



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

Memoria para optar al título de Bioquímico

**CÉLULAS DENDRÍTICAS INDUCTORAS DE UNA RESPUESTA
TOLEROGENICA**

OCTAVIO ALEXIS ARAVENA MADARIAGA

Profesor Guía:
Dr. Juan Carlos Aguillón
Programa Disciplinario de Inmunología
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Profesor Patrocinante:
Dr. Javier Puente Piccardo.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

**Santiago Chile
2006**

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ABREVIATURAS.....	5
1 RESUMEN.....	6
2 SUMMARY	8
2.1 DENDRITIC CELLS INDUCE TOLEROGENIC RESPONSE.....	8
3 INTRODUCCIÓN	10
3.1 CÉLULAS DENDRÍTICAS	11
3.2 FUNCIÓN Y MADURACIÓN DE LAS DCS	14
3.3 INTERACCIÓN CÉLULA DENDRÍTICA-LINFOCITO T.....	17
3.4 CÉLULAS DENDRÍTICAS Y TOLERANCIA.....	18
3.5 ARTRITIS REUMATOIDE	20
4 HIPÓTESIS.....	21
5 OBJETIVO GENERAL	21
6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
7 MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
7.1 PREPARACIÓN DE MÉDULA ÓSEA	23
7.2 CULTIVO DE CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA	23
7.3 DIFERENCIACIÓN Y MADURACIÓN DE BMDC.....	24
7.4 CITOMETRÍA DE FLUJO	24
7.5 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ENDOCÍTICA DE BMDC	25

7.6	DETERMINACIÓN DE SECRECIÓN DE CITOQUINAS POR LAS BMDC.....	25
7.7	INDUCCIÓN DE ARTRITIS MURINA.....	26
7.8	ENSAYOS <i>IN VIVO</i> EN RATONES CIA.....	26
7.9	ANÀLISIS ESTADÍSTICO.....	27
8	RESULTADOS.....	28
8.1	OBTENCIÓN DE BMDC	28
8.2	CITOMETRÍA DE FLUJO.....	30
8.3	ESTIMULACIÓN DE BMDC.....	31
8.4	CARACTERIZACIÓN DE BMDC.....	33
8.5	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ENDOCITOSIS DE ANTÍGENO.....	42
8.6	DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS SECRETADAS POR BMDC	43
8.7	ENSAYOS <i>IN VIVO</i> DE BMDC	47
9	DISCUSIÓN	49
9.1	GENERACIÓN DE BMDC.....	50
9.2	EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN DE BMDC	51
9.3	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ENDOCÍTICA DE ANTIGÉNO POR BMDC	54
9.4	DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS SECRETADAS POR BMDC	55
9.5	ENSAYOS <i>IN VIVO</i> DE LAS BMDC ESTIMULADAS CON LPS POR 4 HORAS	56
10	CONCLUSIONES.....	59
11	BIBLIOGRAFÍA.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: CÉLULAS PRECURSORAS DE MÉDULA ÓSEA.	29
FIGURA 2: GRÁFICOS DOT-PLOT BMDC.	31
FIGURA 3: EXPRESIÓN DE CD11c.	32
FIGURA 4: HISTOGRAMAS DE LA EXPRESIÓN DE CD11c, MHC I, CD40 Y CD86.....	34
FIGURA 5: EXPRESIÓN DE MHC I.....	35
FIGURA 6: EXPRESIÓN DE CD40..	37
FIGURA 7: EXPRESIÓN DE CD86..	38
FIGURA 8: EXPRESIÓN DE ICAM.....	39
FIGURA 9: EXPRESIÓN CCR7.....	40
FIGURA 10: EXPRESIÓN DE CD45RB..	41
FIGURA 11: CAPACIDAD ENDOCÍTICA.....	43
FIGURA 12: SECRECIÓN DE IL-12P70.	44
FIGURA 13: SECRECIÓN DE IL-10.....	46
FIGURA 14: EVOLUCIÓN DE LA ARTRITIS MURINA INDUCIDA POR COLÁGENO (CIA).	48

ABREVIATURAS

Acm	Anticuerpo monoclonal
Ag	Antígeno
AR	Artritis reumatoide
BMDC	Células dendríticas derivadas de médula ósea
CD11c	Integrina α_x
CD40	Proteína integral de membrana ligando para CD40L
CD86	molécula coestimuladora B7-2 ligando para CD28
CIA	Artritis inducida por colágeno
CII	Colágeno bovino tipo II
Dx-FITC	Dextran conjugado a ficoeritrina
FITC	Isocianato de ficoeritrina
FSC	Tamaño
GM-CSF	Factor estimulante de colonias monocíticas y macrofágicas
IFN γ	Interferón gamma
IL-12	Interleuquina 12
IL-10	Interleuquina 10
IL-4	Interleuquina 4
LPS	Lipopolisacárido
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MHC	Molécula del complejo mayor de histocompatibilidad
PE	Ficoeritrina
SSC	Granularidad
Th	Linfocitos T helper
Tr	Linfocitos T reguladores
TLR	Receptor tipo toll
TNF α	factor de necrosis tumoral alfa
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

1 RESUMEN

Las células dendríticas (DC) son células presentadoras de antígeno (APC) profesionales que juegan un papel principal en la iniciación de la respuesta inmune primaria y secundaria. Se encuentran en distintos estados funcionales. En estado inmaduro residen en tejidos no linfoides y poseen una alta capacidad para capturar y procesar el antígeno. Una vez que han sido expuestas a un ambiente inflamatorio o presencia de lipopolisacárido (LPS), disminuyen su capacidad de capturar el antígeno, incrementan la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y de moléculas co estimuladoras como CD80 y CD86. El antígeno es presentado como un complejo péptido-MHC clase I y/o II que es reconocido por células T CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente. Hemos logrado obtener DCs derivadas de médula ósea (BMDC) de ratones DBA1/lacJ tras 7 días de cultivo en presencia de factor estimulante de colonias monocíticas y macrofágicas (GM-CSF) caracterizándolas fenotípica y funcionalmente en tres estados de maduración o diferenciación. El estado inmaduro de las DCs se obtuvo por pre tratamiento en cultivo con IL-10, éstas poseen una alta capacidad fagocítica representado por su propiedad de capturar un péptido sintético marcado (Dextran-FITC). Poseen bajos niveles de expresión de la molécula coestimuladora CD86 y de CD40, alta secreción de citoquinas anti inflamatorias como IL-10 y baja producción de IL-12p70. Bajo estimulación con LPS de *E. coli* por 24 horas, las DCs muestran un fenotipo maduro, caracterizado por una baja capacidad de capturar Dextran-FITC, una regulación positiva de CD40 y CD86, disminución en la secreción de IL-10 y un aumento de IL-12p70. Finalmente, se obtuvo un estado intermedio mediante un estímulo de LPS de *E.coli* por 4 horas, que al igual que con TNF α por 24 horas, exhibe características fenotípicas y funcionales indicadoras de un estado semi-maduro. Esta última población corresponde a DCs con características reguladoras o tolerogénicas capaces generar una respuesta *in*

vivo en el modelo murino de artritis inducida por colágeno bovino tipo II (CIA), que se demostró por la inoculación intraperitoneal post inducción de la CIA, con BMDC estimuladas con LPS por 4 horas y cargadas con CII. Se midieron parámetros clínicos de inflamación como edema e índice artrítico en las extremidades de los animales sometidos a la inmunoterapia, logrando una disminución de estos parámetros en los ratones inoculados con BMDC comparados con controles CIA y CIA inoculados con BMDC estimuladas por 4 horas con LPS sin cargar. Estos hallazgos sugieren un re establecimiento de la tolerancia al CII inductor del proceso autoinmune.

2 SUMMARY

2.1 DENDRITIC CELLS INDUCE TOLEROGENIC RESPONSE

Dendritic cells (DC) are professional antigen presenting cells (APC), that play a main role in the initiation of the primary and secondary immune responses. DCs can be found in different functional stages. In an immature state they reside in lymphoid nodes, presenting a high capacity to capture and process the antigen. Once they have been exposed to danger signals like lipopolysaccharide (LPS), DCs show an increased expression of the major complex histocompatibility (MHC), co stimulatory molecules (CD80 and CD86) and CD40, and a reduction in their antigen capture capability. Antigens are presented as peptides complexed MHC class I and II molecules which are recognized by CD8+ and CD4+T cells, respectively. We have generated bone marrow derived DC (BMDC) from DBA1/lacJ mice after 7 days of culture in the presence of GM-CSF. These DCs were characterized phenotypically and functionally displayed three stages according to the stimulus that were subjected to characterized maturation. Immature stage was obtained by the pre treatment of BMDC with IL-10. These DCs have a high endocytic capacity given by their ability to capture a synthetic peptide (Dextran-FITC), They also show low levels of CD40 and CD86, high secretion of anti inflammatory cytokine, IL-10 and, a low production of IL-12p70. Under stimulation with LPS from *E. coli* for 24 hours, BMDC show a diminished capacity to capture Dextran-FITC, up-regulate CD40 and CD86 expression, a reduce IL-10 secretion and increase IL-12p70 secretion. An intermediate phenotypic and functional stage was obtained when BMDC were pre-treated with a single stimulus of LPS for *E. coli* by 4 hours, or with TNF α for 24 hours. These semi-mature BMDC with tolerogenic characteristics allows us to perform *in vivo* challenge. Thus, using the murine model of type II collagen-induced

arthritis (CIA), we demonstrate by single ip. Inoculation of 4 hours LPS-stimulated BMDC, that unlike BMDC without CII, CII pulsed BMDC interfere with arthritis progression. The clinical parameters evaluated were arthritis index and edema in all mouse. Both parameters showed better scores when compared to CIA controls or group of mice inoculated with 4 hours LPS-stimulated BMDC unloaded with CII. These findings suggest a CII tolerance reestablishment responsible of the autoimmune process.

3 INTRODUCCIÓN

El sistema inmune nos protege de sustancias potencialmente nocivas al reconocerlas y responder frente a ellas. Estas sustancias denominadas antígenos, están presentes en células, bacterias, virus y hongos. En la primera línea de defensa está la inmunidad innata, cuyos componentes son: 1) barreras físicas y químicas, tales como epitelios y sustancias producidas en la superficies epiteliales; 2) células como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs), células citotóxicas naturales (NK), y linfocitos B-1; 3) proteínas sanguíneas que incluyen al sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; y 4) proteínas denominadas citoquinas que regulan y coordinan a otras células que participan en la inmunidad celular (Blanch-Olszewska y col, 2005), se activa en un muy corto tiempo antes que se produzca la infección y es capaz de producir una respuesta rápida frente a los microorganismos o antígenos no específicos. En cambio la inmunidad adaptativa, es un sistema de defensa más evolucionado, que se desarrolla luego de la exposición al agente infeccioso o antígeno específico por diversos mecanismos de reconocimiento, cuya intensidad y capacidad depende de la exposición previa al microorganismo, incluye a células T efectoras CD4+ y CD8+ y linfocitos B. Estas células se comunican por medio de citoquinas, principalmente interferón γ (IFN- γ), TNF α , otras interleuquinas (ILs) y quimioquinas, de este modo eliminan células infectadas o transformadas (Banchereau y col, 2004, y Blanch-Olszewska, 2005).

Inicialmente la inmunología se había enfocado en los antígenos y en los linfocitos, pero estos no son suficientes para inducir inmunidad. Recientemente se ha comprendido la importancia y versatilidad de las DCs, ya que antes se pensaba que el único papel de las DCs era la inducción de la respuesta adaptativa, pero hoy en día se sabe que son importantes mediadoras en la tolerancia periférica y en la mantención de la homeostasis inmune (Groux Hervé

y col, 2002). Recientemente han aparecido nuevas terapias basadas en el uso de DCs, que buscan estimular o suprimir la respuesta inmune en varias enfermedades como, alergia, asma, trasplante, infección, cáncer y autoinmunidad (Vecchione y col, 2002 y Mohamadzadeh y col, 2004).

3.1 CÉLULAS DENDRÍTICAS

La respuesta inmune resulta de una interacción entre la inmunidad innata inespecífica y la inmunidad adaptativa antígeno específica. Células y moléculas de la inmunidad innata emplean vías de reconocimiento no clonales como lectinas y receptores tipo toll (TLR). En cambio en el sistema inmune adaptativo, linfocitos T y B utilizan receptores clonales que reconocen antígenos de manera altamente específica. Entre la inmunidad innata y adaptativa existe un nexo y orquestador que transfiere la información desde el exterior hasta la inmunidad adaptativa. Este nexo son las células dendríticas (DCs), un grupo de células que se ha especializado en la captura, procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T para inducir inmunidad o tolerancia (Foti y col, 2004). Las DCs se identificaron por primera vez en la epidermis donde recibieron el nombre de células de Langerhans. También se localizan en los folículos de casi todos los órganos como DCs intersticiales, en órganos no linfoides como epitelios, a la forma de células de Langerhans, en la sangre como DCs de sangre periférica, en áreas ricas en linfocitos T de órganos linfoides secundarios como DCs interdigitantes, en la médula tímica como DCs tímicas y en los folículos de los linfocitos B de los órganos linfoides secundarios como DCs de centros germinales o DCs foliculares (Marrk y col, 2005).

Las DCs han sido bien equipadas para presentar el antígeno a las células T vía moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II, exhiben una alta expresión de co-receptores en su superficie que son requeridos para la activación de células T, como CD40, CD80 y CD86, y la

secreción de citoquinas por estas DCs, iniciando la respuesta Th1 o Th2, la actividad citotóxica (CD8+) y la respuesta mediada por linfocitos B (Shortman y col, 2002).

La biología de las DCs fue inicialmente descrita hace más de 40 años, definidas como varios tipos celulares que posteriormente fueron caracterizados fenotípicamente y funcionalmente. Inicialmente se caracterizaron DCs hematopoyéticas provenientes de cordón umbilical o médula ósea, luego DCs maduras provenientes de sangre periférica humana (PBMC), que proveía de una fuente de DCs para uso clínico, pero hoy en día se sabe que existe un gran número de fuentes de DCs con características heterogéneas y con diferencias substanciales entre los diferentes subtipos tanto humanos como murinos (Blanch-Olszewska y col, 2005). Algunos investigadores atribuyen las características de las DCs de acuerdo a su linaje. Sin embargo otros investigadores las han clasificado por su gran plasticidad y funciones específicas adquiridas de acuerdo al ambiente en el que se encuentran (Santiago-Schwartz y col, 2004).

En cuanto a la ontogenia de las DC de origen murino se ha dividido principalmente dentro de tres grupos, caracterizados por la expresión de moléculas de superficie, clasificándolas como DCs de origen mielóide, linfóide y plasmocitoide (TABLA 1). Dentro del tejido linfóide primario, como el timo, las DCs median la selección de células T reguladoras y es sugerido como el principal mecanismo de prevención de clones auto reactivos, con ello el papel de las DC es fundamental para la mantención de la tolerancia central en la médula tímica y la tolerancia periférica en las áreas T de los tejidos linfoides (Qua y O'Neill, 2005). Dentro del linaje mielóide humano y murino, existen dos vías de desarrollo a partir de progenitores CD34+, una vía origina DCs derivadas de monocitos conocidas también como DCs CD14^{dim}CD1a⁺ y la otra vía se caracteriza por ser CD14^{neg}CD1a⁺. Las DCs CD14⁺ humanas también pueden ser generadas a partir de monocitos de sangre periférica, este es el

método mas utilizado para generar DCs para estudios *in vitro* y para protocolos de inmunoterapia dirigidas contra el cáncer y otras enfermedades (Van Krink, 2004 y Ardavín, 2004). Finalmente DCs de origen plasmocitoide (pDC) fueron descritas inicialmente en tejidos linfoides, por su morfología similar a las células plasmáticas, estas carecen del marcador de linaje linfoide presentes en células B, células T y células NK y además carecen del marcador de linaje mieloide. En humanos las pDC provenientes de PBMC se caracterizan por la falta de marcadores de linaje mieloide como CD11b, CD11c, CD13 y CD33. En cambio en pDC de origen murino provenientes de médula ósea expresan normalmente CD123, pero se distinguen de las DC de origen mieloide por ser CD11b⁻CD11c^{low}B220⁺ (Barchet y col, 2005).

TABLA 1. SUB-POBLACIONES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MURINAS

Sub-grupos de DC	Marcador	Función
Mieloide	CD11c ⁻ CD205 ⁻ CD11b ⁺ CD8αCD4±	Localizados en zonas marginales del bazo. Eficiente estimuladoras de células CD4 ⁺ y CD8 ⁺ . Favorece la diferenciación Th2 durante la infección.
Linfoide	CD11c ⁻ CD205 ⁺ CD11b ⁻ CD8α CD4 ⁻	Eficiente cross-presentadora endógena a CD8 CTL. Favorece la respuesta Th1 durante condiciones inflamatorias. Mantiene la cross-tolerancia a auto-antígenos.
Plasmocitoide	CD11c ⁻ CD11b ⁻ B220 ⁺ GR1±	Posiblemente contribuye a la tolerancia periférica. median la respuesta anti viral a través de la producción de IFN-α.

