo largo del cultivo (Figura 5b).

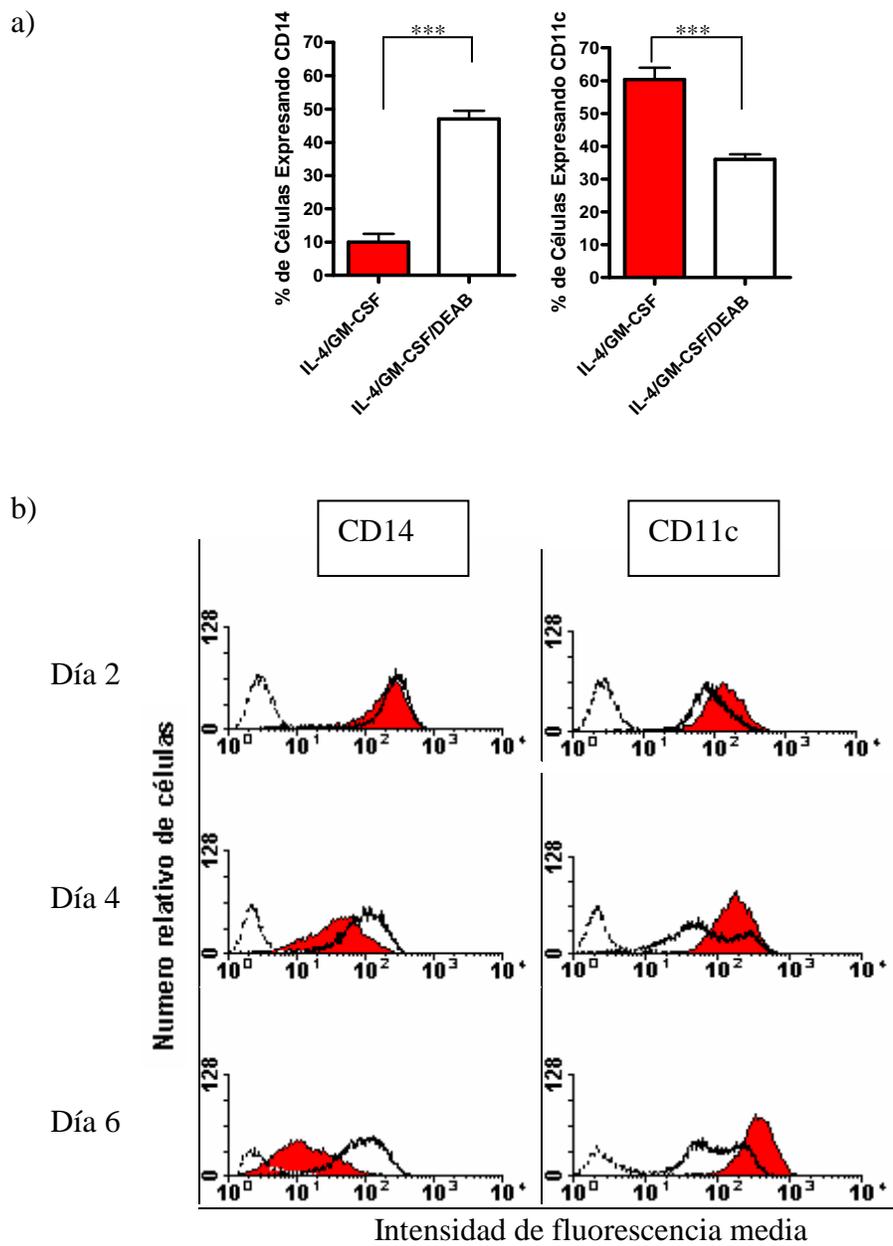


Figura 5: Caracterización fenotípica de los cultivos de células dendríticas en condiciones normales y mantenidas en cultivo con DEAB.

a) porcentaje de células positivas del total de la población para los marcadores CD11c y CD14. (n=6). *** $p < 0.0001$. b) Intensidad de fluorescencia media para cultivos a los días 2, 4 y 6 para las condiciones: normal ■ y con DEAB □.

4.2 Evaluar el efecto de DEAB sobre células dendríticas generadas con ácido retinoico (RA).

Para determinar si la acción de DEAB tiene un efecto directo sobre las enzimas deshidrogenasas, se ensayó su presencia en cultivos de DCs producidas con RA, que es el producto metabólico de la enzima ALDH. De esta manera generamos DCs de manera independiente de la enzima.

La población de células positivas para CD11c, generadas de esta manera, al día 6 mantiene niveles de CD11c similares a las generadas con el método estándar, ya que las células obtenidas en condiciones normales, y las generadas con RA y GM-CSF presentan un $63,8 \pm 2,8$ % y $58,9 \pm 3,6$ % de la población positiva, respectivamente. Al agregar DEAB al cultivo normal, la población positiva se reduce a un $35,1 \pm 3,6$ %, mientras que la adición al cultivo con RA no presenta variación en la población ($59,2 \pm 2,7$ %) (Figura 6a). El cultivo con GM-CSF se utilizó como control de expresión basal de CD11c. Al medir la intensidad de fluorescencia media el resultado fue similar, MFI $779,2 \pm 30,2$ y $737,5 \pm 45,8$, respectivamente para las células obtenidas en condiciones normales, y las generadas con RA. En tanto, los cultivos que contenían DEAB mostraron niveles similares de CD11c (MFI $741,1 \pm 42,2$) a los crecidos en ausencia de inhibidor (Figura 6b), no presentando alteraciones fenotípicas a juzgar por su tamaño (FSC) y granularidad (SSC).

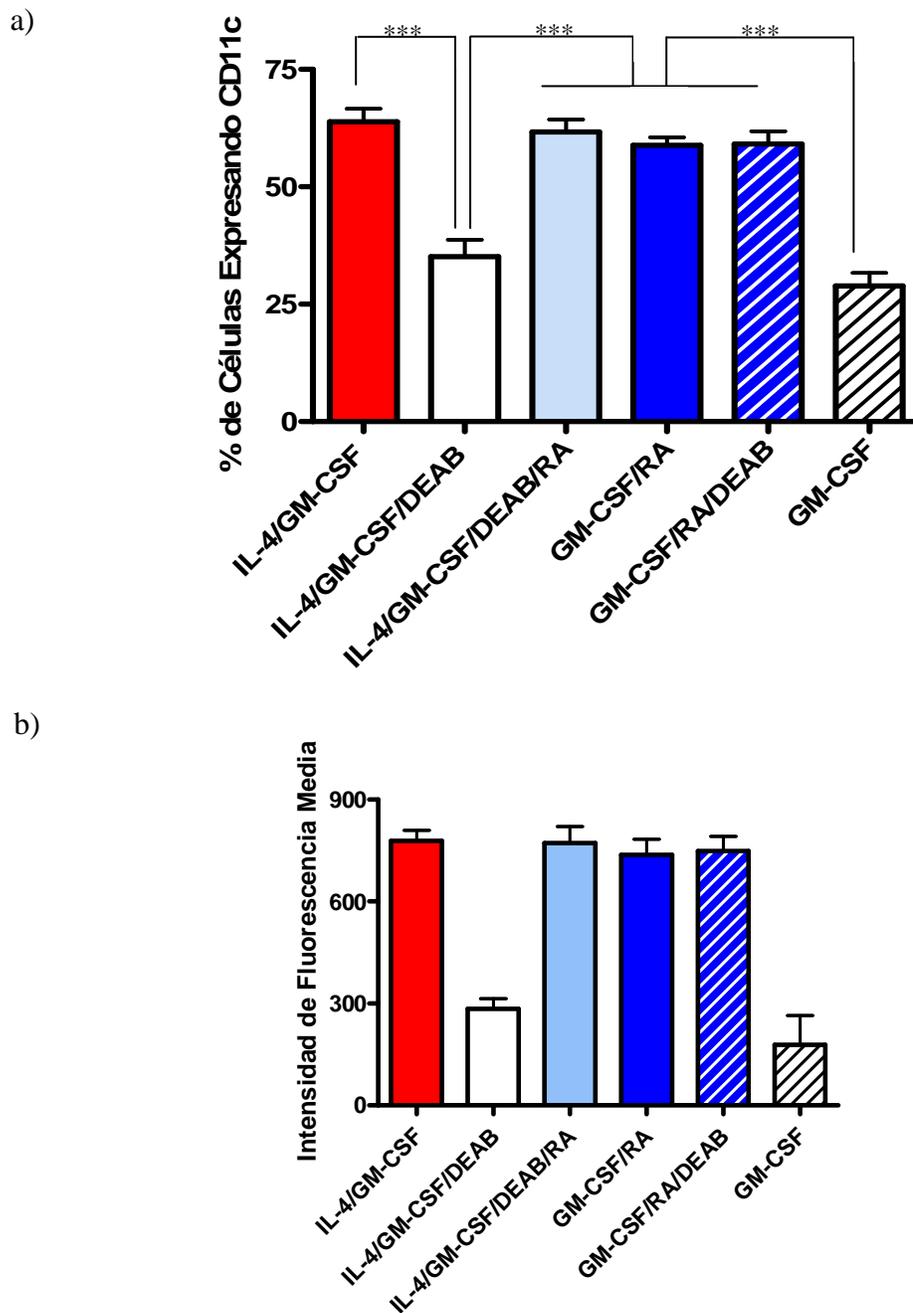


Figura 6: Comparación fenotípica de células dendríticas generadas con IL-4/GM-CSF, y ácido retinoico, en presencia y ausencia de DEAB.