Wallet, 2005

3.2 FUNCIÓN Y MADURACIÓN DE LAS DCS

En estado inmaduro de desarrollo las DCs se caracterizan por una alta capacidad fagocítica y una baja expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 y moléculas accesorias como CD40, actúan como centinelas, censando el ambiente en tejidos periféricos, capturando continuamente antígenos por diferentes mecanismos como; 1) macropinocitosis, dependiente de citoesqueleto, que permite la captura de grandes volúmenes de fluido y solutos, 2) endocitosis mediada por receptores tipo lectina como el receptor de manosa (CD206) o DEC-205 (CD205), y receptores Fc. Este último receptor se degrada tras la internalización, mientras que el receptor de manosa se recicla, lo que permite la acumulación de ligandos por un reducido número de receptores, 3) captura de cuerpos apoptóticos a través del receptor de vitronectina (Sallusto y col, 1995).

Bajo estimulación las DCs maduran, procesando y presentando el antígeno con altos niveles de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y

de moléculas co-estimuladoras, exhibiendo un fenotipo CD11c⁺ MHCII^{hi} CD86^{hi} CD40⁺, con secreción de varias citoquinas y quimioquinas que inician y/o amplifican la respuesta mediada por linfocitos T y B. Esta respuesta incluye: 1) inducción de linfocitos T CD4⁺ y diferenciación en los sub-tipos Th1 y Th2, 2) activación y aumento de la citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8⁺. 3) maduración de linfocitos B, cambio de la clase de Inmunoglobulina y producción de anticuerpos (Wallet y col, 2005).

Las DCs expresan receptores TLR principalmente TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-8 y TLR-9 que son específicos para un amplio número de moléculas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que incluyen lipoproteínas derivadas de procariontas, glicolípidos, flagelina, histidina-guanosina fosfato (CpG) del DNA bacterial, oligonucléotidos (ODN), doble hebra de RNA viral, LPS, productos de células necróticas como proteínas del shock térmico y unión de CD40 a CD40L que activan a las DCs (Warncke, 2005). LPS de *E. coli* estimula la producción de IL-12 en DC CD8⁺, dando una respuesta Th1, LPS derivado de *C. albicans* también conduce a una respuesta Th1 con producción de IL-12, pero en estado de hifa *C. albicans* estimula la producción de IL-12 dando como resultado una respuesta Th2 (Qua y col, 2005).

Las DCs que han sido expuestas a señales de peligro expresan altos niveles de MHC I/II y moléculas co estimuladoras, entregando señales antigénicas a las células T en un contexto restringido al MHC. Además regulan positivamente el receptor de quimioquina CCR7, que está asociado a la capacidad de las DCs para migrar a través del endotelio linfático y concentrarse dentro de áreas ricas en células T. Las DCs localizadas en estas áreas amplifican la señal iniciando la activación clonal de linfocitos T (Lars Ohl y col, 2004). En este proceso de maduración, las DCs se caracterizan por la expresión en su superficie de péptidos a la forma de complejos péptido-MHC. Los péptido exógenos son presentados en moléculas del MHC clase II, mientras que los antígenos

endógenos (de componentes propios o virus) son presentados en el MHC clase I (Shortman y Liu, 2002). La proteína internalizada puede acumularse por un período de 60 horas en las DCs inmaduras, pero 3-4 horas después de la inducción de la maduración, las DCs rápidamente comienzan a acomplejar el péptido en la molécula de MHC. En este proceso también comienza una neobiosíntesis de MHC I, moléculas CD86 y una regulación negativa de la capacidad de endocitar, la cual previene la reabsorción y degradación del complejo péptido-MHC y promueve la expresión estable en su superficie. El proceso de maduración culmina con DCs en las áreas ricas en linfocitos T de los tejidos linfoides, presentando péptidos antigénicos adquiridos en la periferia en el contexto MHC a los linfocitos T. En las DCs maduras moléculas de MHC son expresadas en una proporción 10-100 veces superior que en células B o monocitos. Comienza una regulación positiva de moléculas co estimuladoras como CD80 y CD86 y de CD40, así como también la expresión de receptores de quimioquinas como CCR7 que une CCL21 y CCL19, atrayendo células T vírgenes localizadas preferentemente en áreas para-corticales de tejidos linfoides secundarios. Además se expresan varias moléculas de adhesión que incluyen CD2, CD11a, CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA-3) y las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ (Qua Ben y col, 2005). Así, las DCs activadas liberan citoquinas como IL-12, la cual modula y estimula la producción de IFN- γ por las células T y NK, activan células T CD8⁺, o comienzan ellas su proceso de apoptosis *in situ*. Por otro lado activan a células T, las cuales migran a folículos de células B, vía activación de moléculas de adhesión que interactúan con células B antígeno-específicas. Producto de esta interacción se produce una expansión clonal de células B, las cuales toman lugar en las áreas ricas en células T y en centros germinales (Mohamadzadeh y col, 2004).

3.3 INTERACCIÓN CÉLULA DENDRÍTICA-LINFOCITO T

Durante la activación de la célula T se requiere de un contacto denominado “sinapsis inmunológica” (Van Gisbergen y col, 2004). Para que exista una eficiente respuesta inmune, el TCR en el linfocito T, se une a la DC por intermedio de la molécula MHC formándose el complejo péptido/MHC (señal 1), estos complejos se encuentran inicialmente en la periferia del anillo de unión, pero dentro de pocos minutos se acumulan en el centro de la sinapsis. La segunda fase de esta interacción ocurre a pocos segundos. Señales de calcio, seguido por el reclutamiento de moléculas de señalización como LCK, ZAP70, PI3K y su fosforilación, activan la cascada intracelular. Luego 5 a 30 minutos de una continua interacción se forma una unión célula-célula, definida como una segregación molecular que conduce a una zona central que es acompañada por un reclutamiento de una gran cantidad de molécula accesorias que expresan las DCs como CD80, CD86 y CD40, y su interacción con los ligandos de las células T (CTLA-4, CD28 y CD40L respectivamente), conocida esta como la señal 2 (Ilustración 1). Por último la resolución de esta unión ocurre cuando la célula T y la DC son separadas, dando como resultado la migración de estas células (Freid y col, 2005).

Las DCs secretan por sí solas numerosas citoquinas durante el proceso de maduración, entre las cuales destacan interleuquina 6 (IL-6), IL-10, $TNF\alpha$ e IL-12. Esta última es esencial para la activación y la polarización de los linfocitos hacia el sub-tipo Th1 los cuales secretan principalmente IL-2 e interferón γ ($IFN\gamma$) que promueven la inmunidad celular, mientras que los linfocitos Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6 e IL10, que facilitan la respuesta humoral. Esta es la denominada señal 3 involucrada en la sinapsis inmunológica dado por el microambiente en el cual ocurre esta interacción.

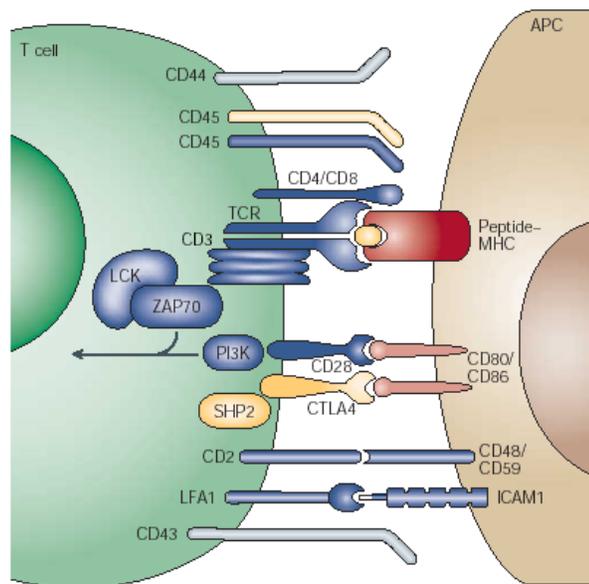


Ilustración 1: Sinapsis inmunológica. Moléculas involucradas en la interacción de la célula presentadora de antígeno (APC) y la célula T.

Huppa J. Nature, 2005

3.4 CÉLULAS DENDRÍTICAS Y TOLERANCIA

La tolerancia definida también como ausencia de autoinmunidad antígeno-específica es atribuida a la falta de accesibilidad del antígeno, ausencia de células T (deleción) o falta de señales de activación suficiente, durante el proceso de selección clonal en el timo. Además existen otros mecanismos involucrados en la tolerancia a nivel periférico que incluyen anergia o apoptosis de células T reactivas, inducción de células T reguladoras y citoquinas inmunoregulatoras secretadas por células T (Steinman, y col, 2003).

Las células T regulan o suprimen a otras células T efectoras por medio de células T naturalmente reguladoras (Treg), células T helper tipo 3 (Th3), y células T reguladoras tipo 1 (Tr1) que bloquean la función de otras células efectoras CD4⁺ y CD8⁺. El término Treg se utiliza para denominar las células CD4⁺CD25⁺, que son generadas en el epitelio cortical del timo y que migran a la periferia luego de ser educadas en el proceso de selección negativa,

comprenden aproximadamente el 5-10% de las células T CD4⁺CD8⁻ de sangre periférica. Se caracterizan por expresar constitutivamente el receptor de glucocorticoides inducido por TNF (GITR), la proteína relacionada a la familia de L-selectina (CD62L), CTLA-4 (CD125), CD45RB, la integrina $\alpha_4\beta_7$, y el factor transcripcional Foxp3. En cambio el término Tr1 es utilizado para las células T reguladoras inducidas, cuyos precursores son CD4⁺CD25⁻ generados en la periferia, y que son productores de IL-10 y TGF β , controlando la función de las células T de memoria y suprimiendo la respuesta Th1 y Th2 (Roncarolo y col, 2003). Células reguladoras Th3 son el único sub-grupo que primariamente secreta TGF β , proveyendo de ayuda para la síntesis de IgA y disponer de propiedades supresivas a células Th1 y Th2 (Rutella, y col, 2004).

En ausencia de señales inflamatorias o estímulos infecciosos, denominado "steady-state", muchas DCs se mantienen en estado inmaduro, con capacidad de endocitar, procesar y presentar antígenos en la forma de complejos péptido-MHC clase I o II, pero incapaces de iniciar la diferenciación de células T efectoras y de memoria (Ilustración 2). Estas DCs en "steady-state" son responsables de diferentes formas de tolerancia periférica, como delección, anergia, o la expansión de células T reguladoras (Shin-ichiro y col, 2004).

Por otra parte la IL-10 es la principal citoquina anti-inflamatoria, secretado principalmente por linfocitos T, monocitos y macrófagos. Tratamientos *in vitro* de DCs con IL-10 induce un fenotipo inmuno-regulador que conduce a una inhibición de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, que a su vez secretan IL-10 y suprimen la respuesta *in vitro* de células T naïve. Pre-tratamientos de DCs con IL-10 inhiben su maduración, las que bajo estimulación con LPS secretan citoquinas pro-inflamatorias que incluyen IL-1 β , IL-6, IL-12p70 y TNF α , regulando positivamente la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 y también de CD40 e inducen la proliferación de linfocitos T (Nolan y col, 2004). Sin embargo, otros investigadores han demostrado que las DCs pre-tratadas con IL-10 permanecen inalteradas en la expresión de moléculas co-

estimuladoras y en su capacidad fagocítica, esto resultados también han sido ratificados por nuestro grupo (Wallet y col, 2005 y Aguirre y col, 2006, comunicación personal).

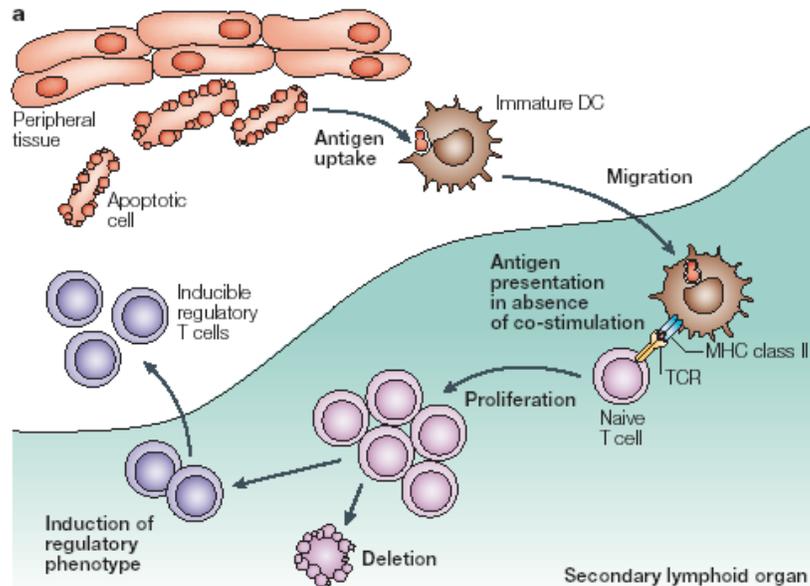


Ilustración 2: Generación de Tolerancia. Células dendríticas en estado inmaduro o en ausencia de co-estimulación conducen a tolerancia por deleción de células T auto-reactivas o inducción de células T reguladoras

Bancherau and Paluka J. Nature, 2005

3.5 ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial con altos costos económicos, sociales y personales. Posee un predisposición genética asociada a los alelos DR4/DR1 del HLA (Feldmann y col, 2001). Se caracteriza por una inflamación crónica, y una infiltración sinovial de células inmunes tales como células T CD4⁺, células B, macrófagos, células plasmáticas y células dendríticas, y por la producción de citoquinas como TNF α e IL-1 (Van Krinks y col, 2004). En etapas

mas avanzadas de la enfermedad ocurre la destrucción del hueso, mediada por osteoclastogénesis promovida por los mediadores liberados por las células encontradas en las lesiones.

Inicialmente las terapias se enfocaron sólo al control de la destrucción de las articulaciones y la preservación de su función, utilizándose drogas como metotrexato, leflunomide y sulfasalazina principalmente, sin detener la destrucción del cartílago y hueso. Ello explica el surgimiento de otras alternativas terapéuticas como el uso de anticuerpos monoclonales contra el TNF α , bloqueando la acción de éste, y reestableciendo la función de las células T y la homeostasis inmune, regulando así la destrucción del cartílago y hueso (Elliot y col, 1993). Más recientemente han surgido otros blanco para tratar la AR como inhibidores de NF- κ B, inhibidores de IL-1 como IL-1ra, pero no han demostrado ser tan eficaces como el uso de anti-TNF α (Feldmann, 2001). Sin embargo, el conjunto de las terapias biológicas no constituyen una solución real, debido al alto costo de estas estrategias, por ello, en los últimos años han surgido nuevos enfoques basados en el uso de células dendríticas, debido a su gran potencial inmunoregulador y por su capacidad de generarlas *in vitro* y manipularlas en el laboratorio.

4 HIPÓTESIS.

“Existe una sub población de células dendríticas murinas inmuno moduladoras, capaces de generar una respuesta tolerogénica en el modelo murino de artritis reumatoide”.

5 OBJETIVO GENERAL

Obtener células dendríticas murinas derivadas de médula ósea *in vitro* con características tolerogénicas, capaces de modular un modelo *in vivo* de autoinmunidad.

6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

6.1 Obtener células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones de la cepa DBA1/lacJ.

6.2 Diferenciar las células dendríticas derivadas de médula ósea en DCs inmaduras, semi-maduras y totalmente maduras.

6.3 Caracterizar en las diferentes sub-poblaciones de células dendríticas derivadas de médula ósea la expresión de moléculas de superficie.

6.4 Caracterizar las diferentes sub-poblaciones de células dendríticas derivadas de médula ósea por ensayos funcionales.

6.5 Realizar un ensayos *in vivo* en el modelo murino de artritis, mediante el uso de células dendríticas torelógicas derivadas de médula ósea.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 PREPARACIÓN DE MÉDULA ÓSEA

Ratones machos y hembras de la cepa DBA1/lacJ de entre 7 a 8 semanas de edad fueron sacrificados por dislocación cervical, se extrajeron las tibias y fémures removiendo el tejido muscular que rodea al hueso por frotación con papel tissue. Luego los huesos intactos fueron sumergidos en etanol al 70% por 2-5 minutos para su desinfección y posteriormente lavados en PBS (buffer fosfato salino). Ambos extremos fueron cortados con material quirúrgico y la médula ósea fue extraída por bombeo con PBS con jeringa y aguja de 0.45 mm de diámetro. Los grupos de células obtenidos de la médula ósea resuspendidos fueron disgregados por pipeteo vigoroso. Luego de ser lavadas con PBS, alrededor de $2.5-3 \times 10^7$ de células precursoras de médula ósea fueron obtenidas por animal.