a) porcentaje de células que expresan CD11c del total de la población, para cada condición. *** $p < 0,001$ b) Intensidad de fluorescencia media (MFI) de la expresión de CD11c para cada condición. (n=5, para cada condición).

4.3 Evaluar la funcionalidad de las células tratadas con DEAB.

Con el objeto de evaluar la funcionalidad de las células generadas en presencia de DEAB, se determinó la viabilidad celular a distintas concentraciones de DEAB, y si esta adición afectaba también un parámetro funcional como la fagocitosis, comparándose con las células generadas en condiciones normales. La incorporación de Ioduro de propidio (PI) al día 6, en las células sometidas al estímulo inhibitorio (DEAB) fue, medido en porcentaje de células muertas, $11,54 \pm 1,43$ % al agregar $10 \mu\text{M}$ de DEAB, $11,19 \pm 1,17$ % con $30 \mu\text{M}$ y $11,34 \pm 1,00$ % cuando la concentración fue $50 \mu\text{M}$, porcentaje equivalente al presentado por las células en condiciones normales $11,48 \pm 1,30$ % (Figura 7a).

La fagocitosis observada en las células cultivadas en presencia de DEAB fue ligeramente menor a la presentada por las células normales a 37°C , valores en MFI de $312,0 \pm 16,9$ y $431,0 \pm 26,8$, respectivamente. Esta diferencia resultó ser significativa (* $p=0,034$), al igual que al compararlas con DCs normales maduras con LPS (MFI $197,5 \pm 24,7$) (* $p=0,032$). Algo interesante es que las células cultivadas con DEAB y que fueron tratadas con LPS para ser maduras, presentaron una fagocitosis comparable al control a 4°C , MFI de $56,0 \pm 8,4$ y $54,0 \pm 8,4$, respectivamente.

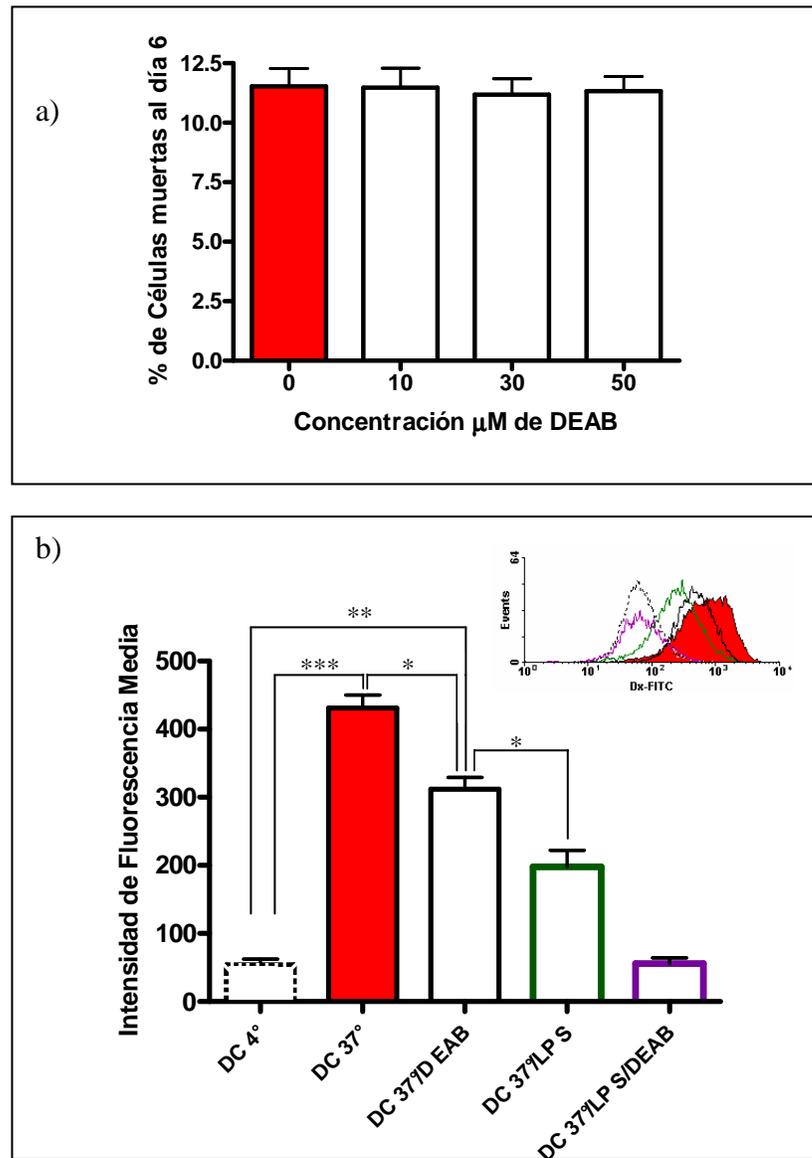


Figura 7: Análisis funcional de células dendríticas (DCs) generadas en condiciones normales, en presencia y ausencia de DEAB.

a) % de células muertas al día 6 en cultivos normales en ausencia ■ y en presencia de distintas concentraciones de DEAB, $p=0,985$. b) Comparación de la actividad endocítica de DCs inmaduras a 37°C, y DCs maduras con LPS a 37°C en ausencia y presencia de 30 μM de DEAB. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. Se incluye un histograma representativo de la actividad endocítica, en donde cada curva conserva el color de la condición indicada en el grafico. DCs a 4° corresponde a un control negativo (para todas las condiciones $n = 4$).

4.4 Determinación de la expresión de enzimas aldehído deshidrogenasas mediante RT-PCR semicuantitativo.

Con el objeto de determinar si en un cultivo estándar de monocitos sometidos al estímulo diferenciador existía expresión de alguna enzima aldehído deshidrogenasa y si a medida que avanzaron los días de cultivo se manifestó alguna diferencia en esa expresión, se utilizó RT-PCR semicuantitativo para dos enzimas de la familia; ALDH1A1 y ALDH1A2, los protocolos y métodos utilizados se describieron en la sección Materiales y Métodos.

Se pudo detectar que los monocitos expresan bajos niveles de ALDH1A1, como se observa en la Figura 8. Paradojalmente, al día 2 de cultivo no se observó expresión, bajo las condiciones de experimentación utilizadas. Durante los días 4 y 6, los niveles de mRNA aumentan, y al agregar LPS ocurre una ligera disminución (Figura 8a). El comportamiento de la expresión del mRNA se grafica en la Figura 8b.