7.2 CULTIVO DE CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA

El principal método para generar BMDC (Bone Marrow Dendritic Cells) en presencia de rmGM-CSF (recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) fue adaptado de la literatura (Lutz y col, 1999). Se utilizaron placas de 6 pocillos de fondo plano para cultivar las celular (Falcon 35304), en medio Iscoves`s Modified Dulbecco`s Médium (IMDM GIBCO, con Glutamax, Hepes y bicarbonato de sodio), suplementado con Penicilina-Streptomicina (100 U/mL, GIBCO, L-glutamina 2 mM, GIBCO/BRL), 2-mercaptoetanol (50 μ M, SIGMA-ALDRICH) y 10% FCS (fetal calf serum). Al día 0 de cultivo, 3×10^6 células por pocillo fueron sembradas en presencia de 1000 U/ml de GM-CSF (BD PharMingen, CA, USA), incubadas a 37°C a 5% CO₂. Al día 3 de cultivo, a

cada pocillo se adicionó 3 ml de medio de cultivo fresco en presencia de 500 U/ml de GM-CSF. Al día 5 de cultivo, el total del medio fue removido y centrifugado a 1300 rpm por 5 minutos, el pellet obtenido fue nuevamente sembrado a la misma concentración de las placas originales, en medio fresco en presencia de GM-CSF. Finalmente al día 7 de cultivo, se obtuvo aproximadamente el 50% de las células inicialmente sembradas.

7.3 DIFERENCIACIÓN Y MADURACIÓN DE BMDC

Al día 5 o 6 de cultivo, se adicionó una dosis de IL-10 (eBioscience, CA, USA) a una concentración final de 500 U/ml, de modo de inhibir o mantener el estado inmaduro de desarrollo. Para inducir un fenotipo semi-maduro se adicionó el día 5 ó 6 de cultivo, 500 U/ml de TNF α (BD PharMingen, CA, USA). Finalmente, para inducir la maduración de las BMDC se adicionó LPS (SIGMA, *E.coli* 026:B6, St Louis USA) a una concentración final de 1 μ g/mL por 4 y 24 horas. Como control se mantuvieron BMDC sin ningún estímulo, sólo en presencia de 500 U/ml de GM-CSF. Para comprobar si las BMDC inmaduradas con IL-10 no responderían frente a un estímulo inflamatorio, se adicionó LPS a la misma concentración descrita anteriormente.

7.4 CITOMETRÍA DE FLUJO

La expresión de varias moléculas de superficie fue identificada utilizando anticuerpos monoclonales (Acm) y un equipo de citometría de flujo FACScan (Becton Dickinson). Células frescas resuspendidas en PBS fueron incubadas con Acm (1:50) por 30 minutos a 4°C en oscuridad, luego fueron lavadas 2 veces con PBS frío y fijadas en 50 μ L de para-formaldehído al 4%. Los datos de fluorescencia obtenidos fueron analizados utilizando el programa WINMDI. Los siguientes Acm fueron utilizados: CD11c, MHC clase I, CD40 CD86, CD54,

CCR7 y CD45RB conjugados a fluoresceína isotiocianato (FITC) (eBioscience, CA, USA).

7.5 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ENDOCÍTICA DE BMDC

La capacidad endocítica de las BMDC fue determinada por citometría de flujo utilizando como péptido sintético Dextran conjugado a FITC (40 KDa, Molecular PROBES, Leiden Netherland). 2×10^5 BMDC fueron incubadas con 50 μ l de Dextran-FITC a una concentración de 1 mg/ml a 37°C por 4 horas, en oscuridad. Para determinar la endocitosis no específica de Dextran por las BMDC, la misma cantidad de células fueron incubadas a 4°C por 4 horas en oscuridad (control negativo), pasado el tiempo de incubación las BMDC fueron lavadas 2 veces en PBS frío y finalmente fijadas en 50 μ L de para-formaldehído al 4%. Luego de determinar la intensidad de fluorescencia asociada las células fueron analizadas por FACScan (Becton Dickinson, CA, USA).

7.6 DETERMINACIÓN DE SECRECIÓN DE CITOQUINAS POR LAS BMDC

La concentración de IL-12p40/70 como inductor de respuesta Th1 y de IL-10 como citoquina inductora de respuesta Th2 fueron determinadas en los sobrenadantes de cultivos de BMDC al día 7, a una concentración de 10^6 células/ml, en los diferentes estados de maduración, pasada 24 horas de cultivo por Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Placas de ELISA de 96 pocillos (Nunclon, Denmark), fueron incubadas por toda la noche con el anticuerpo de captura anti-IL-12p70 (eBioscience, CA, USA) a 4°C. Luego fueron lavadas tres veces en PBS/Twen-20 y bloqueadas con PBS/BSA al 1% por 2 horas a 37°C, procediéndose a la adición de los estándares y las muestras, en duplicado incubando por 2 horas a 37°C. Posteriormente las placas fueron incubadas con el anticuerpo revelador anti-IL12p70 biotinilado

(eBioscience, CA, USA) por 2 horas a temperatura ambiente, para luego ser incubadas con peroxidasa de rábano picante acoplada a streptavidina (HRP), diluida 1:50 por 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Las placas fueron lavadas 3 veces y reveladas con 50 μ l de ATBS (2,2'-Azino-bis-3-ethylbenziazoline-6-sulfonic acid) (Rockland, PA, USA). La absorbancia fue leída en un espectrofotómetro a 405nm (Biorad, 3550, CA, USA)

7.7 INDUCCIÓN DE ARTRITIS MURINA

Ratones DBA1/lacJ (H-2^q) fueron inmunizados con colágeno bovino tipo II (CII) (Chondrex, WA, USA) disuelto en ácido acético 0.1M a 4°C durante toda la noche a una concentración de 2 mg/ml. 100 μ g de CII/ratón emulsionado con igual volumen de coadyuvante completo de Freund (CFA), fue inyectado subcutáneamente en un volumen de 100 μ L en la base de la cola de cada ratón. Dos semanas después, se realizó un “booster” con 100 μ g/ratón de CII emulsionado el Coadyuvante incompleto de Freund (IFC). Pasada dos semanas de la inmunización, se evaluaron periódicamente cada 3 días las manifestaciones clínicas de la enfermedad basado en un sistema de puntuación, determinado por el edema e índice artrítico de las extremidades de cada ratón.

7.8 ENSAYOS *IN VIVO* EN RATONES CIA

Las BMDC cultivadas por 7 días, previamente cargadas con CII (10 μ g/ml), fueron sometidas a diferenciación por estimulación con LPS por 4 horas, luego de ser lavadas, fueron inoculados intraperitonealmente al día 35 iniciado el protocolo de inducción de la CIA a una concentración de 10⁶células/ml en 500 μ l PBS estéril. Posteriormente, se evaluó la respuesta al tratamiento cada 3 días mediante la evolución de la enfermedad, con el mismo sistema de puntuación

basado en el índice artrítico y edema. Se puso término al protocolo el día 70 post inducción de CIA.

7.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos son representados como la media \pm la desviación estándar. La Intensidad de fluorescencia media (MFI) para las moléculas de superficie CD11c, MHC I, CD86 ,CD40, la capacidad de endocitosis y la producción de citoquinas se analizaron utilizando un test de ANOVA no pareado (análisis de varianza en un sentido con test de comparación múltiple de Bonferroni). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si $p < 0.05$. Para los análisis estadísticos se utilizó el software GraphPad InStat versión 3.0.

8 RESULTADOS

8.1 OBTENCIÓN DE BMDC

Aproximadamente un total de 3×10^7 precursores de médula ósea se obtuvo por cada ratón sacrificado, se tomaron cerca de 3×10^6 al día 0, 3, 5, 7, 9 y 11 de cultivo, de modo de obtener una gradiente de diferenciación de células precursoras de médula ósea, determinado por citometría de flujo. Al día 0 de cultivo, se vio principalmente células de pequeño tamaño (FSC) y granularidad (SSC) que corresponden a células precursoras de médula ósea indiferenciadas (Fig. 1A). Al día 3 de cultivo, estas células van cambiando su forma y tamaño como indicador de diferenciación, observando claramente dos poblaciones (Fig. 1B). A partir del día 5 de cultivo, se logra distinguir una población diferente a la observada inicialmente, esta permanece uniforme y mayoritaria durante los posteriores 7, 9 y 11 días de cultivo (Fig.1C, D, F). Esta población presenta características morfológicas similares que podrían corresponder a células dendríticas. Por lo tanto a partir del día cinco de cultivo logramos diferenciar precursores de médula ósea con características de células dendríticas (BMDC), las cuales al microscopio poseen morfología de células de gran tamaño y con prolongaciones, que corresponderían a células dendríticas. Para los posteriores ensayos se utilizarán BMDC cultivadas por siete días como protocolo estándar de generación de estas.

3 SS
C

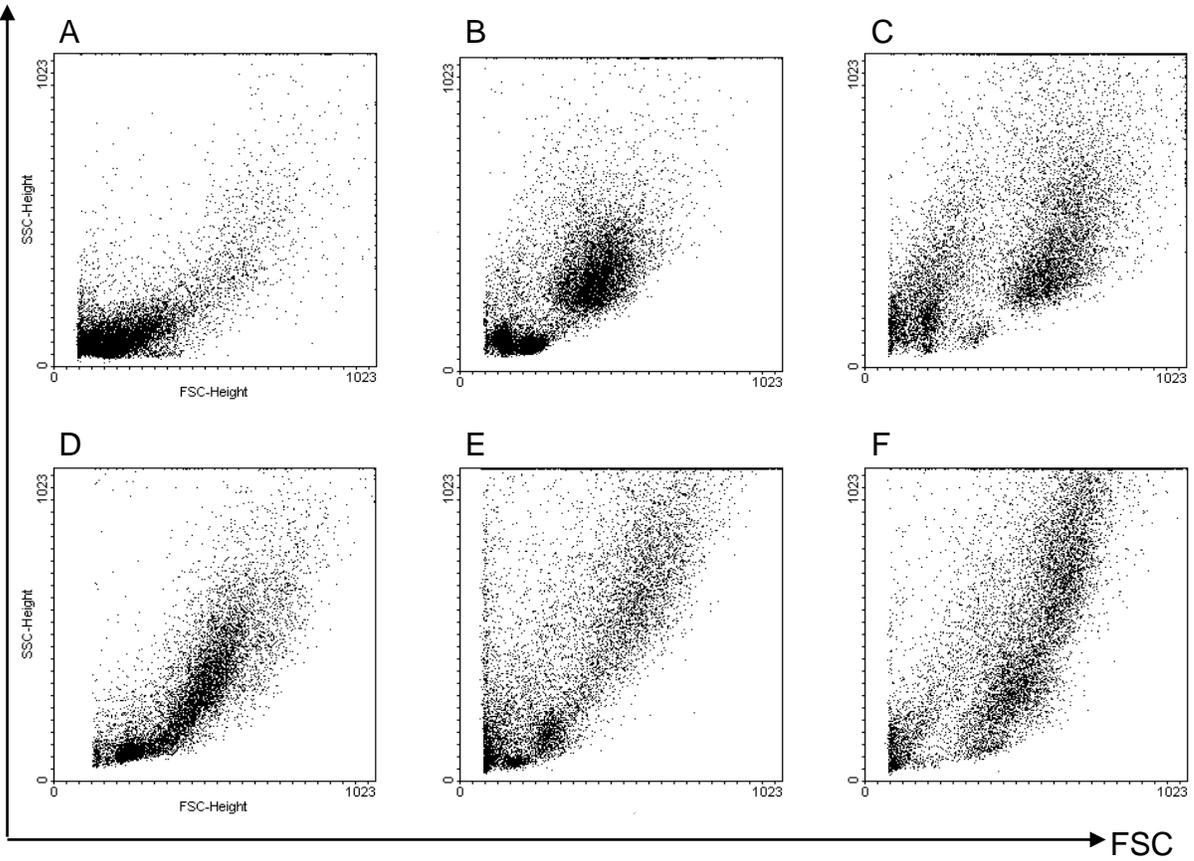


Figura 1: Células precursoras de médula ósea en cultivo fueron tomadas y fijadas para ser analizadas por citometría de flujo. Los dot-plot obtenidos representan en el eje de las ordenadas la granuralidad o complejidad celular (SSC) y en el eje de las abscisas el tamaño (FSC) celular. En A, se muestra células al día 0 de cultivo, en B, al día 3, en C al día 5, en D, al día 7, en E, al día 9 y F al día 11 de cultivo. Figura representativa de 3 experimentos independientes.

8.2 CITOMETRÍA DE FLUJO

Se obtuvieron DC a partir de precursores de médula ósea (BMDC) tras 7 días de cultivo en presencia de GM-CSF, las que posteriormente fueron analizadas por citometría de flujo. Se seleccionaron las células con características de BMDC por tamaño (FSC) y granularidad o complejidad celular (SSC) en la Región 1 (R1) en el gráfico dot-plot (Fig 2A). Como marcador de diferencial de células dendríticas, se utilizó la molécula de superficie CD11c, la cual se encuentra conjugada al fluorocromo FITC. Esta tinción se realizó sobre células de R1 para las cuales se utilizó como control negativo de tinción células sin marcar (Fig. 2B), fijando de esta manera el cuadrante en la cual células que expresan la molécula de CD11c emiten la fluorescencia (Fig. 2C), obteniendo aproximadamente el 60% de células que expresan esta molécula. De esta misma forma, células que expresan CD11c aparecen como un pico en el histograma con una intensidad media de fluorescencia (MFI) asociada a CD11c de 140, en comparación a célula sin marcar que muestran una MFI asociada de 50 (Fig 2D).

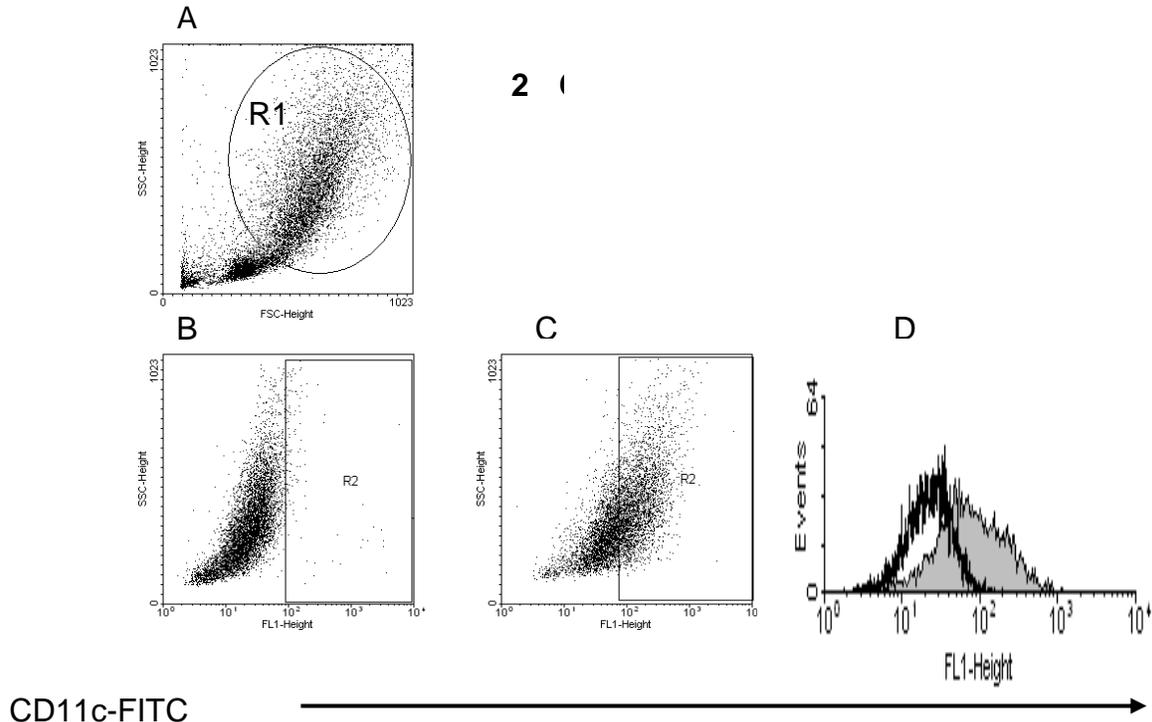


Figura 2: Gráficos Dot-Plot BMDC al día 7 de cultivo obtenidos por citometría de flujo. La población celular seleccionada por tamaño y granularidad en la región R1 (A) se utilizó para cuantificar el porcentaje de DCs en el cultivo, células sin tinción (B), y con tinción para CD11c (C) fueron analizadas, observándose aproximadamente 60% de células con este marcador. La fluorescencia media (MFI) asociada al marcador CD11c fue observada en un histograma, sin tinción (línea oscura sin relleno) y con tinción (en gris) (D). Figura representativa de 3 experimentos independientes.

8.3 ESTIMULACIÓN DE BMDC

Al día 5 de cultivo de las BMDC se adicionó una dosis de IL-10 de manera de mantener el cultivo 48 horas con el estímulo. Al día 6 de cultivo, se estimularon otras células con una única dosis de IL-10, manteniendo el estímulo por 24 horas. Para determinar si este estímulo sería suficiente para inhibir la maduración de las BMDC provocada por un estímulo inflamatorio como lo es LPS por 24 horas. Paralelamente las BMDC se sometieron a estímulos con $TNF\alpha$ por 48 y 24 horas. Adicionalmente, se estimularon BMDC con LPS por 4 y 24 horas, dejando como control células sin ningún estímulo. Todos los

experimentos se hicieron por duplicado. Inicialmente se determinó la variación en la expresión de la molécula CD11c con los diferentes estímulos, de modo que éstos no influyeran en la obtención de DCs, observándose sólo diferencias significativas en BMDC estimuladas con $\text{TNF}\alpha$ por 24 horas (** $p < 0.01$) y $\text{TNF}\alpha$ por 48 horas (* $p < 0.05$) comparada a BMDC sin estimular, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para el resto de los estímulos (Fig.3). Los resultados nos indicaron que los diferentes estímulos no afectan el rendimiento de BMDC en nuestro cultivo.

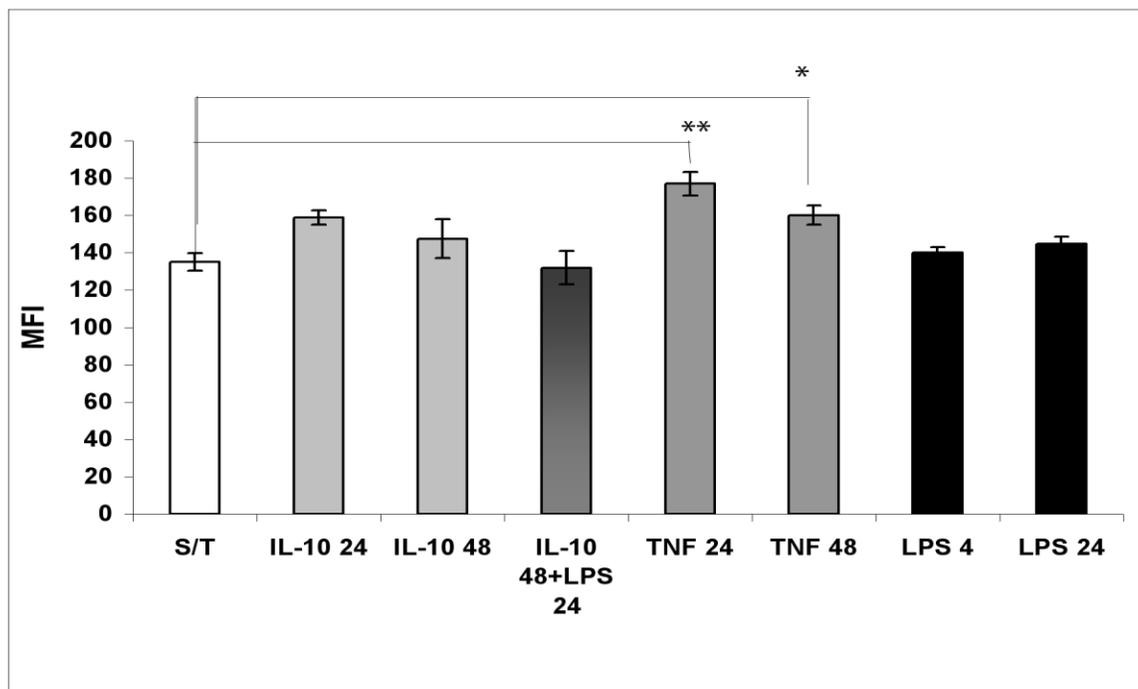
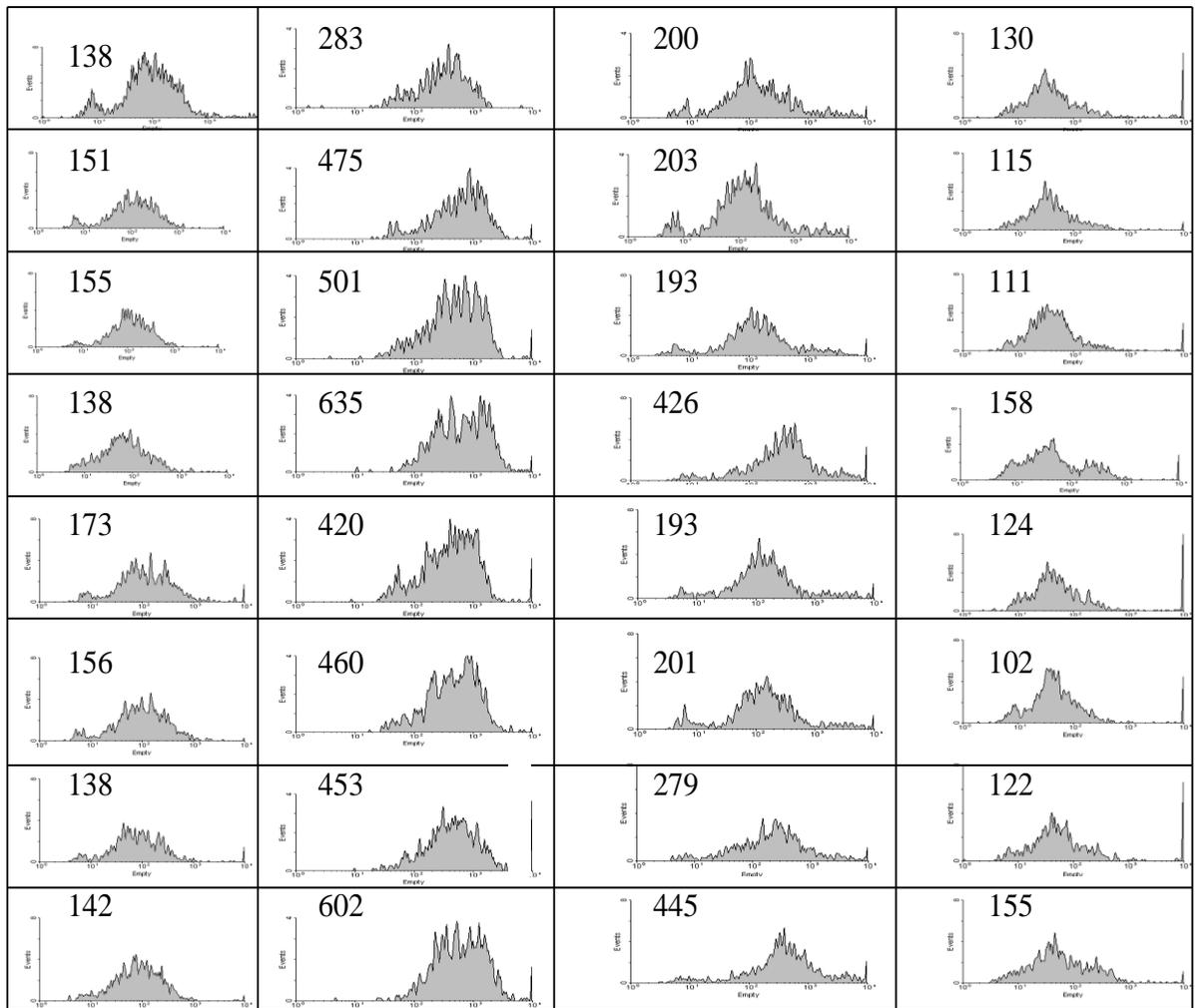


Figura 3: Expresión de CD11c. BMDC fueron teñidas y fijadas al día 7 de cultivo para determinar la expresión de CD11c por citometría de flujo. En la gráfica se observan sólo diferencias significativas en la expresión de CD11c para BMDC expuestas a $\text{TNF}\alpha$ por 24 horas (** $p < 0.01$) y $\text{TNF}\alpha$ por 48 horas (* $p < 0.05$) en comparación a BMDC sin tratamiento. Datos son representados como promedio de tres muestras con sus desviaciones estándar correspondientes.

8.4 CARACTERIZACIÓN DE BMDC

Para determinar el estado de maduración de las BMDC, se determinó por citometría de flujo, la expresión por las BMDC de las moléculas de superficie MHC I, CD40 y CD86 conjugadas a FITC frente a los diferentes estímulos de diferenciación. En la figura 4 se representa los histogramas que representan la intensidad media de fluorescencia (MFI) asociada a cada molécula de superficie expresada diferencialmente por la presencia de los diferentes estímulos. Células sin tratamiento (S/T) solo en presencia de GM-CSF fueron obtenidas como células no estimuladas, células en presencia de IL-10 por 48 horas (IL-10 48) y por 24 horas (IL-10 24) fue utilizado como inhibidor de la maduración, células tratadas con IL-10 por 48 horas fueron desafiadas con LPS (IL-10 + LPS), células en presencia de TNF α por 48 horas (TNF α 48) y 24 horas (TNF α 24) fue utilizado como estímulo para obtener células en estado semi maduro. Finalmente células tratadas con LPS por 4 (LPS 4) y 24 horas (LPS 24) fue utilizado como estímulo inflamatorio inductor de la maduración de las células generadas.



CD11c

MHC I

CD40

CD86

Figura 4: Expresión de CD11c, MHC I, CD40 y CD86, representado en histogramas. BMDC sin tratamiento o expuestas a diferentes estímulos como; IL-10 por 24 y 48 horas, IL-10 por 48 y LPS por 24 horas, TNF α por 24 y 48 horas y LPS por 4 y 24 horas, de arriba abajo respectivamente, BMDC fueron teñidas y fijadas al día 7 de cultivo para determinar la expresión de estas moléculas por citometría de flujo. La intensidad media de fluorescencia (MFI) asociada a cada estímulo fue obtenida para cada uno de las moléculas de superficie. Figura representativa de 3 experimentos independientes.

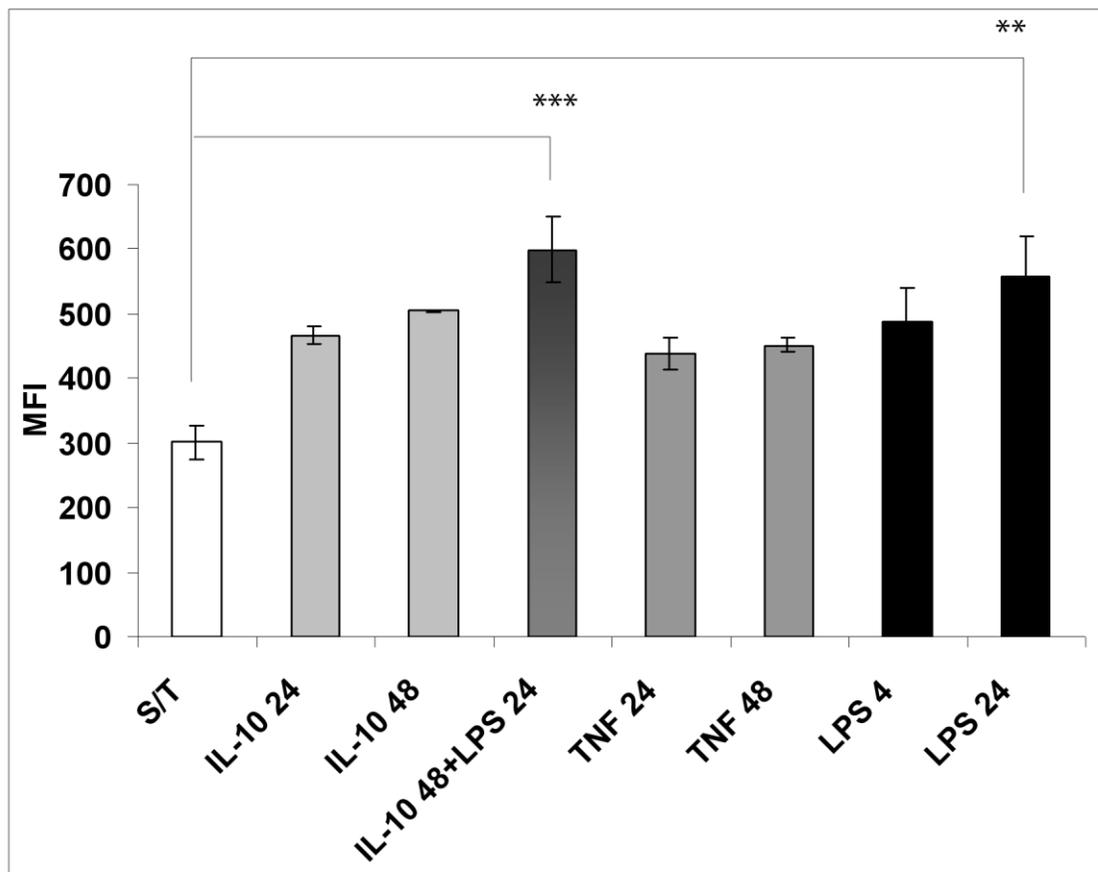


Figura 5: Expresión de MHC I. BMDC fueron teñidas y fijadas al día 7 de cultivo, para determinar la expresión de MHC I por citometría de flujo. Se representa la MFI asociada a la expresión de MHC I al ser expuestas a diferentes estímulos, siendo estas diferencias significativas (** $p < 0.01$) para BMDC estimuladas con LPS por 24 horas y BMDC pre-tratadas con IL-10 y posteriormente estimuladas con LPS (** $p < 0.001$), comparadas a BMDC sin estimular. Datos son representados como promedio de tres muestras con sus desviaciones estándar correspondientes.

En la Figura 5 se observa que BMDC sometidas a estímulos inflamatorios, la expresión de moléculas MHC I se encuentran significativamente aumentada, para BMDC tratadas con LPS por 24 horas (** $p < 0.01$), y para BMDC pre-tratadas con IL-10 y posteriormente desafiadas con LPS (** $p < 0.001$). Para las BMDC expuestas a IL-10 por 48 horas se observó un aumento significativo (** $p < 0.01$) de MHC I, para BMDC tratadas con IL-10 por 24 horas, TNF α por 48 horas, y LPS por 4 horas la expresión de esta molécula se vio parcialmente

aumentada (* $p < 0.05$). En cambio para BMDC tratadas con $\text{TNF}\alpha$, no se observó un aumento en la expresión de MHC I en comparación a células no tratadas ($p > 0.05$). Esto nos indica que MHC I se sobre expresa en las BMDC sólo cuando son sometidas a estímulos inflamatorios fuertes, sugiriendo que estas BMDC serían capaces de inducir una eficiente respuesta inmune.

También se evaluó la expresión de la molécula CD40 como indicador de activación para BMDC, En la Figura 6 se observa que un estímulo infamatorio como LPS por 24 horas es el único capaz de inducir una expresión significativamente mayor (** $p < 0.001$), tanto con o sin pre-tratamiento con IL-10, comparadas con células sin estimular. También se observa un aumento en la expresión de CD40, aunque en menor proporción (* $p < 0.05$) para BMDC tratadas con LPS por 4 horas comparadas a BMDC sin tratamiento. Se observa una diferencia significativa entre BMDC tratadas con LPS por 24 comparadas a BMDC tratadas con LPS por 4 horas (** $p < 0.001$). Esto nos indicaría que las BMDC responden de diferente manera, dependiendo del tiempo de exposición al estímulo. BMDC tratadas con IL-10 mantienen los niveles de expresión de CD40 en comparación a BMDC sin tratamiento, indicando que IL-10 inhibe el proceso de maduración Para otros estímulos infamatorios como $\text{TNF}\alpha$ por 24 o 48 horas, no observamos diferencias significativas ($p > 0.05$) indicando que estos estímulos no son suficientes para inducir la sobre expresión de CD40.

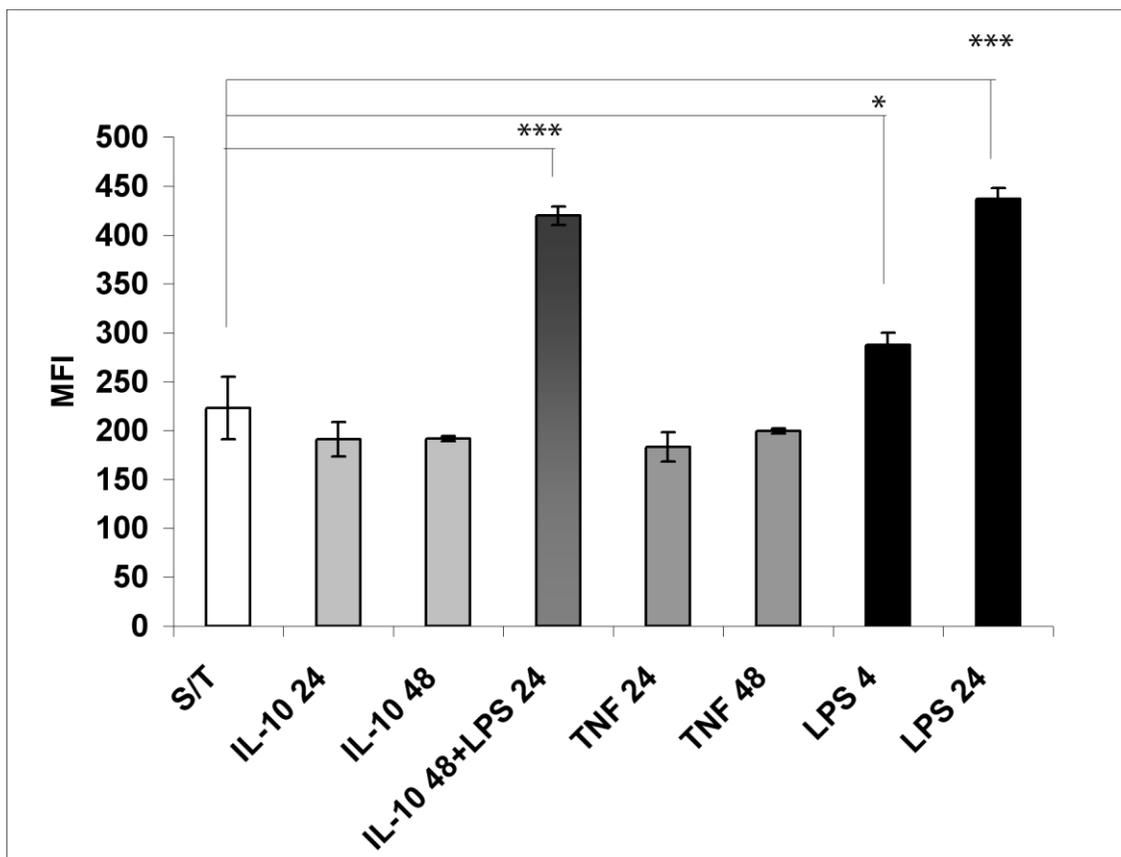


Figura 6: Expresión de CD40. BMDC fueron teñidas y fijadas al día 7 de cultivo para determinar la expresión de CD40 por citometría de flujo. Las BMDC fueron expuestas a diferentes estímulos, siendo estas diferencias significativas (** $p < 0.001$) para BMDC estimuladas con LPS por 24 horas con y sin pre tratamiento con IL-10 y BMDC tratadas con LPS por 4 horas ($p < 0.05$), comparadas con BMDC sin estimular. Para los otros estímulos no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$). Datos son representados como promedio de tres muestras con sus desviaciones estándar correspondientes.