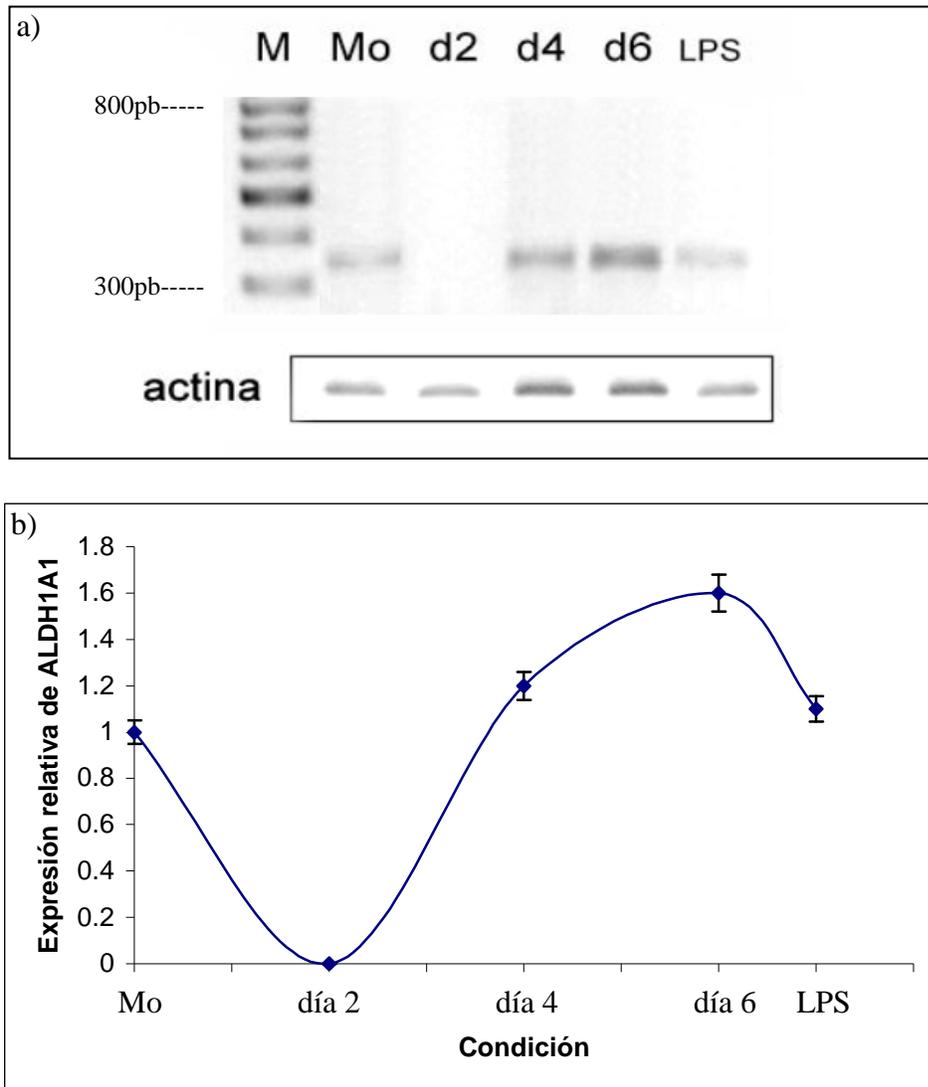


Figura 8: Expresión de aldehído deshidrogenasa 1A1 (ALDH1A1) en monocitos y células a distintos días de diferenciación a células dendríticas.

a) PCR representativo, en donde se observa la expresión de mRNA, banda de 361 pb. M: Marcador de tamaño molecular, Mo: Monocitos sin tratamiento, d2: día 2, d4: día 4, d6: DCs inmaduras, LPS: DCs maduras. b) Cambio en la expresión de ALDH1A1 en la generación de DCs. Valores normalizados con la expresión de actina, considerándose el de Mo igual a 1. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes.

En la expresión del mRNA para ALDH1A2 se observa, tanto en monocitos, como en las células a distintos días de diferenciación, una banda de aproximadamente 300 pares de bases (pb) que a medida que progresa el cultivo no presenta variación significativa. A partir del día 2 aparece una nueva banda de aproximadamente 204 pb, la que a partir de ese momento comienza a disminuir su expresión manteniéndose en niveles constantes incluso después de la maduración de las DCs (adición de LPS) (Figura 9a), el comportamiento de la expresión del mRNA se grafica en la Figura 9b.

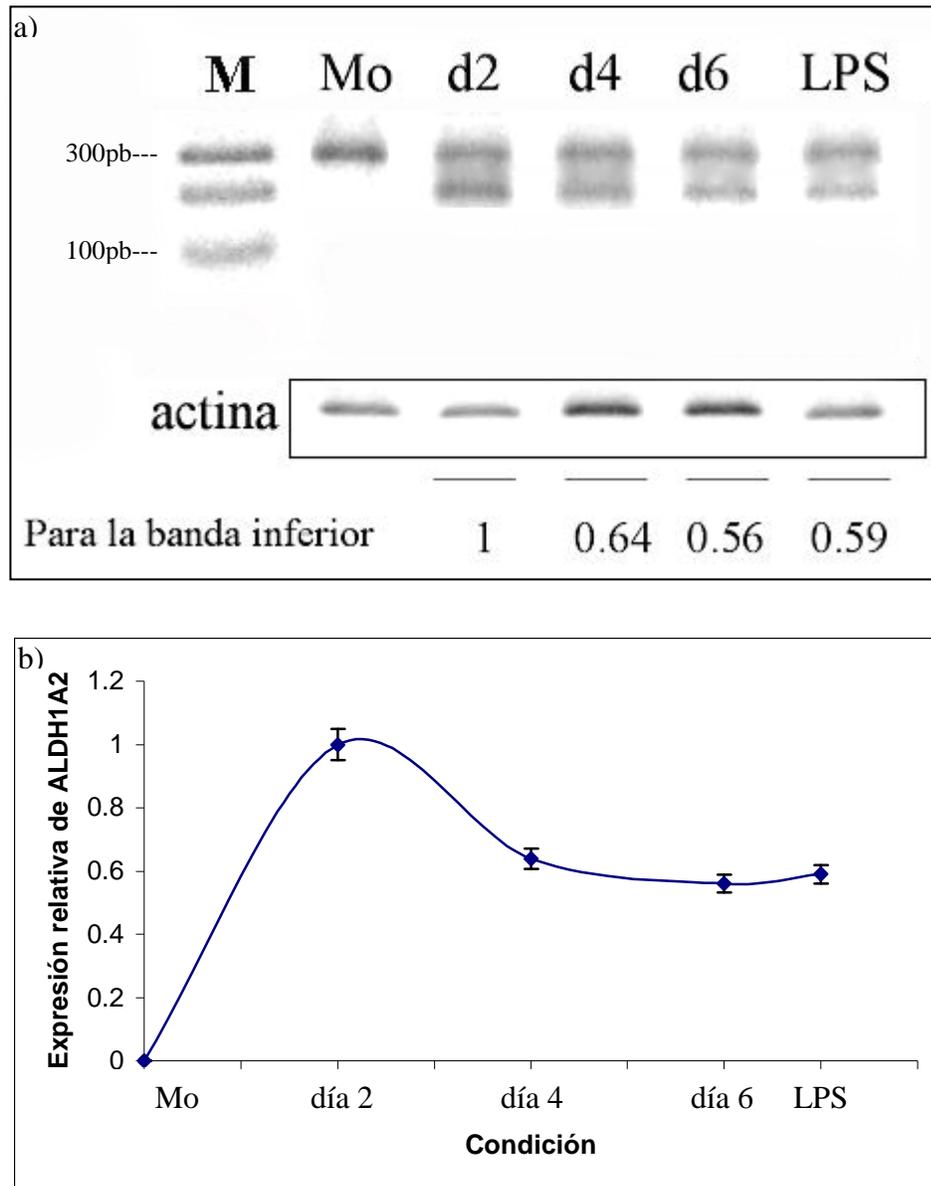


Figura 9: Expresión de aldehído deshidrogenasa 1A2 (ALDH1A2) en monocitos y células a distintos días de diferenciación a células dendríticas.

a) PCR representativo en donde se observa la expresión de mRNA, banda superior de 318 pb y banda inferior de 204 pb, ausente en monocitos. Se indica el valor relativo de la expresión de la banda inferior, excluyendo Mo. M: marcador de tamaño, Mo: Monocitos sin tratamiento, d2: día 2, d4: día 4, d6: DCs inmaduras, LPS: DCs maduras. b) Cambio en la expresión de ALDH1A2 en la generación de DCs. Valores normalizados con la expresión de actina, d2 se considera como valor 1. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes.

4.5 Determinación de la actividad enzimática de aldehído deshidrogenasa ALDH1A1 y/o ALDH1A2.

Para determinar la capacidad de las células para producir RA, se cuantificó la actividad enzimática de ALDHs en células de un cultivo estándar a distintos días, midiendo la producción de NADH, por espectrofotometría a 340 nm. Dado que tanto ALDH1A1, como ALDH1A2, poseen retinal como sustrato, no se descarta la posibilidad de detectar la actividad de ambas enzimas simultáneamente. El NADH se produce junto con el RA, tras la oxidación del retinal en presencia de NAD⁺. Los monocitos de sangre periférica, separados, sin tratamiento alguno, y los monocitos mantenidos en cultivo en ausencia y presencia de GM-CSF, no presentaron actividad enzimática. A partir del día 2 se observa un aumento significativo en la producción de NADH, al igual que al día 4, $2,4 \pm 0,2$ y $2,5 \pm 0,3$ μ moles de NADH/minuto, respectivamente (Figura 10b). En tanto, al día 6, junto con las muestras tratadas con LPS, se detectaron altos niveles de actividad enzimática, aunque de menor magnitud que en los días anteriores ($1,8 \pm 0,1$ y $1,6 \pm 1,1$ μ moles de NADH/minuto).