La molécula co-estimuladora CD86 se expresa constitutivamente en bajos niveles en BMDC sin tratamiento y BMDC tratadas con IL-10 por 24 y 48 horas. Sin embargo, CD86 experimenta una regulación positiva bajo estímulos inflamatorios fuertes como LPS por 24 horas, ya sea con o sin pre tratamiento con IL-10. No obstante las diferencias observadas no fueron significativas para este estímulo ($p < 0.05$), lo mismo sucede para estímulos de maduración menos fuertes como TNF α 24 y 48 horas o LPS por 4 horas. Figura 7.

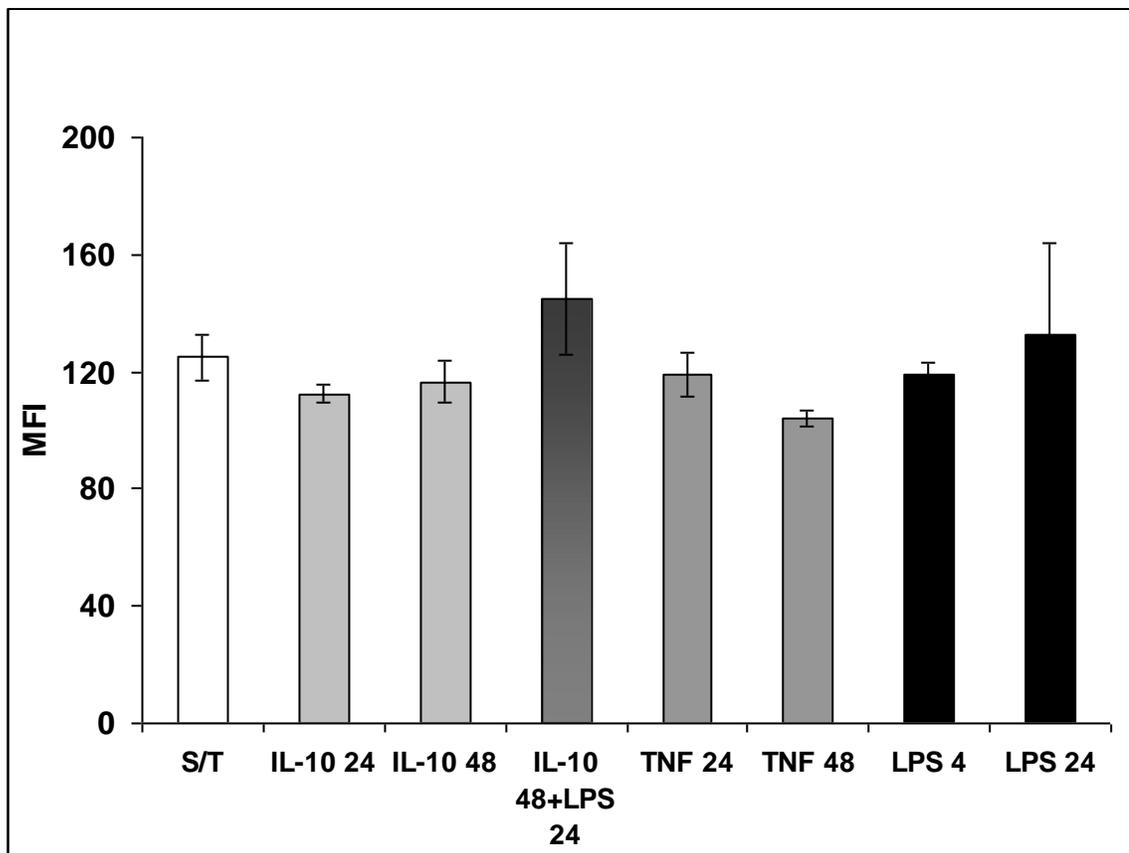


Figura 7: Expresión de CD86. BMDC fueron teñidas y fijadas al día 7 de cultivo para determinar la expresión de CD86 por citometría de flujo. Se grafica la MFI asociada a cada uno de los estímulos a los cuales fueron sometidas las BMDC, no se observan diferencias significativas ($p > 0.05$) en ninguno de los estímulos comparadas con células sin estímulo. Datos son representados como promedio de tres muestras con sus desviaciones estándar correspondientes.

En conjunto la expresión de las moléculas MHC I, CD40 y CD86 nos indica tres estados diferenciales de maduración fenotípica para las BMDC obtenidas, clasificándolas en BMDC inmaduras a las tratadas con IL-10 (iDC), BMDC semi-maduras, a las tratadas con TNF α o LPS por 4 horas (smDC) y BMDC totalmente maduras a aquellas tratadas con LPS por 24 horas (mDC), obtenido tres estados de maduración. Posteriormente se estudiaron otros marcadores específicos como CD54 (ICAM-1), CCR7 y CD45RB, los cuales nos dan información de propiedades funcionales de las DCs.

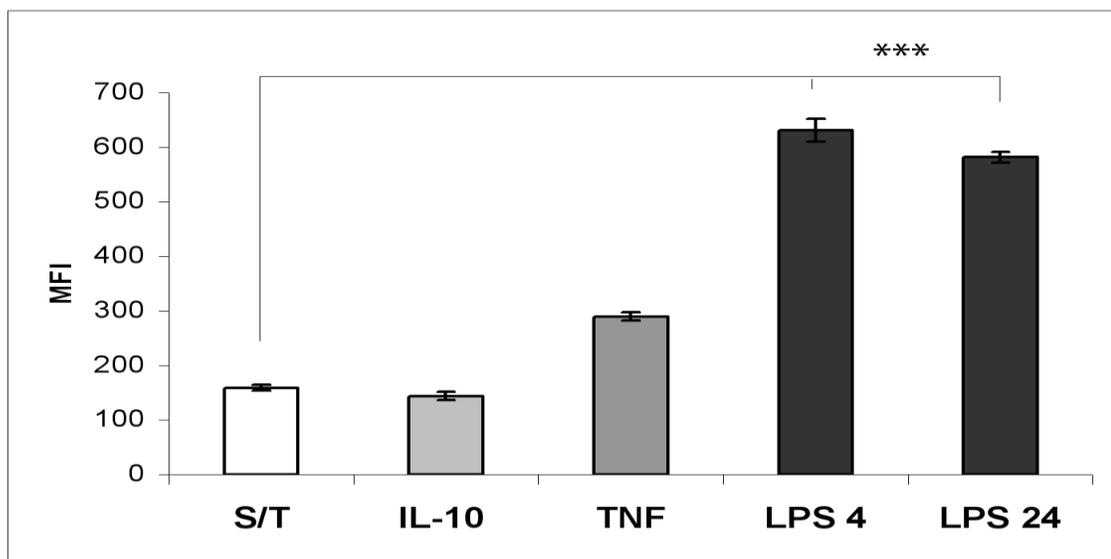


Figura 8: Expresión de CD54 (ICAM). BMDC fueron teñidas y fijadas al día 7 de cultivo para determinar la expresión de CD54 por citometría de flujo. El gráfico representa la MFI asociada a cada uno de los estímulos a los cuales fueron sometidas BMDC, observándose diferencias significativas para BMDC tratadas con LPS por 4 y 24 horas (***) comparadas con células sin tratamiento. Datos son representados como promedio de tres muestras con sus desviaciones estándar correspondientes.

En la Figura 8 se observan diferentes niveles de expresión de la molécula CD54 (ICAM-1) en las BMDC. Así células tratadas con IL-10 expresan niveles similares de esta molécula en comparación a células no tratadas, BMDC

tratadas con LPS por 4 y 24 horas, mostraron niveles significativamente mayores (** $p < 0.001$) de expresión de esta molécula comparadas con células sin tratamiento. En cambio para los otros estímulos, no se observaron diferencias significativas.

Posteriormente, se determinó la expresión de la molécula de superficie CCR7, la cual nos da información de la capacidad de migración de las BMDC. CCR7 se expresa constitutivamente en BMDC sin ningún estímulo, pero en muy bajos niveles, estos aumentaron bajo estímulos de maduración, pero estos no fueron incrementados significativamente ($p > 0.05$), solo se observaron diferencias significativas para BMDC tratadas con LPS por 4 horas, comparadas con BMDC tratadas con IL-10 (* $p < 0.05$). Esto sugiere que las BMDC tratadas con LPS por 4 horas poseen una mayor capacidad migratoria en comparación a las BMDC tratadas con los otros estímulos como lo indica la Figura 9.

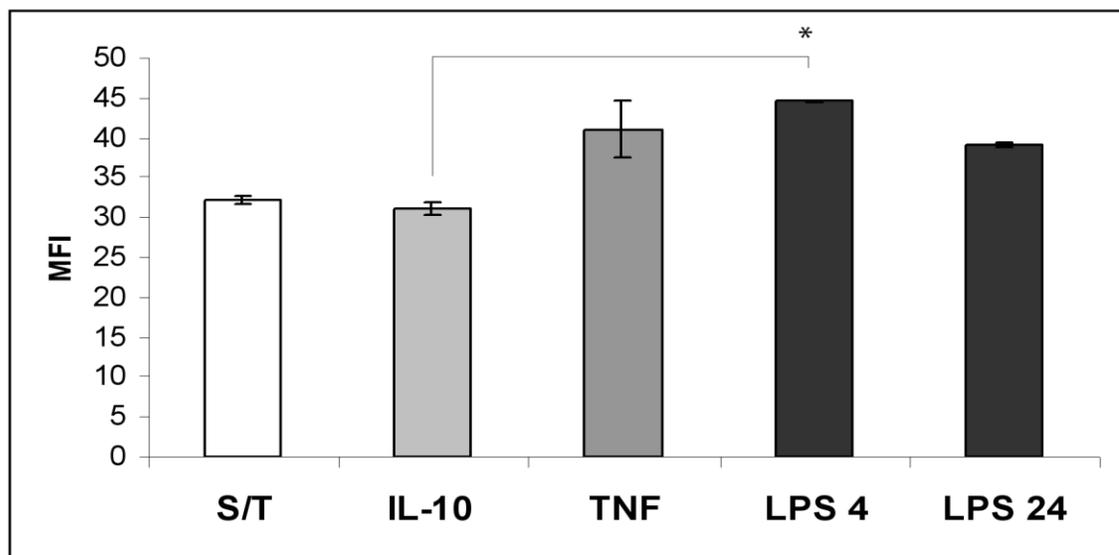


Figura 9: Expresión CCR7. BMDC fueron teñidas y fijadas al día 7 de cultivo para determinar la expresión de CCR7 por citometría de flujo. En el gráfico se representa la MFI asociada a cada uno de los estímulos. No se observan diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ninguno de los estímulos, comparados a BMDC S/T. Se observaron diferencias para BMDC tratadas con LPS 4 horas comparadas a BMDC tratadas con IL-10 (* $p < 0.05$). Datos son representados como promedio de tres muestras con sus desviaciones estándar correspondientes.

Por último, se determinó la expresión de la molécula CD45RB asociada como marcador de DCs tolerogénicas. En la Figura 10 se observa un aumento significativo en la expresión de CD45RB para BMDC tratadas con LPS por 24 horas (** $p < 0.001$) comparadas con células sin tratamiento. Las diferencias observadas para BMDC tratadas con LPS por 24 horas también son significativas cuando se les compara con BMDC tratadas con TNF α y LPS por 4 horas (** $p < 0.01$). Por lo tanto hay una expresión diferencial de CD45RB en células sometidas a diferentes estímulos de maduración.

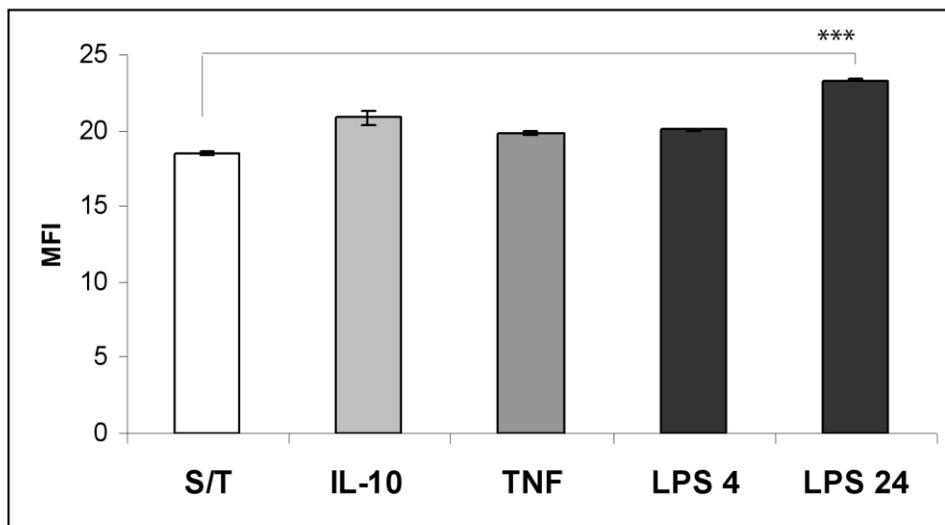


Figura 10: Expresión de CD45RB. BMDC fueron teñidas y fijadas al día 7 de cultivo para determinar la expresión de CD45RB por citometría de flujo. En el gráfico se representa la MFI asociada a BMDC tratada con diferentes estímulos. Se observaron diferencias significativas para BMDC tratadas con LPS por 24 horas (** $p < 0.001$) comparadas con células sin tratamiento. Datos son representados como promedio de tres muestras con sus desviaciones estándar correspondientes.

8.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ENDOCITOSIS DE ANTÍGENO

Para determinar las propiedades funcionales de las BMDC tratadas con los diferentes estímulos, se midió la capacidad de estas células para endocitar un antígeno sintético (Dextran-FITC) determinado por citometría de flujo. Para medir la endocitosis no específica del antígeno por las BMDC, estas fueron incubadas por 4 horas a 4°C con DX-FITC para posteriormente determinar su MFI asociada. BMDC fueron incubadas con DX-FITC por 4 horas a 37°C. Para determinar la MFI asociada a su capacidad endocítica, el valor obtenido como unión no específica fue restado a los valores obtenidos a 37°C. Como se observa en la figura 11, BMDC estimuladas con LPS por 24, tienen una menor capacidad de endocitar el antígeno comparadas con BMDC sin tratamiento, al igual que las BMDC tratadas con LPS por 4 horas y TNF α por 48 horas (**p<0.001), comparadas con BMDC sin tratamiento. Las BMDC tratadas con IL-10 por 24, 48 horas, y TNF α por 24 horas mostraron una elevada capacidad de endocitar el antígeno comparable a las de BMDC sin tratamiento. Por último, BMDC pre-tratadas con IL-10 y posteriormente desafiadas con LPS mantuvieron la capacidad de capturar el antígeno, sin observarse diferencias significativas (p> 0.05) con BMDC no tratadas, indicando un comportamiento funcional de BMDC en estado inmaduro de desarrollo.

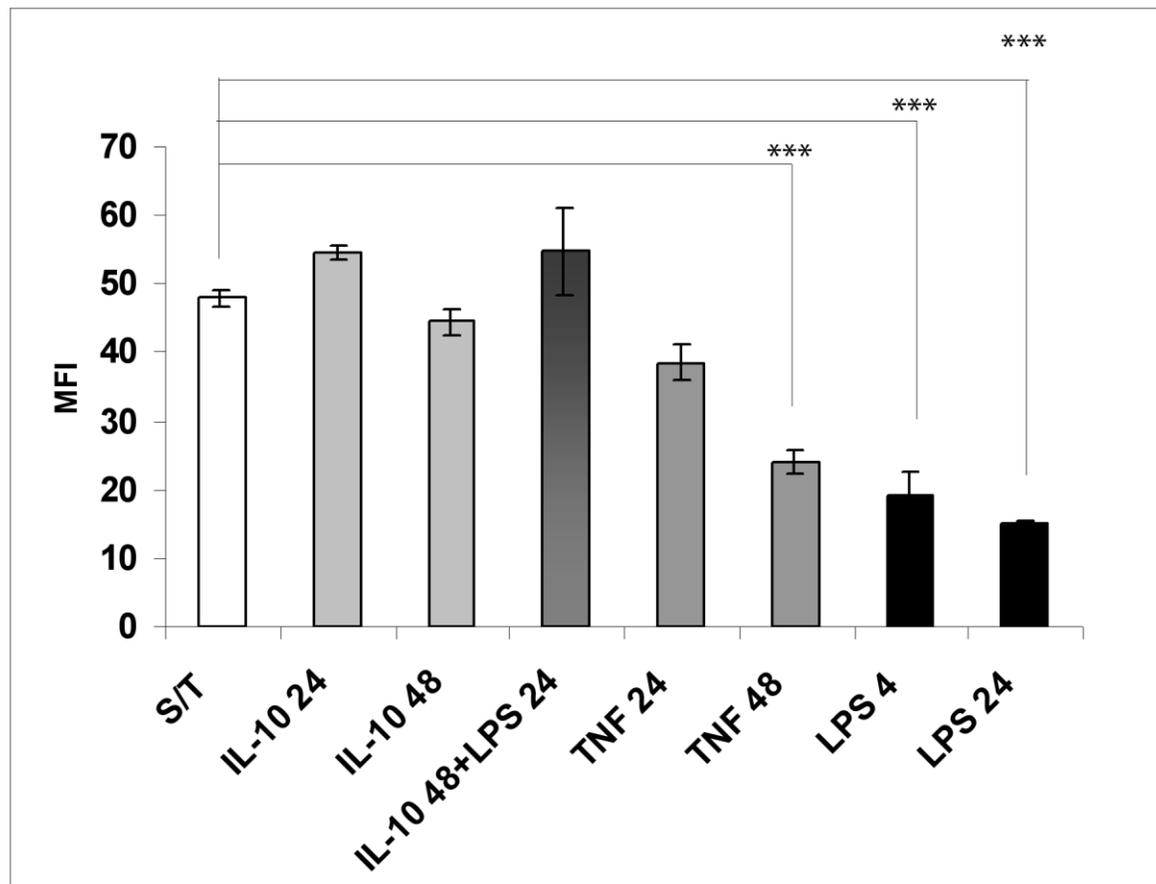


Figura 11: Capacidad endocítica. BMDC fueron incubadas con Dx-FITC por 4 horas a 37°C y fijadas para determinar la capacidad endocítica por citometría de flujo. Se observa una disminución de la endocitosis para BMDC estimuladas con TNF α 48 horas, LPS 4 y 24 horas (** $p < 0.001$), en cambio IL-10 y TNF α 24 horas no fueron capaces de alterar esta propiedad de las BMDC sin tratamiento ($p > 0.05$). Datos son representados como promedio de tres muestras con sus desviaciones estándar correspondientes.

8.6 DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS SECRETADAS POR BMDC

A partir de BMDC diferenciadas y cultivadas por 24 horas se recolectó el sobrenadante de cultivo, en el cual se midió la secreción de IL-12p70 como inductor de respuesta Th1 mediante ELISA. Como indica la Figura 12 se obtuvieron diferentes perfiles de secreción de esta citoquina, estando

aumentada significativamente su secreción en BMDC tratadas con LPS por 4 y 24 horas e IL-10 + LPS (** $p < 0.001$), comparadas a BMDC sin tratamiento. Las BMDC tratadas con IL-10 por 24 y 48 horas, y TNF α por 24 horas secretaron niveles similares a BMDC sin tratamiento ($p > 0.05$). Estos resultados indican que las BMDC tratadas con estímulos inflamatorios como LPS y TNF α por 48 horas, activan su cascada intracelular dando como respuesta la secreción de IL-12.

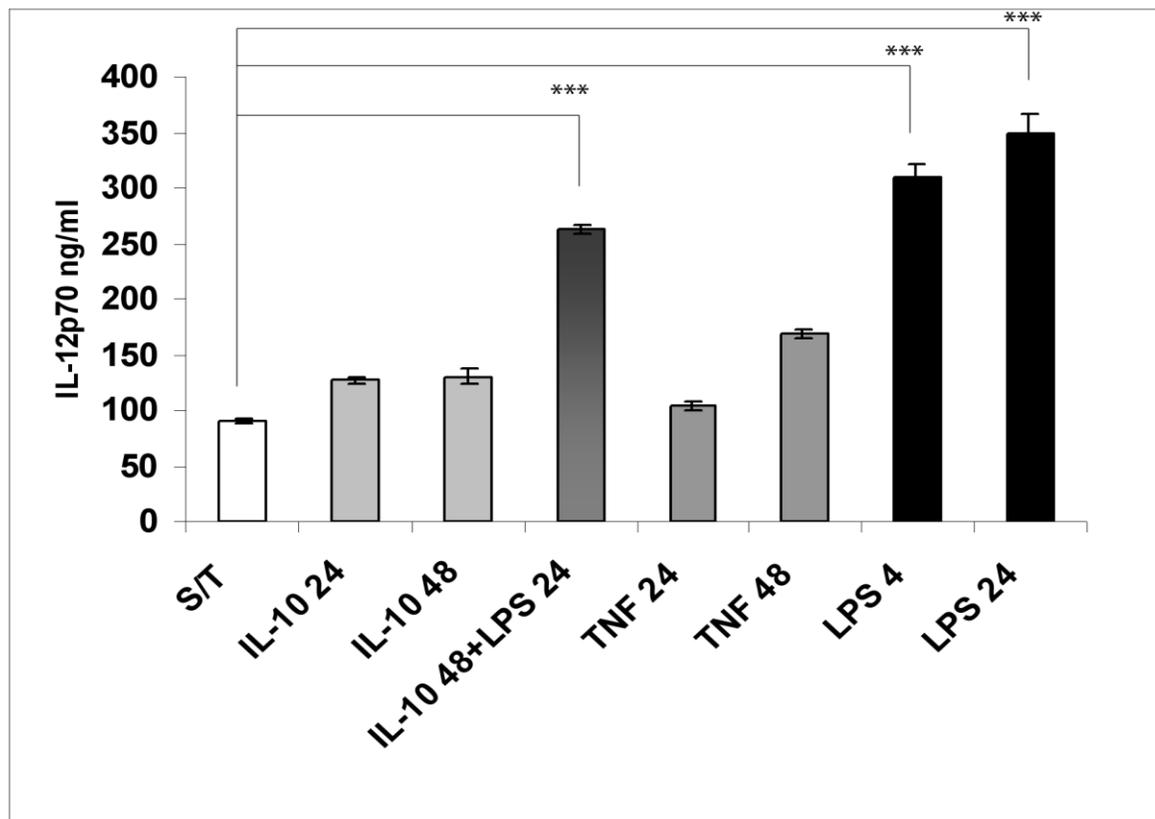


Figura 12: Secreción de IL-12p70 por BMDC tratadas con diferentes estímulos de maduración. BMDC tratadas con TNF α 48 horas, LPS por 4 y 24 horas secretan una mayor cantidad de esta citoquina en comparación a BMDC sin tratamiento (** $p < 0.001$). Los otros estímulos como IL-10 por 24 y 48 horas y TNF α por 24 horas secretan niveles similares ($p > 0.05$) a BMDC sin tratamiento. La cuantificación se realizó por ELISA de captura utilizando anticuerpos específicos tanto para la captura como para el revelado. Datos son representados como promedio de tres muestras con sus desviaciones estándar correspondientes.

Además se midió la secreción de IL-10, como inductor de respuesta Th2 mediante ELISA a partir de BMDC diferenciadas y cultivadas por 24 horas. En

la Figura 13 se observa niveles significativamente mayores ($***p < 0.001$) de secreción de esta citoquina, en BMDC tratadas con IL-10 por 48 horas. Las células tratadas con $TNF\alpha$ por 48 horas mostraron niveles aumentados de secreción de esta citoquina ($**p < 0.01$). En tanto BMDC tratadas con LPS por 4 horas mostraron una moderada secreción de IL-10 ($*p < 0.05$), comparadas con células sin tratamiento. Los estímulos con $TNF\alpha$ por 24 horas, IL-10 por 24 horas, BMDC pre tratadas con IL-10 seguido de estimulación con LPS y LPS por 24 horas fueron los estímulos que no secretaron niveles importantes de IL-10 ($p > 0.05$) comparadas con el control. Estos resultados indican que las BMDC que han sido inhibidas en su proceso de maduración y diferenciación, permanecen en ese estado, son productoras de IL-10, inductora de respuesta Th2, en cambio BMDC estimuladas y llevadas a un fenotipo maduro secretan en menor proporción esta citoquina. Cabe señalar que las BMDC sin tratamiento representaron un estado inmaduro, pero que es incapaz de secretar niveles importantes de IL-10, lo cual indica que por si solas no poseen capacidades inmuno reguladoras.

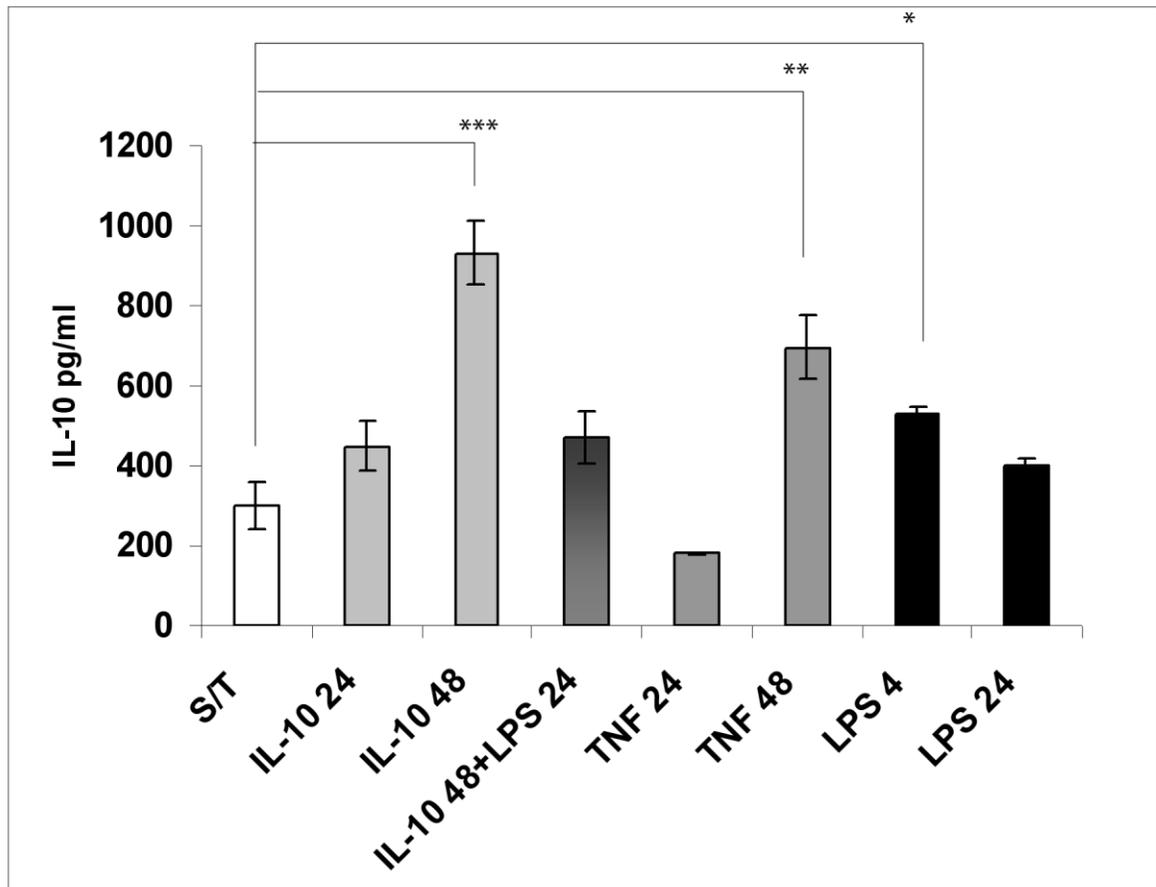


Figura 13: Secreción de IL-10 por BMDC tratadas con diferentes estímulos de maduración. Tanto las BMDC tratadas con IL-10 por 48 horas ($***p < 0.001$), tratadas con $TNF\alpha$ por 48 horas ($***p < 0.01$), y (tratadas con LPS por 4 horas ($*p < 0.05$), secretaron altos niveles de esta citoquina, en cambio no se observaron diferencias significativas con el resto de los estímulos comparadas con BMDC sin tratamiento. La cuantificación se realizó por ELISA de captura utilizando anticuerpos específicos tanto para la captura como para el revelado. Datos son representados como promedio de tres muestras con sus desviaciones estándar correspondientes.

8.7 ENSAYOS *IN VIVO* DE BMDC

Por último, se evaluó la capacidad de las BMDC tratadas con LPS por 4 horas, las cuales fenotípicamente indicaron estar en un estado semi-maduro, de inducir una respuesta tolerogénica *in vivo*. Para ello ratones con artritis activa fueron inoculados al día 35 desde el inicio del protocolo de inducción de la artritis inducida por colágeno tipo II (CIA) con BMDC cargadas con CII y estimuladas con LPS por 4 horas, en una única dosis. Como controles se utilizaron ratones CIA, sin ningún tratamiento, sólo inoculados con PBS estéril. Se midieron signos de inflamación dados por el Índice Artrítico (Vf-Vi) y Edema (0-16) en cada una de las extremidades en 3 grupos de animales. Como lo indica la Figura 14 los primeros signos de la enfermedad comienzan a evidenciarse a partir del día 30, dados por el edema (Figura 14 A.) y el Índice Artrítico (Figura 14 B.). El grupo de animales que fue sometido a tratamiento basado en el uso de BMDC estimuladas con LPS pero sin el antígeno aumentaron los signos de la enfermedad comparados con el grupo control CIA. El grupo de animales inoculados con BMDC estimuladas con LPS por 4 horas y cargadas con CII evidenciaron una significativa inhibición de los signos de la enfermedad, dados por la disminución en el índice artrítico y de edema. Estos resultados indican que hay una respuesta frente a la inoculación de las BMDC tolerizadas con LPS por 4 horas de forma antígeno-específica, dando como resultado una mejoría clínica comparada con el grupo de animales control CIA.

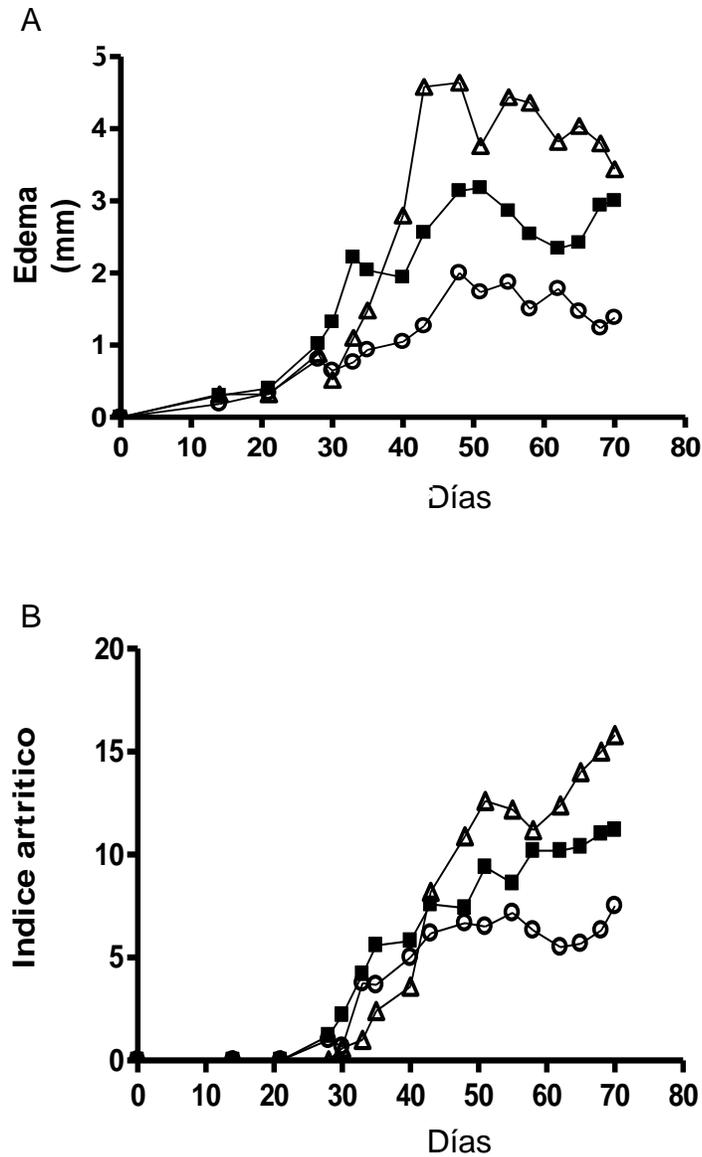


Figura 14: Evolución de la artritis murina Inducida por colágeno (CIA) en respuesta al tratamiento con BMDC estimuladas con LPS por 4 horas. En A se observa la gráfica del Edema de cada uno de los grupos de animales y en B el Índice Artrítico. El grupo de animales tratados con BMDC estimuladas con LPS por 4 horas y cargadas con CII (○) mostró una mejoría dada por la disminución del Edema y el Índice Artrítico en comparación al grupo control CIA (■) y el grupo tratados con BMDC estimuladas con LPS por 4 horas pero sin CII (Δ).