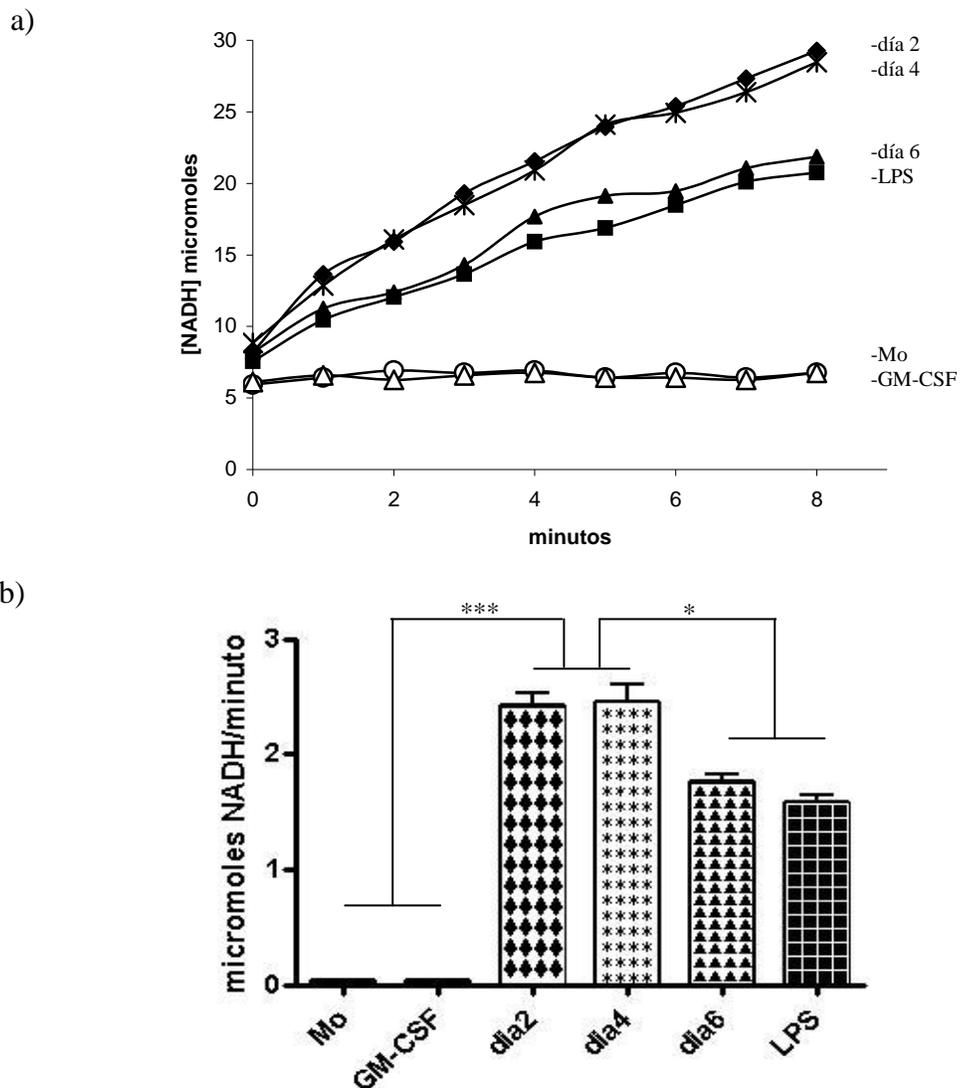


Figura 10: Actividad enzimática de aldehído deshidrogenasa en células en proceso de diferenciación desde monocitos a células dendríticas.

a) Gráfico representativo del progreso de la actividad enzimática en el tiempo, para distintas condiciones. -○-: monocitos; -△- : monocitos + GM-CSF por 48 horas, ◆ : día 2 de cultivo, -*-: día 4 de cultivo, -▲-: día 6 de cultivo, -■- : LPS. b) actividad enzimática en μ moles de NADH producido por minuto. Entre día 2 y 4 no hay diferencias significativas, $P > 0,05$; al igual que entre día 6 y LPS, $P > 0,05$. *** $p < 0,001$ y * $p < 0,05$. (n=4, para cada condición).

5. DISCUSIÓN

La generación de DCs *in vitro* se ha vuelto una herramienta de gran utilidad en inmunología, debido a la capacidad de estas células para controlar la capacidad y la magnitud de la respuesta inmune. No se encuentran datos concretos de un mecanismo, ni de que moléculas están involucradas en el proceso de generación de DCs a partir de monocitos, y solo existen antecedentes respecto de la utilización de distintas citoquinas y las consecuencias en la inmunogenicidad de las DC. Nosotros proponemos que las enzimas ALDH son participantes activas del proceso de diferenciación.

En la generación de DCs *in vitro* a partir de monocitos humanos, se utilizan medios de cultivo suplementados con suero (RPMI 1640) y sin suero fetal bovino (AIM-V, X-VIVO 15, y X-VIVO 20), en nuestro caso utilizamos RPMI con 10% de suero fetal bovino (SFB). Bajo estas condiciones el rendimiento y viabilidad en la producción de DCs a partir de monocitos resulta ser mejor que en la ausencia del SFB (Peng et al., 2005). Postulamos que la diferencia se debe a que en el SFB existe una cantidad aproximada de 0,5 $\mu\text{mol/litro}$ de retinol (Hengesbach and Hoag, 2004), cantidad suficiente para ser metabolizada a RA por las células en cultivo. El retinol es transportado en relativamente altas concentraciones por todo el organismo, estando disponible esencialmente para todas las células para su potencial conversión en RA (Duester, 1996), pudiendo ingresar por interacciones hidrofóbicas con la membrana plasmática o por endocitosis (De Luca, 1991).

Para determinar la diferenciación celular se midió la expresión de CD11c, proteína presente en gran cantidad en DCs y no en monocitos, y también se midió CD14,

marcador de linaje de monocitos con muy baja presencia en DCs, de manera que un cultivo normal de DCs, presenta una gran cantidad de CD11c, mientras que prácticamente carece de la expresión de CD14. Se observa en las Figura 4 y Figura 5, que la adición del inhibidor específico de deshidrogenasas (DEAB) detiene la diferenciación de monocitos a DCs. Algo que es evidente, es que existe parte de la población mantenida bajo inhibición (35%), que comparada con monocitos, presenta un fenotipo de DCs, a juzgar por los niveles de CD11c y CD14 detectados con citometría. Se han identificado enzimas capaces de sintetizar RA a partir de retinal, pertenecientes a las citocromos P450, CYP1A1 y CYP1A2 (Nagl et al., 2002), presentes en células de línea mieloide, que podrían suplir la necesidad metabólica de RA en caso que las ALDH se vean afectadas, tal como se ha propuesto en algunos casos (Kastan et al., 1990), ello podría explicar por que la inhibición no es total. A la inmunofluorescencia es notorio que el tamaño de las células tratadas con DEAB es mucho menor que el de las DCs normales y que la expresión de marcadores se ve afectada. Especulamos que CD11c es una proteína preformada en el interior de los monocitos y no se expresa en la superficie debido a que en el interior de la célula se encuentra colocalizada con actina (flechas blancas, panel inferior Figura 4c), Este hecho ha sido señalado previamente con respecto a otras proteínas de membrana, como CD83, presentes en DCs maduras (Cao et al., 2005), además, que es posible expresar CD11c en monocitos luego de ser activados con péptido muramil (Darcissac et al., 1996).