9 DISCUSIÓN

Las DCs han sido identificadas como las más potentes células presentadoras de antígeno (APC). En ausencia de estímulos inflamatorios las DCs poseen baja expresión de moléculas co-estimuladoras y son capaces de endocitar antígenos, siendo muy importantes en la mantención de la tolerancia periférica por varios mecanismos que incluyen activación de células T reguladoras (Treg), inducción de anergia de linfocitos T auto-reactivos, y polarización de la respuesta Th1/Th2 (Verginis y col, 2005). Bajo condiciones infamatorias se convierten en células totalmente activadas, capaces de iniciar la respuesta inmune presentando péptidos bajo un contexto de MHC y señales co-estimuladoras a los linfocitos T. Estas DCs son capaces de migrar a los órganos linfoides e iniciar la respuesta inmune, generando células T antígeno específicas. Dichas propiedades de las DCs han sido exploradas para ser utilizadas en inmunoterapia contra el cáncer (Mende y col, 2005 y Escobar y col, 2005). Sin embargo, se ha descrito recientemente un estado intermedio de maduración caracterizado por altos niveles de expresión de MHC y moléculas co-estimuladoras, pero en ausencia de producción de citoquinas pro-inflamatorias, estas DCs serían capaces de inducir tolerancia a través de la generación de células Treg secretoras de IL-10. Este estado semi-maduro es adquirido por exposición de las DCs inmaduras a $\text{TNF}\alpha$, vitamina D3, glucocorticoides, N-acetil-L-cisteína, entre otros (Bisikirska y col, 2005). Más recientemente, la administración temprana durante las primeras fases de desarrollo, del neuropéptido vasoactivo intestinal VIP, el cual es liberado bajo condiciones autoinmune/inflamatorias. VIP es capaz de inducir la generación de DCs reguladoras/tolerogénicas inductoras de una población CD4 regulador que demuestran restablecer la tolerancia *in vivo* en la progresión de enfermedades autoinmunes (Gozález-Rey y col, 2006).

La IL-10 es la citoquina anti-inflamatoria mas importante, las DCs tratadas *in vitro* con IL-10 inducen un fenotipo inmunoregulator que da como resultado la inhibición de linfocitos T CD4+ y CD8+ reactivos antígeno específicos (Corinti y col, 2001). La respuesta Th1 y Th2 puede ser inhibida a través de DCs tratadas con IL-10, paralelamente median la tolerancia de linfocitos T citotóxicos CD8+. La IL-10 inhibe eficientemente la maduración, induciendo la fosfoinositol-3 quinasa (PI3K), la transducción de señales y la inhibición del activador 3 dependiente de NF- κ B, el cual es clave en la regulación de varios aspectos en el desarrollo, función y maduración de las DCs, incluyendo la expresión de MHC, IL-12 y producción de TNF α . Este efecto inhibitorio de IL-10 sobre las DCs se detecta generalmente pasada 12 a 24 horas pre tratamiento (Wallet y col, 2005). Aunque se ha descrito un rol paradójico en la maduración de las DCs por IL-10, dando como resultado una estimulación de la expresión de moléculas co-estimuladoras, una reducción en la frecuencia de células MHC II^{brigh} y una falta de capacidad de capturar el Dextran-FITC por una población MHC II^{dim}, conduciendo a un fenotipo de DCs con características inmaduras y maduras (Commeren y col, 2003).

9.1 GENERACIÓN DE BMDC

En este trabajo se obtuvo DCs a partir de médula ósea (BMDC) de ratones DBA1/lacJ, en presencia de GM-CSF por 7 días de cultivo. En protocolos propuesto por Lutz y col, 1998, se obtenían BMDC luego de 11 días de cultivo, en este período se obtiene una población compuesta principalmente por BMDC 90-95%, tiempo en el cual estas células expresan constitutivamente altos niveles de MHC y moléculas co-estimuladoras. En cambio, en este trabajo al reducir el tiempo de cultivo se logra manejar con mayor éxito las BMDC ya que están menos expuestas a contaminación y estimulación mecánica a la cual deben ser sometidas, como también tenemos una menor pérdida por lavado en

el proceso de cambio de medio de cultivo, aumentando con esto el rendimiento. Sin embargo, se obtiene aproximadamente un 60% de BMDC que expresan el marcador de células dendríticas CD11c, por lo cual podemos suponer que no todas las células lo expresan o lo expresan en una baja proporción. Se ha descrito que las DCs expresan diferentes niveles de este marcador dependiendo de la cepa de ratón de la cual fueron generada, lo mismo sucede con el rendimiento obtenido (Petersen y col, 2000).

9.2 EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN DE BMDC

Las BMDC sin ningún estímulo mostraron una expresión constitutiva de MHC, dada por el porcentaje de células que expresaban esta molécula de casi de un 95% y la MFI asociada. La molécula CD40 fue expresada en forma basal por aproximadamente un 80% de las células, mientras que CD86 fue expresada sólo por un 30% (Datos no mostrados).

Las BMDC pre-tratadas con IL-10 por 48 horas generaron aproximadamente un 44% de BMDC, porcentaje levemente inferior a BMDC generadas bajo ningún estímulo adicional al GM-CSF, por lo tanto la presencia de IL-10 en la generación de BMDC no afecta el rendimiento. La expresión de MHC I se vio aumentada en la MFI asociada, aunque no en su porcentaje. La expresión de la molécula CD40 fue inhibida en cultivos de BMDC tratadas con IL-10 por 48 horas con una MFI asociada de 257 en comparación a BMDC sin tratamiento, con una MFI de 315, en tanto el porcentaje no se vio afectado mayormente indicando que hay una inhibición en la densidad de esta molécula presente en las BMDC y no en la cantidad de células que expresan CD40. La molécula co-estimuladora CD86 se vio expresada en una mayor proporción de BMDC comparada con BMDC sin estimular, aunque en la MFI asociada se vio una disminución en su expresión sin ser significativas estas diferencias, lo que

indica una regulación negativa de esta dada por una mayor cantidad de células que la expresan pero en una menor proporción.

Las BMDC tratadas con IL10 por 24 horas mostraron un comportamiento muy similar a las tratadas con IL-10 por 48 horas, por lo tanto la inhibición de la maduración puede ser controlada hasta el día 6 de cultivo, con lo cual no interferimos en el rendimiento de las BMDC generadas.

Con el fin de evaluar si las BMDC tratadas con IL-10 permanecían refractarias frente a un estímulo de maduración, estas células fueron desafiadas con LPS de *E. coli* por 24 horas. La expresión de MHC I y las moléculas CD40 y CD86 se vio afectada, aumentando significativamente la MFI asociada para ambos casos. Sin embargo, el porcentaje de células que expresaron el marcador de superficie CD86, no varió significativamente, por lo tanto hay una sobre expresión de estas moléculas frente al estímulo de LPS que no se ve inhibido por pre tratamiento con IL-10. LPS interactúa con la DCs a través del receptor de superficie Toll-like receptor-4 (TLR-4), conduciendo a una activación de señales intracelulares reguladas por quinasas (ERK), c-Jun N-terminal quinasa, MAP quinasas y NF- κ B, con un aumento en la producción de IL-12 (Xie y col., 2003). En cambio IL-10, ejerce su acción a través del receptor de membrana heterodimérico formado por la unión de cadenas (IL-10R1) y la cadena transductora (IL-10R2), esta interacción activa una serie de moléculas de señalización que incluyen proteínas STAT, en estado inmaduro las DCs muestran altos niveles de STAT-3 y bajos niveles de STAT-1, mientras que DCs maduras disponen de altos niveles basales de STAT-3. Mientras STAT-1 se encuentra mínimamente incrementado. En tanto, las DCs inmaduras expresan niveles similares de IL-10R1 e IL-10R2, mientras que las DCs maduras regulan positiva y selectivamente IL-10R1 (Corinti y col, 2001). Por lo tanto, la actividad del LPS e IL-10 irían por vías distintas de transducción de señales, dependiendo del estado de maduración de las DCs.

Las BMDC tratadas con $TNF\alpha$ por 24 y 48 horas mostraron niveles similares de MHC I y moléculas CD40 y CD86, aunque MHC se encontró expresado en mayor proporción dado por una mayor MFI asociada en comparación a BMDC sin ningún tratamiento, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas.

Las BMDC estimuladas con LPS por 4 horas mostraron una mayor expresión de MHC I en comparación a BMDC sin tratamiento, siendo estas diferencias significativas $p < .05$. Los niveles fueron similares a los de BMDC tratadas con $TNF\alpha$ por 24 y 48 horas. Para la molécula CD40 las diferencias fueron mayores en comparación a BMDC sin tratamiento y BMDC estimuladas con $TNF\alpha$, obteniéndose un estado intermedio de maduración. Sin embargo, para CD86 no se observaron diferencias significativas.

Se utilizó LPS por 24 horas como un estímulo fuerte de maduración, obteniéndose una regulación significativamente mayor para MHC I y CD40 en comparación a BMDC sin estimular y BMDC estimuladas con LPS por 4 horas. CD86 no mostró diferencias significativas para BMDC sin tratamiento o BMDC estimuladas con LPS por 4 horas, observándose sólo una tendencia a la sobre expresión en ambos casos.

Adicionalmente se evaluó la expresión de otras moléculas de superficie como CD54 (ICAM), CCR7 y CD45RB, las que están asociadas a propiedades funcionales tales como migración celular y características tolerogénicas. Sólo CD54 fue expresada en una proporción mayor por BMDC estimuladas con LPS por 4 y 24 horas, siendo estas diferencias significativas. La molécula asociada a la migración celular CCR7 fue expresada en mayor proporción en BMDC tratadas con LPS por 4 y 24 horas, aunque no significativamente. Por último, la molécula de superficie CD45RB, asociada a DCs tolerogénicas, se vio expresada en mayor proporción sólo en BMDC tratadas con LPS por 24 horas. Aunque no se observaron diferencias significativas entre BMDC estimuladas con LPS por 4 y 24 horas, en la expresión de las moléculas CD54, CCR7 y CD45RB, podemos sugerir que las BMDC estimuladas por 4 horas con LPS

poseen propiedades de DCs inmaduras dada por la expresión de MHC I y las moléculas CD40 y CD86, y propiedades de DCs maduras por la expresión de molécula asociadas a su función.

9.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ENDOCÍTICA DE ANTIGÉNO POR BMDC

La propiedad de las BMDC para endocitar en antígeno fue determinada por la capacidad de endocitar un péptido sintético Dextran-FITC. Las DCs internalizan el antígeno por la vía endocítica, esto ocurre antes de procesarlo y presentarlo a los linfocitos T, asociado a MHC: Los endosomas son estructuras levemente ácidas que contienen proteínas lisosomales, que incluyen proteínas de membrana asociadas a lisosoma (LAMP)-1 y LAMP-2. La naturaleza ácida del endosoma, la abundancia de proteasas e hidrolasas proporcionan un pH óptimo para degradar antígenos extracelulares (Quah y col, 2005). Este proceso ocurre en DCs en estado inmaduro de diferenciación, las que actúan como centinelas en la periferia, censando el ambiente. Frente a señales de peligro, estas DC capturan el antígeno, lo procesan y presentan a linfocitos T, en el contexto de MHC, acompañado por moléculas co-estimuladoras, las cuales amplifican la señal. Este proceso de maduración de las DCs está asociado con una disminución en la capacidad de capturar el antígeno y un aumento en su capacidad presentadora.

En este trabajo determinamos la capacidad de endocitar el antígeno asociado a la maduración de las BMDC generadas, expuestas a diferentes estímulos. Las BMDC sin ningún estímulo de diferenciación y por lo tanto en estado inmaduro de desarrollo mostraron una alta capacidad endocítica en comparación a BMDC expuestas a estímulos fuertes de maduración como $TNF\alpha$ por 48 horas y LPS. Estas células perdieron la capacidad de endocitar el antígeno dada por una baja de la MFI. Sorprendentemente, las BMDC estimuladas por 4 horas, mostraron

un fenotipo semi-maduro en relación a células sin tratamiento o a células estimuladas con LPS por 24 horas. Además, estas células mostraron una mayor capacidad de endocitar un antígeno luego de exposición a tiempos cortos con LPS, esta propiedad está relacionada con DCs en estado inmaduro de desarrollo el cual se pierde a medida que la célula madura. Al igual que su capacidad endocítica aumenta, lo mismo sucede con su capacidad de presentación antigénica, promoviendo un remodelamiento de filamentos de actina dispuestos en estructuras llamadas podosomas, los cuales se desensamblan luego de la activación de las DCs vía TLR implicados en la migración celular. En estas condiciones de regulación positiva de la endocitosis y la presentación antigénica, bajo condiciones de inflamación, favorecen la presentación de péptidos derivados de patógenos (West y col, 2004). Otros estudios han demostrado que cultivos cortos de DCs derivadas de una línea celular de leucemia y estimuladas con LPS poseen una capacidad alterada de iniciar la respuesta inmune y una incapacidad de estimular células NK, aunque poseen elevados niveles de moléculas co-estimuladoras, no poseen diferencias en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Kim y col, 2006).

9.4 DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS SECRETADAS POR BMDC

La producción de citoquinas como IL-12p70, durante el proceso de maduración de las DCs promueve la inducción a una respuesta Th1. En cambio, IL-10 ha sido identificada como la citoquina más importante que puede prevenir la diferenciación de DCs desde monocitos y la maduración de DCs por bloqueo de la liberación de IL-12. La IL-10 también inhibe la expresión de moléculas co-estimuladoras, por lo tanto inhibe la respuesta mediada por linfocitos Th1. Esta producción autocrina de IL-10 puede prevenir la maduración de las DCs, dando como resultado la anergia de células T activadas (Mandrekar y col, 2004). En este trabajo se determinó IL-12p70 secretada por BMDC diferenciadas con

varios estímulos, encontrándose altos niveles de ésta en BMDC tratadas con TNF α por 48 horas y LPS por 4 y 24 horas, aunque se obtuvieron diferencias en los niveles secretados por BMDC tratadas con LPS por 4 y 24 horas, éstas no fueron significativas. Se encontraron altos niveles de IL-10 en BMDC pre-tratadas con IL-10, por 24 y 48 horas. Luego de estimulación con LPS, las DCs pre-tratadas con IL-10 regulan positivamente la expresión de moléculas co-estimuladoras y secretan citoquinas pro-inflamatorias como IL-12p70, las cuales inician una respuesta Th1. En cambio BMDC tratadas con TNF α y LPS no se encontraron diferencias en su secreción. Sin embargo, las BMDC tratadas con LPS por 4 horas secretaron altos niveles de IL-10. Esta citoquina es secretada por DCs en estado inmaduro de desarrollo o en DCs con propiedades tolerogénicas. Esta característica de DCs estimuladas con LPS por 4 horas secretoras de IL-10, alta capacidad endocítica y bajos niveles de moléculas co-estimuladoras nos entrega una nueva herramienta para generar DCs tolerogénicas capaces de generar una respuesta *in vivo*.

9.5 ENSAYOS *IN VIVO* DE LAS BMDC ESTIMULADAS CON LPS POR 4 HORAS

Las BMDC tratadas con LPS por 4 horas mostraron moderados niveles de moléculas co-estimuladoras, alta capacidad de endocitar el antígeno, menor secreción de IL-12p70 que las BMDC tratadas con LPS por 24 horas, alta secreción de IL-10 y niveles cuantificables de IFN γ e IL-2. Estas características nos llevaron a plantear que las BMDC tratadas con tiempos cortos de LPS conducen a un fenotipo semi-maduro, capaz de generar una respuesta tolerogénica en un modelo de autoinmunidad.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria que afecta las articulaciones periféricas, proceso iniciado por una disfunción en la tolerancia periférica. La AR se caracteriza por una hiperplasia de la membrana sinovial

con la consiguiente destrucción del cartílago y hueso articular. El colágeno tipo II (CII) es el mayor componente del cartílago articular y varios estudios han demostrado la respuesta mediada por células T y/o B contra el CII en pacientes con AR, sugiriendo ser uno de los auto-antígenos asociado con el desarrollo de la patogénesis de la AR (Dzhambazob y col, 2005).

En nuestro laboratorio se ha establecido con éxito el modelo experimental de artritis murina inducida por colágeno bovino tipo II (CIA), modelo de autoinmunidad utilizado para evaluar posibles terapias basadas en el uso de DCs. En estudios previos de tolerancia oral con CII, se evaluó los efectos de la administración de CII, de modo de generar tolerancia. Se encontró que DCs provenientes de placas de Peyer cambiaron el fenotipo luego de la administración oral del CII, siendo productoras de IL-10 y por lo tanto responsables de la tolerancia adquirida a través de inducción de células T regulatorias CD4+CD25+ (Min Youn-So, 2006). Sin embargo, recientemente han aparecido otros estudios de tolerancia en el modelo CIA, basado en el uso de DCs, en cual DCs tratadas con TNF α mostraron un fenotipo semi-maduro, fueron inoculadas previa inducción de la CIA obteniendo una disminución en la incidencia y progresión de la enfermedad (Duivenvoorde y col, 2004).