Se sabe que se pueden generar DCs utilizando RA en concentración única de 1pM. Las células generadas son células idénticas fenotípicamente a las DCs inmaduras

producidas bajo el estímulo normal (Mohty et al., 2003). Al probar el efecto que tiene la adición del inhibidor sobre el cultivo con RA, no se observa una disminución en la expresión de CD11c, y por lo tanto, en la diferenciación de las células, indicándonos que en este caso la diferenciación está ocurriendo de manera independiente de la enzima aldehído deshidrogenasa. La única concentración efectiva a la que se pueden generar DCs con RA es 1pM (Mohty et al., 2003), a concentraciones más elevadas el porcentaje de DCs es notoriamente más bajo, y otros retinoides producen incluso apoptosis (Geissmann et al., 2003), estos antecedentes son indicativos de que la acción de RA sobre sus receptores es específica y dependiente de la concentración, avalado por el hecho de que los dos receptores de retinoides presentan dos sitios de unión al ligando y, RXR en el heterodímero tiene un rol regulador (Szanto et al., 2004).

El porcentaje de la población positiva para CD11c no disminuye debido a un aumento de la muerte celular luego de la administración de DEAB, tal como se comprobó al medir la incorporación de PI de los cultivos de DCs a distintas concentraciones de DEAB. Junto con ensayar la concentración a utilizar en los demás experimentos, se escogió una concentración más baja y una más alta, en ningún caso la muerte celular de los cultivos bajo inhibición es significativa con respecto a la registrada en condiciones normales (Figura 7a). El PI se une a las hebras de ácido nucleico de las células, pero para hacerlo debe necesariamente atravesar la membrana plasmática, la única manera en la que el PI puede atravesar la membrana es que la célula se encuentre en estado de necrosis o apoptosis avanzada, por lo que se utiliza para medir la cantidad de células muertas (Darzynkiewicz et al., 1992). Para verificar si el DEAB afecta la

funcionalidad de las DCs utilizamos la fagocitosis como rasgo importante de la función de las DCs inmaduras. Como se observa en la Figura 7b, la fagocitosis a 37°C de los cultivos mantenidos con DEAB es menor a la fagocitosis normal (*P<0.05) a 37°C, pero es mayor que la fagocitosis de las DCs maduras (LPS) (*P<0.05), es decir nuestras células inhibidas fagocitan activamente, pero en menor grado que los monocitos, sabiendo que no existe diferencia significativas en la capacidad fagocítica entre monocitos y DCs (Nagl et al., 2002). Así, el inhibidor afecta este parámetro, lo que concuerda con antecedentes descritos previamente, que señalan que la carencia de vitamina A afecta la capacidad fagocítica de las células (Sijtsma et al., 1991). La fagocitosis de las células mantenidas en inhibición que se maduraron con LPS es muy baja, solo comparable al control negativo mantenido a 4°C, este hecho se debe presumiblemente a muerte celular tras la adición del LPS, puesto que al momento de medir la población positiva en la incorporación de Dextran-FITC, esta disminuyó drásticamente. Es posible que el estímulo inflamatorio induzca la apoptosis en ausencia de RA, se ha reportado algún tipo de interacción en ambas vías de señalización (Antonyak et al., 2003; Zhang and Rosdahl, 2004).

La expresión de enzimas retinal deshidrogenasas en las células es esencial para su buen funcionamiento, en la línea mieloide, hasta el inicio de esta tesis, sólo había sido reportada en células mielopoieticas CD34+ (Storms et al., 2005), eritrocitos (Johnson et al., 1992) y monocitos humanos (Kastan et al., 1990), y fue recientemente en septiembre del 2006 (Szatmari et al., 2006) donde se indicó la presencia de ALDH1A2 en DCs humanas. Las isoenzimas citosólicas que pudieran catalizar la conversión de retinal a

RA son ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3, y ALDH8A1 (Sladek, 2003), en esta tesis se pesquisaron las expresiones solo de las dos primeras, en vista de que existen pocos antecedentes acerca de la función que cumplirían las otras dos, lo que no quiere decir que las enzimas no estudiadas no pudieran participar en este proceso metabólico, en el modelo estudiado. El resto de las aldehído deshidrogenasas no están involucradas en la generación de RA (Duester, 2000). Para investigar la presencia y cambios en la expresión de alguna de las isoenzimas más importantes realizamos PCR semicuantitativo de muestras de distintos días en un cultivo normal de DCs. Para ALDH1A1, tal como se observa en la Figura 8, el monocito presenta una expresión basal baja de esta isoenzima, como era de esperar, según lo informado en la literatura (Kastan et al., 1990). Este nivel de expresión se normalizó con respecto al control de actina y se le asignó un valor de 1. Al día 2 no se observa expresión del mRNA o bajo las condiciones de experimentación no es detectable, de todas formas es indicativo de que la expresión es significativamente más baja que en el resto de las condiciones de cultivo. Para los días 4 y 6 de cultivo hay un aumento en la expresión de la enzima, la que decae una vez que se han enfrentado las células al LPS. Sin embargo no podemos asegurar que esta baja se deba a la adición del LPS, puesto que no sabemos si en ausencia del estímulo inflamatorio, la baja en la expresión ocurre con el tiempo, pero si puede existir una relación entre la acción del LPS y la vía metabólica del RA, tal como se señaló anteriormente, y por eso puede estar ocurriendo esa disminución en la expresión.

Algo que resulta interesante es que aparentemente el aumento de la expresión de mRNA, se produce tras la estimulación de los monocitos con IL-4, en otras condiciones de cultivo se observó que no existe un aumento significativo en la expresión de ALDH1A1, así por ejemplo, si el cultivo solo se mantiene con GM-CSF (comprobado en la actividad enzimática). Se ha reportado al respecto, que este factor estimulante está directamente relacionado con la activación de genes dependientes de RA (Shimizu et al., 2006), y que induce la expresión de receptores RAR (Shimizu and Takeda, 2000), pero que se necesitaría un segundo estímulo para desencadenar toda la cascada regulatoria génica, en nuestro caso IL-4 sería ese segundo estímulo, que pudiera estar aumentando la cantidad de enzima disponible y ejerciendo además, otros efectos sobre la maquinaria metabólica celular. Al respecto se ha indicado que IL-4 es capaz de activar el factor de transcripción PPAR γ , aumentando sus ligandos (Huang et al., 1999), y que la activación de PPAR γ aumenta la expresión de retinal deshidrogenasas (Szatmari et al., 2006), además, de que la activación de PPAR γ es necesaria para la diferenciación y la regulación funcional de las DCs (Szatmari et al., 2007; Zapata-Gonzalez et al., 2007). Otro mecanismo de acción de los retinoides pudiera llevarse a cabo a través de las proteínas STATS (*Signal Transducers and Activators of Transcription*). Se sabe que la IL-4 activa STAT6 (Quelle et al., 1995; Takeda et al., 1996), habiéndose sugerido múltiples conexiones entre STATS y la familia de receptores de retinoides (Dimberg et al., 2000; Collins, 2002).

La situación observada para la isoenzima ALDH1A2 es distinta, existen tres isoformas de esta enzima, la descrita como variante 1 más larga, de 518 aminoácidos, la

variante 2 de 480 aminoácidos y la variante 3, de 422 aminoácidos. Para evaluar su expresión en los cultivos se diseñó un único par de primarios de ALDH1A2, de manera de que se amplificaran las 3 isoformas. Sin embargo, debido a la distribución variable de los intrones, fue necesario reducir significativamente la región común a las tres variantes de “splicing”, por ese motivo, las isoformas 1 y 3 coinciden en el tamaño del producto de PCR (318 pb), mientras la variante 2 mostró un tamaño de 204 pb. Como se aprecia en la Figura 9, en monocitos se detecta la presencia de la banda de 318 pb, indicándonos que pudiera estar presente la variante 1, la variante 3 o ambas. A partir del día 2 y hasta después de la estimulación con LPS aparece una banda de 204 pb, que correspondería a la variante 2, alcanzando un “peak” en la expresión al segundo día para luego disminuir y permanecer invariable hasta el término del cultivo.

Como la expresión del mRNA sufre cambios en el proceso de diferenciación, pero en vista que este cambio no tiene un patrón definido en su variación, es necesario determinar las ALDHs a nivel de proteína. Al tratarse de una enzima decidimos medir su actividad en el cultivo de monocitos, y de las células en proceso de diferenciación a DCs. Para medir la actividad se registró espectrofotométricamente el cambio en absorbancia producido por la generación de NADH a pH 8.0, pH donde se ha registrado la mayor actividad para la familia ALDH1 (Bhat and Samaha, 1999). El NADH es el producto generado por la enzima tras convertir el retinal, en presencia de NAD⁺, en RA. El retinal es sustrato de las deshidrogenadas tipo ALDH1A1 y 1A2 (Klyosov, 1996), por lo que no podemos saber cual tiene mayor actividad, asumiendo que ambas participan, debido a que registran variación en el mRNA, o sí la variación se debe exclusivamente a

una de ellas. Se pudo observar que la actividad enzimática presente en los monocitos es nula, a pesar de existir expresión del mRNA, la situación es distinta a partir del día 2, en donde existe un aumento significativo en el nivel de la actividad enzimática presente, alcanzando los valores más elevados entre los días 2 y 4. Al día 6 se observa una disminución levemente significativa, la que se ratifica en los cultivos que fueron enfrentados a LPS. También observamos que la sólo adición de GM-CSF, no es suficiente para una activación de la enzima. Ciertamente la actividad presentada por los cultivos al día 2, se contrapone con la cantidad de mRNA observados de la isoenzima ALDH1A1 y concuerda con la aparición del mRNA de la variante 2 de la isoenzima ALDH1A2. Una explicación posible para este fenómeno radica en el control transcripcional de las enzimas. En el caso de ALDH1A1, en la muestra al día 2 (correspondiente a monocitos estimulados con IL-4 y GM-CSF por 2 días), la totalidad del mRNA ha sido traducido a proteína, un comportamiento que ya había sido reportado en el control de los receptores (Yost et al., 2004). Al día 4 (correspondiente a monocitos con una segunda estimulación IL-4 y GM-CSF), se ha ratificado el estímulo diferenciador, por lo que las células transcriben nuevamente mRNA para asegurar su biodisponibilidad. Luego la célula entra en una fase de control postraducciona y traduccional, donde los niveles de mRNA al día 6 están muy elevados, manteniéndose altos incluso como DCs maduras (presencia de LPS). Con los datos recopilados no podemos esclarecer cual de las dos isoformas aporta más a la actividad enzimática, puesto que el NADH producido en la reacción pudo deberse al aporte conjunto de ALDH1A1 y ALDH1A2.

Para ALDH1A2, la estimulación inicial de monocitos con IL-4 y GM-CSF, junto con mantener la expresión de las isoformas 1 y 3 de ALDH1A2, desencadena la expresión del mRNA de la isoforma 2, de 204 pb de la enzima, lo que se observa al día 2 (Figura 9a). A partir de ese momento, la expresión de ambos mRNA disminuye para permanecer en niveles constantes. La actividad enzimática más alta se observa al día 4, es decir, posterior a la reestimulación con IL-4 y GM-CSF, después que se ha producido buena cantidad de ALDH1A1 y de las isoformas 1, 3, además, de la isoforma 2 de ALDH1A2. La actividad máxima podría darse después de la reestimulación, pero antes del día 4. Sin embargo, para establecer el momento exacto, habría que hacer ensayos acotando los períodos en que se realicen las determinaciones en el cultivo. Es muy posible que los efectos sobre la actividad enzimática se deban tanto a lo que ocurre con la ALDH1A1, como lo que ocurre con las ALDH1A2, y no tiene por que ser excluyentes uno con respecto al otro.

Para resumir los resultados, y junto con lo descrito en la bibliografía a los eventos que pudieran participar en el proceso de diferenciación hemos propuesto el siguiente modelo:

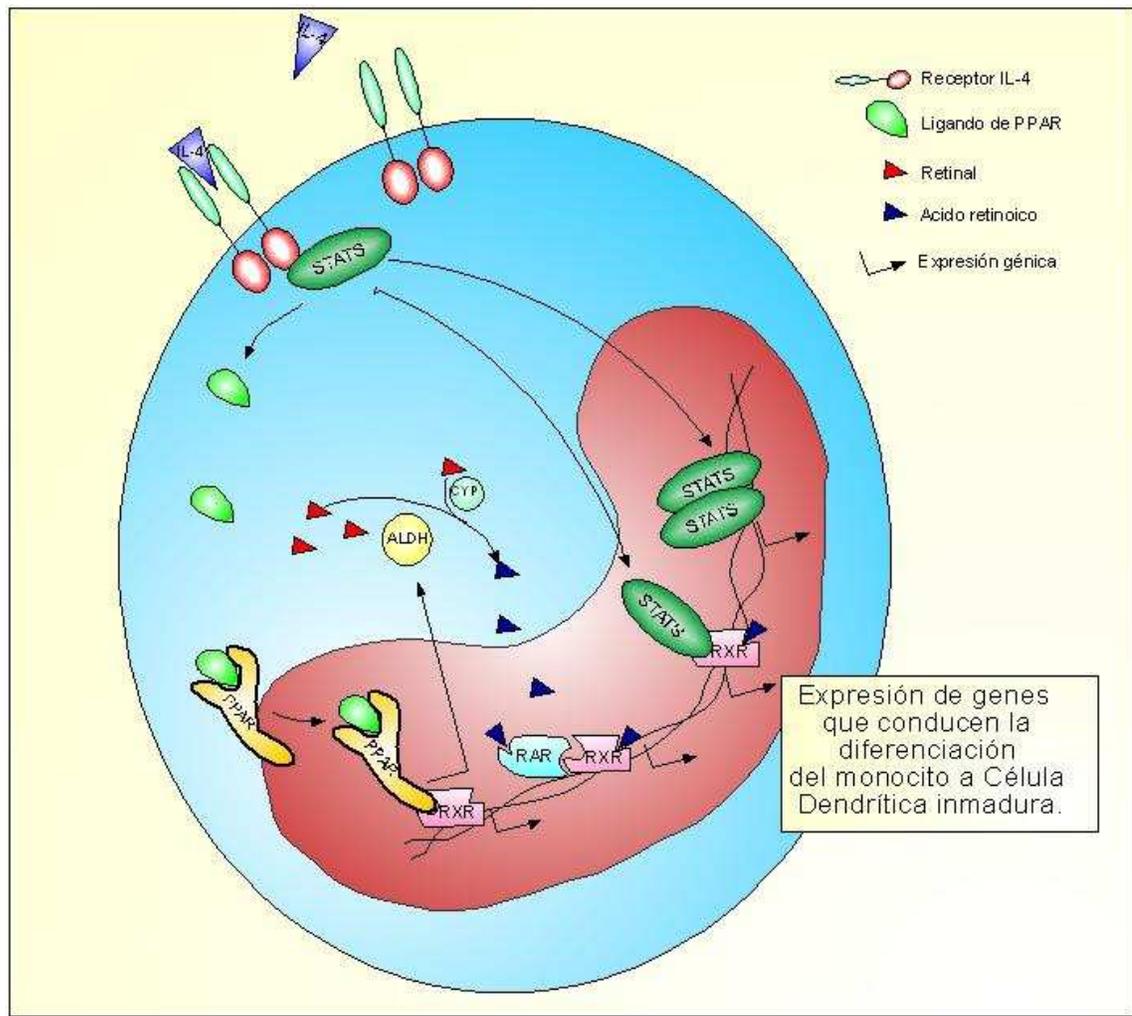


Figura 11: Modelo propuesto de los eventos iniciales en la activación de monocitos, en el proceso de diferenciación a células dendríticas.

En primer lugar la unión de IL-4 a su receptor activa los factores de transcripción STAT, los que homodimerizan translocándose al núcleo para inducir la expresión génica, estos factores podrían también aumentar ciertos ligandos de los receptores PPAR, y una tercera alternativa consiste en la interacción de los factores STAT con receptores de retinoides (RXR). PPAR induce la expresión de aldehído deshidrogenasas, las que catalizan la transformación de retinal a ácido retinoico (eventualmente esta catálisis podría efectuarla la enzima CYP), el que puede unirse a sus receptores nucleares provocando la expresión de otros genes necesarios para el proceso de diferenciación.