En nuestro laboratorio se evaluó BMDC moduladas con LPS por 4 horas con características de DCs semi-maduras o tolerogénicas. La inoculación de estas cargadas con CII logró disminuir los signos clínicos de la enfermedad como el índice artrítico y el edema utilizado como indicadores de inflamación en los animales evaluados, comparados con animales controles CIA. De este modo, se puede concluir que la respuesta es antígeno-específica, ya que ratones con artritis activa inoculados con BMDC tratadas con LPS por 4 horas pero no cargadas con CII, no produjeron la misma respuesta, al contrario, la respuesta se vio incrementada en el grupo de animales con este tratamiento.

Con las herramientas utilizadas en este trabajo no logramos determinar el mecanismo involucrado en esta respuesta, sólo se evaluó la secreción de IL-10

por esta BMDC las cuales mostraron una importante secreción de ésta. Lo anterior sugiere la existencia de una respuesta mediada por células reguladoras Tr1, productoras de IL-10. No se puede descartar la participación de células Th3 dado que no se determinó la secreción de TGF- β (Gad y col, 2004). Tampoco podemos descartar la participación de una respuesta mediada por células naturalmente tolerogénicas, dado que no se evaluó la expansión de poblaciones celulares CD4+CD25+Foxp3+ en los animales post tratamiento que mostraron una respuesta de tolerancia al CII. Por lo tanto, con la información disponible la anergia parece ser el mecanismo responsable de la disminución de los signos clínicos de ratones sujetos a la inmunoterapia basada en el uso de BMDC tolerizadas con LPS por 4 horas.

10 CONCLUSIONES

10.1 Las células dendríticas derivadas de médula ósea expresan niveles MHC, CD86 y CD40 dependiendo del estímulo y tiempo de exposición.

10.2 Las células dendríticas derivadas de médula ósea sin tratamiento y en presencia de IL-10 mostraron características fenotípicas y funcionales de DC inmaduras.

10.3 Las células dendríticas derivadas de médula ósea estimuladas con $TNF\alpha$ mostraron características de DCs semi-maduras, evidenciado por niveles intermedios de moléculas co-estimuladoras, moderados niveles de secreción de IL-12p70 y una capacidad endocítica disminuida en comparación a células dendríticas derivadas de médula ósea tratadas con LPS por 24 horas.

10.4 Las células dendríticas derivadas de médula ósea estimuladas con LPS por 24 horas mostraron un fenotipo de células dendríticas maduras, dado por una alta expresión de moléculas co-estimuladoras, alta secreción de IL-12p70, baja secreción de IL-10 y una disminuida capacidad endocítica.

10.5 Las células dendríticas derivadas de médula ósea estimuladas con LPS por 4 horas mostraron un fenotipo semi-maduro dado por la expresión de moléculas co-estimuladoras, alta capacidad fagocítica, y alta secreción de IL-10.

10.6 Las células dendríticas derivadas de médula ósea estimuladas con LPS por 4 horas poseen características tolerogénicas evaluadas en el modelo

murino de artritis (CIA), siendo capaces de disminuir los signos clínicos de inflamación con una sola inoculación de células dendríticas derivadas de médula ósea una vez que la CIA se encontrara establecida, dados por el edema e índice artrítico.

10.7 Dado que las células dendríticas derivadas de médula ósea cargadas con colágeno tipo II, a diferencia que las no cargadas inhibieron la CIA, es altamente sugerente que es una respuesta antígeno-específica al CII.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Ardavin C, Amigorena S, Reis e Sousa C. Dendritic Cells: immunobiology and immunotherapy. *Immunity*. 2004;20(1):17-23.
- Asselin-Paturel Carine, Brizard Geraldine, Pin Jean-Jacques, Briere Francine, and Trinchieri Giorgio. Mouse Strain Differences in Plasmacytoid Dendritic Cell Frequency and Revealed by a Novel Monoclonal Antibody. *The Journal Immunology*.2003;171:6466-6477.
- Banchereau Jacques, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review Immunology*. 2000;18:767-811.
- Banchereau Jacques, Pascual Virginia, and Palucka Karolina. Autoimmunity through Cytoquine-Induced Dendritic Cell Activation. *Immunity*.2004;20:539-550.
- Blanch-Olszewska Zofía. Innata immunity: cells, receptors, and signaling pathways. *Arch Immunol Ther Exp*.2005;53:245-253.
- Chorni Alejo, González-Rey Elena, Fernández-Martin Amelia, Ganea Doina, and Delgado Mario. Vasoactive Intestinal Peptide Induce Regulatory Dendritic Cells that Prevent Acute Graft-Versus-Host Disease While Maintaining the Graft-Versus-Tumor Response. *Blood*. January 2006.
- Christen Urs and Herrath Matthias G. Initiation of autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*.2004;16:759-767.
- Commeren Dianne L., Van Soest Peter L., Karimi Khalil, Löwenberg Bob, Cornelissen Jan J., and Brakman Eric. Paradoxical effects of interleukin-10 on the maturation of murine myeloid dendritic cells. *Immunology*.2003;110:188-196.
- Corinti S., Albenesi C., la Sala A., Pastore S., and Girolomoni G. Regulatory Activity of Autocrine IL-10 on Dendritic Cell Function. *The Journal of Immunology*. 2002;166:4312-4318.
- Diao Jun, Winter Erin, Chen Wenhao, Cantin Claude, and Cattral Mark S. Characterization of Distinct Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cell-Committed Precursors in Murine Bone. *The Journal of Immunology*.2004;173:1826-1833.
- Duivenvoorde Leoni M., Louis-Plence Pascale, Apparailly Florence, van der Voort Ellen I.H., Huizinga Tom W.J., Jorgensen Christian, and Toes René E.M. Antigen-Specific Immunomodulation of Collagen-Induced Arthritis With Tumor Necrosis Factor-Stimulated Dendritic Cells. *Arthritis & Rheumatism*. 2004;50(10):3354-3364.
- Dzhambazov Balik, Holmdahl Meirav, Yamada Hisakata, Lu Shemin, Vestberg Mikael, Holm Bjorn, Johnell Olof, Kihlberg Jan, and Holmdahl Rikard. The major T cell epitope on type II collagen is glycosylated in normal cartilage but modified by arthritis in both rats and humans. *European Journal Immunology*.2005;35:357-366.

- Elliot Michael J., Ravinder N. Maini, Marc Feldmann, Alice Long-Fox, Peter Charles, Peter Katsikis, Fionula M. Brennan, Jean Walker, Hanny Bijl, John Ghrayeb, and James N. Woody. Treatment of Rheumatoid Arthritis With Chimeric Monoclonal Antibodies To Tumor Necrosis Factor α . *Arthritis & Rheumatism*. 1993;36(12):1681-1690.
- Escobar A, Lopez M, Serrano A, Ramírez M, Pérez C, Aguirre A, González R, Alfaro J, Larrondo M, Fodor M, Ferrada C, Salazar-Onfray F. Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. *Clinical Experimental Medicine*. 2005; 142(3):555-568.
- Foti Maria, Granucci Francesca, and Ricciardi-Catagnoli Paola. A central role for tissue-resident dendritic cells in innate responses. *TRENDS in Immunology*. 2004;25(12):650-654.
- Frances Santiago-Schwarz. Dendritic cells: friend or foe in autoimmunity?. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2004;30:115-134.
- Friedl Peter, den Boer Annemieke, and Gunzer Matthias. Tuning immature responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nature Immunology*. 2005;5:532-545.
- Gad Monika, Kristensen Nanna N., Kury Evelyn, and Claesson Mogens H. Characterization of T-regulatory cells, induced by immature dendritic cells, which inhibit enteroantigen-reactive colitis-inducing T-cell responses *in vitro* and *in vivo*. *Immunology*. 2004; 113:499-508.
- González-Rey Elena, Chorni Alejo, Fernández-Martin Amelia, Ganea Doina, and Delgado Mario. Vasoactive Intestinal Peptide Generated Human Tolerogenic dendritic Cells That Induce CD4 and CD8 Regulatory T Cells. *Blood*. 2006.
- Grohmann Ursula, Bianchi Roberta, Orabona Ciriana, Fallarino Francesca, Vacca Carmine, Micheletti Alessandra, Fior etti Maria C., and Puccetti paolo. Functional Plasticity of dendritic Cell Subsets as Mediated by CD40 Versus B7 Activation. *The Journal of Immunology*. 2003;171:2581-2587.
- Groux Hervé, Fournier Natalia and Cottrez Françoise. Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells. *Seminars in Immunology* 2004;16:99-106.
- Huppa Johannes B., and Davis Mark M. T-Cell-Antigen Recognition And Immunological Synapse. *Nature Immunology*. 2003;3:973-983.
- Klen Shortman And Yong-Jun Liu. Mouse and Human Dendritic Cells Subtypes. *Nature Review Immunology*. 2002;2:153-161.
- Kojo Satoshi, Seino Ken-ichiro, Harada Michishige, Watarai Hiroshi, Wakao Hiroshi, Uchida Tetsuro, Nakayama Toshinori, and Tainiguchi Maseru. Induction of Regulatory Properties in Dendritic Cells by V α 14 NKT Cells. *The Journal of Immunology*. 2005;175:3648-3655.
- Kubo Takekazu, Hatton Robin D., Oliver James, Liu Xiaofen, Elson Charles O., and Weaver Casey T. regulatory T Cell Suppression and Andergy Are

- ifferentially Regulated by Proinflammatory Cytokines Produced by TLR-Activated Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*.2004;173:7249-7258.
- Lutz Manfred, Kukutsch Nicole, Ogilvie Alexandra, Röβner, Koch Franz, Romani Nikolaus, and Schuler Gerold. An advanced method for generation large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods*.1999;223:77-92.
- Mandrekar Pranoti, Catalano Donna, Dolganiuc Angela, Kodys Karen, and Szabo Gyongyi. Inhibition of Myeloid Dendritic Cell Accesory Cell Function and Induction of T Cell Anergy by Alcohol Correlates with Decreased IL-12 Production. *The Journal of Immunology*.2004;173:3398-3407.
- Marc Feldman and Ravinder N. Maini. Anti-TNF α Therapy Of Rehumatoid Arthritis: What Have We Learned?. *Annual Review. Immunology*. 2001;19:163-196.
- Marrk A. Wallet, Pradip Sen, and Roland Tish. Immunoregulation of Dendritic Cells. *Clinical Medicine & Research*.2005;3(3):166-175.
- Medzhitov Rusian and Biron Christine A. Innate immunity. *Current Opinion in Immunology*.2003;15:2-4.
- Menges Mauritius, Baumeister Thomas, Rossner Susanne, Stoitzner Patrizia, Romani Nikolaus, Gressner André, and Lutz Manfred. IL-4 supports the generation of a dendritic cell subset from murine bone marrow with altered endocytosis capacity. *Journal of Leukocyte Biology*;77:4;535-543.
- Min So-Youn, Park Kyung-Su, Cho Mi-La, Kang Jung-Won, Cho Young-Gyu, Hwang Sue-Yun, Park Min-Jung, Yoon Chong-Hyeon, Min Jun-Ki, Lee Sang-Heon, Park Sung-Hwan, and Kim Ho-Youn. Antigen-induced, Tolerogenic CD11c+, CD11b+ Dendritic Cells Are Abundant in Peyer's Patches During the Induction of Oral Tolerance to Type III Collagen and Supress Experimental Collagen-Induced Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*.2006;54;3:887-898.
- Mohamadzadeh M, Lufting R. Dendritic cells: In the forefront of immunopathogenesis and development- A review. *Journal Immune Based Therapy Vaccines*. 2004;13(2):1.
- Muthana Munitta, Fairburn Barbara, Mirza Shabana, Slack Laura, and Pockley Graham. *Journal of Immunological Methods*. 2004; 294:165-179.
- Münz Christian, Steinman Ralph M., and Fujii Shin-ichiro. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes:coordinated stimulation of innate and adaptative immunity. *Journal Experimental Medicine*.2005;202 2):203-207.
- Nolan Kathleen, Strong Victoria, Soler Dulce, Fairchild Paul, Cobbold Stephen, Croxton Ruth, Gonzalo Jose-Angel, Rubio Ana, Wells Meghn, and Waldmann herman. IL-10 Conditioned Dendritic Cells, Decomissioned

- for Recruitment of adaptative Immunity, Elicit Innate Inflammatory genes Products in Response to Danger Signal. *The Journal of Immunology*. 2004;172: 2201-2209.
- Peter Dubsy, Hideki Ueno, Bernard Piqueras, John Connolly, Jacques Banchereau, and A. Karolina Palucka. Human Dendritic cells Subset for vaccination. *Journal of Clinical Immunology*. 2005;25(6)551-572.
- Petersen M.S., Toldbod H.E., Holtz S., Hokland M., Bolund L., and Agger R. Strain-Specific Variation in the Development of Dendritic Cell in Murine Bone-Marrow Cultures. *Scandinavian Journal. Immunology*. 2000;51:586-594.
- Quah Ben J.C., and O'Neill Helen C. Maturation of function in dendritic cells for tolerance and immunity. *Journal Cellular Molecular.Medicine*.2005;9(3):643-654.
- Rößner Susanne, Voigtländer Constanze, Wiethe Carsten, Hänig Jens, Seifarth Christian, and Lutz Manfred B. Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. *European Journal. of Immunology*.2005;35:3533-3544.
- Roncarolo Maria-Grazia, Battagila Manuela, and Gregori Silvia. The role of interleukin 10 in the control of autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*.2003;20:269-272.
- Ritter Uwe, Wiede Florian, Mielenz Dirk, Kiafard Ziba, Zwirner Jörg, and Körner Heinrich. Analysis of the CCR7 expression on murine bone marrow-derived spleen dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*.2004;76:472-476.
- Rutella Sergio, and Lemoli Roberto. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basis biology to clinical applications. *Immunology Letters*. 2004; 94:11-26.
- Sharpe Arlene H., and Freeman Gordon J. The B7-2-CD28 Superfamily. *Nature Immunology*. 2002;2:116-126.
- Shin-ichiro Fujii, Liu Kang, Smith Caroline, Bonito Anthony, and Steinman Ralph. The Linkage to Adaptative Dendritic Cell In Vivo Requires CD40 Ligation In Addition To Antigen Presentation and CD80/86 Coestimulation. *Journal Experimental Medicine*.2004;2-12.
- Shortman and Liu Yong-jun. Mouse and human dendritic cells subtype. *Nature Review Immunology*.2002;2:151-161.
- Steinman Ralph M., Daniel Hawiger, And Michel C. Nussenzweig. Tolerogenic Dendritic Cells. *Annual Review Immunology*. 2003;21:685-711.
- Steinman Ralph, Hawinger Daniel, and Nussenzweig. Tolerogenic Dendritic Cells. *Annual Review .Immunology*. 2003;21:685-711.
- Van Gisbergen Klaas, Paessens Lutz, Geijtenbeek Teunis, van Kooyk Yvette. Molecular mechanism that set the stage for DC-T cell engagement. *Immunology Letters*.2005;97:199-208.

- Van Krinks C .H, M. K. Matyszak, And J. S. Hill Gaston. Characterization of Plasmocytoid Dendritic Cells in Inflammatory Arthritis Synovial Fluid. *Rheumatology*. 2004; 43: 453-460.
- Verginis Panayotis, Li Haiyan S., and Carayanniotis George. Tolerogenic Semimature Dendritic Cells Supress Experimental Autoimmune Thyroiditis by activation of Thyroglobulin-Specific CD4+CD25+ T Cells. *The Journal of Immunology*.2005;174:7433-7439.
- Wallet Mark, Sen Pradip and Tisch Roland. Immunoregutation of Dendritic Cells.*Clinical Medicine & Research*.2005;3:166-165.
- Warncke Max, Dodero Anna, Dierbach Haide, Follo Marie, and Veelken Hendrik. Murine dendritic cells generated under serum-free conditions have a mature phenotype and efficiently induce primary immune responses. *Journal of Immunological Methods*. 2006;310:1-10.
- West Michael A., Wallin Robert P.A., Matthews Stephen P., Svensson Henrik G., Zaru Rossana, Ljunggren Hans-Gustaf, Prescott Alan R., and Watts Colin. Enhanced Dendritic Cells Antigen Capture via Toll-Like Receptor-Induced Actin Remodeling. *Science*. 2004; 305: 1153-1157.
- Wraith david C. Role of interleukin-10 in the induction and function of natural and antigen-induced regulatory T cells. *Journal of Autoimmunity*.2003;20:273-275.
- Xie Jin, Qian Jianfei, Wang Siqing, Freeman III Muta E., Epstein Joshua, an Yi Qing. Novel and Detrimental Effects of Lipopolysaccharide on In Vitro Generation of Immature Dendritic Cells: Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase p38. *The Journal of Immunology*. 2003;171:4792-4800.