6. CONCLUSIONES

- Utilizando el inhibidor de deshidrogenasas, dietilaminobenzaldehído (DEAB), se logró inhibir la diferenciación de monocitos a células dendríticas en un 50%.
- La adición del inhibidor de deshidrogenadas (DEAB) no afecta la diferenciación en cultivos con ácido retinoico.
- La acción del inhibidor (DEAB) es específica sobre la enzima y no afecta la viabilidad celular.
- Por primera vez, se detectó la presencia de mRNA de dos enzimas retinal deshidrogenasas, en cultivos de monocitos a lo largo de todo el proceso de diferenciación a células dendríticas.
- La actividad enzimática de las retinal deshidrogenasas aumentó significativamente en el proceso de diferenciación.
- Las enzimas podrían cumplir un rol muy importante en la producción de células dendríticas *in vivo*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Antonyak MA, McNeill CJ, Wakshlag JJ, Boehm JE and Cerione RA (2003) Activation of the Ras-ERK pathway inhibits retinoic acid-induced stimulation of tissue transglutaminase expression in NIH3T3 cells. *J Biol Chem* **278**:15859-15866.
- Ballow M, Wang X, Xiang S and Allen C (2003) Expression and regulation of nuclear retinoic acid receptors in human lymphoid cells. *J Clin Immunol* **23**:46-54.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B and Palucka K (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**:767-811.
- Bastien J and Rochette-Egly C (2004) Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* **328**:1-16.
- Bell D, Young JW and Banchereau J (1999) Dendritic cells. *Adv Immunol* **72**:255-324.
- Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM and Bhardwaj N (1996) Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* **196**:121-135.
- Bhat PV and Samaha H (1999) Kinetic properties of the human liver cytosolic aldehyde dehydrogenase for retinal isomers. *Biochem Pharmacol* **57**:195-197.
- Blomhoff R and Blomhoff HK (2006) Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol* **66**:606-630.
- Cantorna MT, Nashold FE and Hayes CE (1994) In vitamin A deficiency multiple mechanisms establish a regulatory T helper cell imbalance with excess Th1 and insufficient Th2 function. *J Immunol* **152**:1515-1522.
- Cao W, Lee SH and Lu J (2005) CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J* **385**:85-93.
- Collins SJ (2002) The role of retinoids and retinoic acid receptors in normal hematopoiesis. *Leukemia* **16**:1896-1905.
- Crabb DW, Pinairs J, Hasanadka R, Fang M, Leo MA, Lieber CS, Tsukamoto H, Motomura K, Miyahara T, Ohata M, Bosron W, Sanghani S, Kedishvili N, Shiraishi H, Yokoyama H, Miyagi M, Ishii H, Bergheim I, Menzl I, Parlesak A and Bode C (2001) Alcohol and retinoids. *Alcohol Clin Exp Res* **25**:207S-217S.
- Chandra RK (1988) Increased bacterial binding to respiratory epithelial cells in vitamin A deficiency. *Bmj* **297**:834-835.
- Darcissac EC, Bahr GM, Parant MA, Chedid LA and Riveau GJ (1996) Selective induction of CD11a,b,c/CD18 and CD54 expression at the cell surface of human leukocytes by muramyl peptides. *Cell Immunol* **169**:294-301.
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P and Traganos F (1992) Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* **13**:795-808.
- De Luca LM (1991) Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *Faseb J* **5**:2924-2933.

- Dimberg A, Nilsson K and Oberg F (2000) Phosphorylation-deficient Stat1 inhibits retinoic acid-induced differentiation and cell cycle arrest in U-937 monoblasts. *Blood* **96**:2870-2878.
- Duester G (1996) Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry* **35**:12221-12227.
- Duester G (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem* **267**:4315-4324.
- Duester G, Farres J, Felder MR, Holmes RS, Hoog JO, Pares X, Plapp BV, Yin SJ and Jornvall H (1999) Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. *Biochem Pharmacol* **58**:389-395.
- Ebner S, Hofer S, Nguyen VA, Furhapter C, Herold M, Fritsch P, Heufler C and Romani N (2002) A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern. *J Immunol* **168**:6199-6207.
- Escobar A, Lopez M, Serrano A, Ramirez M, Perez C, Aguirre A, Gonzalez R, Alfaro J, Larrondo M, Fodor M, Ferrada C and Salazar-Onfray F (2005) Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. *Clin Exp Immunol* **142**:555-568.
- Felzmann T, Witt V, Wimmer D, Ressmann G, Wagner D, Paul P, Huttner K and Fritsch G (2003) Monocyte enrichment from leukapheresis products for the generation of DCs by plastic adherence, or by positive or negative selection. *Cytotherapy* **5**:391-398.
- Fritsche J, Stonehouse TJ, Katz DR, Andreesen R and Kreutz M (2000) Expression of retinoid receptors during human monocyte differentiation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **270**:17-22.
- Geissmann F, Revy P, Brousse N, Lepelletier Y, Folli C, Durandy A, Chambon P and Dy M (2003) Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. *J Exp Med* **198**:623-634.
- Guidoboni M, Zancai P, Cariati R, Rizzo S, Dal Col J, Pavan A, Gloghini A, Spina M, Cuneo A, Pomponi F, Bononi A, Doglioni C, Maestro R, Carbone A, Boiocchi M and Dolcetti R (2005) Retinoic acid inhibits the proliferative response induced by CD40 activation and interleukin-4 in mantle cell lymphoma. *Cancer Res* **65**:587-595.
- Hengesbach LM and Hoag KA (2004) Physiological concentrations of retinoic acid favor myeloid dendritic cell development over granulocyte development in cultures of bone marrow cells from mice. *J Nutr* **134**:2653-2659.
- Hirasawa N, Kagechika H, Shudo K and Ohuchi K (2001) Inhibition by retinoids of antigen-induced IL-4 production in rat mast cell line RBL-2H3. *Life Sci* **68**:1287-1294.
- Hsu LC, Chang WC, Hoffmann I and Duester G (1999) Molecular analysis of two closely related mouse aldehyde dehydrogenase genes: identification of a role for

- Aldh1, but not Aldh-pb, in the biosynthesis of retinoic acid. *Biochem J* **339** (Pt 2):387-395.
- Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D and Glass CK (1999) Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* **400**:378-382.
- Ikeda M, Spanjaard RA, Noordhoek EW, Kawaguchi A, Onaya T and Chin WW (1998) Ligand-inducible retinoid X receptor-mediated protein: DNA interactions in the retinoic acid receptor beta2 gene promoter in vivo. *Mol Cell Endocrinol* **136**:109-118.
- Ito T, Inaba M, Inaba K, Toki J, Sogo S, Iguchi T, Adachi Y, Yamaguchi K, Amakawa R, Valladeau J, Saeland S, Fukuhara S and Ikehara S (1999) A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol* **163**:1409-1419.
- Iwata M, Eshima Y and Kagechika H (2003) Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int Immunol* **15**:1017-1025.
- Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C and Song SY (2004) Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* **21**:527-538.
- Johansson-Lindbom B and Agace WW (2004) Vitamin A helps gut T cells find their way in the dark. *Nat Med* **10**:1300-1301.
- Johnson RD, Bahnisch J, Stewart B, Shearman DJ and Edwards JB (1992) Optimized spectrophotometric determination of aldehyde dehydrogenase activity in erythrocytes. *Clin Chem* **38**:584-588.
- Jornvall H, Persson B, Krook M, Atrian S, Gonzalez-Duarte R, Jeffery J and Ghosh D (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**:6003-6013.
- Kastan MB, Schlaffer E, Russo JE, Colvin OM, Civin CI and Hilton J (1990) Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood* **75**:1947-1950.
- Kim IS, Kim YS, Jang SW, Sung HJ, Han KH, Na DS and Ko J (2004) Differential effects of 9-cis retinoic acid on expression of CC chemokine receptors in human monocytes. *Biochem Pharmacol* **68**:611-620.
- Klyosov AA (1996) Kinetics and specificity of human liver aldehyde dehydrogenases toward aliphatic, aromatic, and fused polycyclic aldehydes. *Biochemistry* **35**:4457-4467.
- Kuwata T, Wang IM, Tamura T, Ponnampereuma RM, Levine R, Holmes KL, Morse HC, De Luca LM and Ozato K (2000) Vitamin A deficiency in mice causes a systemic expansion of myeloid cells. *Blood* **95**:3349-3356.
- Labrecque J, Dumas F, Lacroix A and Bhat PV (1995) A novel isoenzyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans retinoic acid. *Biochem J* **305** (Pt 2):681-684.
- Leung AY and Verfaillie CM (2005) All-trans retinoic acid (ATRA) enhances maintenance of primitive human hematopoietic progenitors and skews them

- towards myeloid differentiation in a stroma-noncontact culture system. *Exp Hematol* **33**:422-427.
- McCormick S, Santosuosso M, Zhang XZ and Xing Z (2006) Manipulation of dendritic cells for host defence against intracellular infections. *Biochem Soc Trans* **34**:283-286.
- McWilliam AS, Nelson D, Thomas JA and Holt PG (1994) Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J Exp Med* **179**:1331-1336.
- Mirza N, Fishman M, Fricke I, Dunn M, Neuger AM, Frost TJ, Lush RM, Antonia S and Gabrilovich DI (2006) All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res* **66**:9299-9307.
- Mohty M, Morbelli S, Isnardon D, Sainty D, Arnoulet C, Gaugler B and Olive D (2003) All-trans retinoic acid skews monocyte differentiation into interleukin-12-secreting dendritic-like cells. *Br J Haematol* **122**:829-836.
- Mora JR and von Andrian UH (2004) Retinoic acid: an educational "vitamin elixir" for gut-seeking T cells. *Immunity* **21**:458-460.
- Nagl M, Kacani L, Mullauer B, Lemberger EM, Stoiber H, Sprinzl GM, Schennach H and Dierich MP (2002) Phagocytosis and killing of bacteria by professional phagocytes and dendritic cells. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**:1165-1168.
- Napoli JL (1996) Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol* **80**:S52-62.
- Padley DJ, Dietz AB, Gastineau DA and Vuk-Pavlovic S (2001) Mature myeloid dendritic cells for clinical use prepared from CD14+ cells isolated by immunomagnetic adsorption. *J Hematother Stem Cell Res* **10**:427-429.
- Park HY, Park JY, Kim JW, Lee MJ, Jang MJ, Lee SY, Baek DW, Park YM, Lee SW, Yoon S, Bae YS and Kwak JY (2004) Differential expression of dendritic cell markers by all-trans retinoic acid on human acute promyelocytic leukemic cell line. *Int Immunopharmacol* **4**:1587-1601.
- Peng JC, Thomas R and Nielsen LK (2005) Generation and maturation of dendritic cells for clinical application under serum-free conditions. *J Immunother (1997)* **28**:599-609.
- Perozich J, Nicholas H, Wang BC, Lindahl R and Hempel J (1999) Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci* **8**:137-146.
- Persson B, Zigler JS, Jr. and Jornvall H (1994) A super-family of medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Sub-lines including zeta-crystallin, alcohol and polyol dehydrogenases, quinone oxidoreductase enoyl reductases, VAT-1 and other proteins. *Eur J Biochem* **226**:15-22.
- Pierre P, Turley SJ, Gatti E, Hull M, Meltzer J, Mirza A, Inaba K, Steinman RM and Mellman I (1997) Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* **388**:787-792.
- Quelle FW, Shimoda K, Thierfelder W, Fischer C, Kim A, Ruben SM, Cleveland JL, Pierce JH, Keegan AD, Nelms K and et al. (1995) Cloning of murine Stat6 and

- human Stat6, Stat proteins that are tyrosine phosphorylated in responses to IL-4 and IL-3 but are not required for mitogenesis. *Mol Cell Biol* **15**:3336-3343.
- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R and Liu YJ (1999) Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* **283**:1183-1186.
- Ross AC and Stephensen CB (1996) Vitamin A and retinoids in antiviral responses. *Faseb J* **10**:979-985.
- Saikh KU, Khan AS, Kissner T and Ulrich RG (2001) IL-15-induced conversion of monocytes to mature dendritic cells. *Clin Exp Immunol* **126**:447-455.
- Sallusto F and Lanzavecchia A (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**:1109-1118.
- Sarkar J, Gangopadhyay NN, Moldoveanu Z, Mestecky J and Stephensen CB (1998) Vitamin A is required for regulation of polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) expression by interleukin-4 and interferon-gamma in a human intestinal epithelial cell line. *J Nutr* **128**:1063-1069.
- Scheffel F, Heine G, Henz BM and Worm M (2005) Retinoic acid inhibits CD40 plus IL-4 mediated IgE production through alterations of sCD23, sCD54 and IL-6 production. *Inflamm Res* **54**:113-118.
- Schuler G, Schuler-Thurner B and Steinman RM (2003) The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **15**:138-147.
- Shimizu T, Esaki L, Mizuno H and Takeda K (2006) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor enhances retinoic acid-induced gene expression. *J Leukoc Biol* **80**:889-896.
- Shimizu T and Takeda K (2000) Induction of retinoic acid receptor-alpha by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human myeloid leukemia cell lines. *Cancer Res* **60**:4544-4549.
- Shoda R, Mahalanabis D, Wahed MA and Albert MJ (1995) Bacterial translocation in the rat model of lectin induced diarrhoea. *Gut* **36**:379-381.
- Sijtsma SR, Rombout JH, Dohmen MJ, West CE and van der Zijpp AJ (1991) Effect of vitamin A deficiency on the activity of macrophages in Newcastle disease virus-infected chickens. *Vet Immunol Immunopathol* **28**:17-27.
- Sladek NE (2003) Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact. *J Biochem Mol Toxicol* **17**:7-23.
- Smith SM, Levy NS and Hayes CE (1987) Impaired immunity in vitamin A-deficient mice. *J Nutr* **117**:857-865.
- Sommer A (2003) Vitamin A deficiency and the global response. *Forum Nutr* **56**:33-35.
- Stephensen CB (2001) Vitamin A, infection, and immune function. *Annu Rev Nutr* **21**:167-192.
- Storms RW, Green PD, Safford KM, Niedzwiecki D, Cogle CR, Colvin OM, Chao NJ, Rice HE and Smith CA (2005) Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34. *Blood* **106**:95-102.

- Strunk D, Egger C, Leitner G, Hanau D and Stingl G (1997) A skin homing molecule defines the langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *J Exp Med* **185**:1131-1136.
- Suen Y, Lee SM, Aono F, Hou S, Loudovaris M, Ofstein G and Bender JG (2001) Comparison of monocyte enrichment by immuno-magnetic depletion or adherence for the clinical-scale generation of DC. *Cytotherapy* **3**:365-375.
- Suss G and Shortman K (1996) A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med* **183**:1789-1796.
- Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray IP, Davies PJ and Nagy L (2004) Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ* **11 Suppl 2**:S126-143.
- Szatmari I, Pap A, Ruhl R, Ma JX, Illarionov PA, Besra GS, Rajnavolgyi E, Dezso B and Nagy L (2006) PPAR γ controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. *J Exp Med* **203**:2351-2362.
- Szatmari I, Torocsik D, Agostini M, Nagy T, Gurnell M, Barta E, Chatterjee K and Nagy L (2007) PPAR γ regulates the function of human dendritic cells primarily by altering lipid metabolism. *Blood*.
- Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, Nakanishi K, Yoshida N, Kishimoto T and Akira S (1996) Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* **380**:627-630.
- Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M, Glaser A, Keikavoussi P, Kampgen E, Bender A and Schuler G (1999) Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J Immunol Methods* **223**:1-15.
- Thurnham DI, Northrop-Clewes CA, McCullough FS, Das BS and Lunn PG (2000) Innate immunity, gut integrity, and vitamin A in Gambian and Indian infants. *J Infect Dis* **182 Suppl 1**:S23-28.
- Turley SJ, Inaba K, Garrett WS, Ebersold M, Unternaehrer J, Steinman RM and Mellman I (2000) Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* **288**:522-527.
- Twining SS, Schulte DP, Wilson PM, Fish BL and Moulder JE (1997) Vitamin A deficiency alters rat neutrophil function. *J Nutr* **127**:558-565.
- Wiedermann U, Hanson LA, Bremell T, Kahu H and Dahlgren UI (1995) Increased translocation of Escherichia coli and development of arthritis in vitamin A-deficient rats. *Infect Immun* **63**:3062-3068.
- Witcher M, Shiu HY, Guo Q and Miller WH, Jr. (2004) Combination of retinoic acid and tumor necrosis factor overcomes the maturation block in a variety of retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* **104**:3335-3342.
- Wu L and Dakic A (2004) Development of dendritic cell system. *Cell Mol Immunol* **1**:112-118.
- Yost CC, Denis MM, Lindemann S, Rubner FJ, Marathe GK, Buerke M, McIntyre TM, Weyrich AS and Zimmerman GA (2004) Activated polymorphonuclear

- leukocytes rapidly synthesize retinoic acid receptor-alpha: a mechanism for translational control of transcriptional events. *J Exp Med* **200**:671-680.
- Zapata-Gonzalez F, Rueda F, Petriz J, Domingo P, Villarroya F, de Madariaga A and Domingo JC (2007) 9-cis-Retinoic acid (9cRA), a retinoid X receptor (RXR) ligand, exerts immunosuppressive effects on dendritic cells by RXR-dependent activation: inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks some of the 9cRA activities, and precludes them to mature phenotype development. *J Immunol* **178**:6130-6139.
- Zhang H and Rosdahl I (2004) Expression of p27 and MAPK proteins involved in all-trans retinoic acid-induced apoptosis and cell cycle arrest in matched primary and metastatic melanoma cells. *Int J Oncol* **25**:1241-1248.