

UCH-FC
MAG-BMCM
R 177
C.L



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE POSGRADO**

**INTERVENCIÓN DE LOS MECANISMOS DE TOLERANCIA PERIFÉRICA
PARA LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ALOGÉNICA.**

Memoria de título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas mención Biología Celular, Molecular y Neurociencias.

VALERIE TRINIDAD RAMÍREZ FERNÁNDEZ

Directores de memoria de título: Dra. María Rosa Bono
Dr. Juan Alberto Fierro



INFORME DE APROBACIÓN

TESIS MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Magíster presentada por la candidata:

VALERIE TRINIDAD RAMÍREZ FERNANDEZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas mención Biología Celular, Molecular y Neurociencias, en el examen de defensa de tesis rendido el 22 del mes de Agosto del año 2011.

Directores de Tesis

Dra. María Rosa Bono

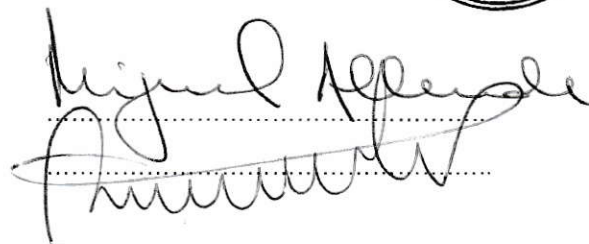
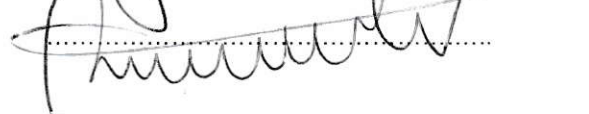
Dr. Juan Alberto Fierro


.....


Comisión Evaluación de la Tesis

Dr. Miguel Allende

Dr. Alexis Kalergis


.....

.....



"A mis hermanas"

AGRADECIMIENTOS



Al terminar esta nueva etapa en mi formación científica, quisiera agradecer a varias personas que hicieron este desafío posible.

Quiero agradecer a la Dra. María Rosa Bono por su apoyo y sus críticas que permitieron que esta tesis fuera realizada con originalidad y acuciosidad. Además, sus correcciones en la preparación de este manuscrito fueron fundamentales. También debo agradecer al Dr. Juan Alberto Fierro y al Dr. Mario Roseblatt por su constante preocupación en mi formación científica y en la discusión de los resultados.

Quiero agradecer a la Ingeniera en Biotecnología Molecular Cinthia Silva por su fundamental aporte en la organización y realización de los experimentos *in vivo*. También quisiera agradecer a los integrantes del Laboratorio de Inmunología que con su ayuda, con su sonrisa y su buen humor hicieron de este proceso un camino alegre: Paulina Ruiz, Gabriela Tejón, Alejandra Gleisner, Daniela Sauma, Camila Fuentes, Leonardo Vargas, Carolina Moore, Paz Reyes, Jennifer Alfaro, Jaime de Calisto y Paula Micha. Agradezco también a Pamela Palma, Eva Mella y a Oscar por tener todo dispuesto para la realización de los experimentos.

También quiero agradecer mi amiga Sandra Pérez que vivió conmigo durante todo el tiempo en que realicé esta tesis, que escuchó todas mis frustraciones experimentales sin quejarse, siempre dándome una mirada imparcial. Muchas gracias Sandrita por todos esos días. También agradezco de mis colegas y amigas Nallatt Ocaez y Nancy Farfán por estar apoyándome y instándome a que terminara este manuscrito.

Quiero agradecer a mis hermanas Rocío y Lía Ramírez por su constante preocupación por mí y por ser mis cómplices en todos mis proyectos. Principalmente quiero agradecer a Lía, futura colega Ingeniera en Biotecnología Molecular, por las correcciones en la presentación de la defensa privada.

Finalmente agradezco a mis abuelos y a mi tía Nelly Fernández que siempre han creído en mí y nunca me han faltado cuando los he necesitado.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE CONTENIDOS	iii
INDICE DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Alorreactividad y mecanismos celulares del rechazo.	5
1.2. Tolerancia central y periférica.	8
1.3. La célula dendrítica como reguladora de la tolerancia	11
1.4. Estrategias experimentales usadas para la regulación de la respuesta inmune en trasplantes.	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1. Animales.	18
2.2. Anticuerpos y reactivos.	18
2.3. Generación y caraterización de fagosomas alogénicos.	19
2.3.1. Generación de fagosomas alogénicos.	19
2.3.2. Microscopía electrónica.	21
2.4. Evaluación de la regulación de la respuesta inmune alogénica	22

<i>in vivo</i> mediada por fagosomas.	
2.4.1. Protocolo experimental para la evaluar la respuesta alogénica <i>in vivo</i>	22
2.4.2. Medición de aloanticuerpos.	23
2.4.3. ELISPOT (<i>Enzyme- Linked Immunospot</i>).	23
2.4.4. Activación alogénica de esplenocitos.	25
2.5 Análisis Estadístico.	26
3. RESULTADOS	27
3.1. Caracterización de los fagosomas alogénicos.	27
3.1.1. Caracterización de las DC utilizadas para la preparación de fagosomas.	27
3.1.2. Caracterización de perlas de PLGA por citometría de flujo.	30
3.1.3. Las DC incorporan perlas de PLGA sin alterar su estado de maduración.	32
3.2. Los fagosomas alogénicos modulan la respuesta inmune celular y humoral <i>in vivo</i> .	36
3.3. Los fagosomas regulan la respuesta inmune de manera antígeno específica.	39
3.4. La administración de fagosomas disminuye la activación de los linfocitos CD4 y CD8.	41
4. DISCUSION	43
5. CONCLUSIONES	48
6. REFERENCIAS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2	Las DC utilizadas para generar fagosomas presentan un fenotipo tolerogénico.	29
FIGURA 1	Caracterización de perlas de PLGA-Alexa 647 por citometría de flujo.	31
FIGURA 3	Las DC incorporan perlas de PLGA y mantienen su estado inmaduro.	34
FIGURA 4	Las DC incorporan un gran número de perlas de PLGA.	35
FIGURA 5	Los fagosomas alogénicos disminuyen la respuesta inmune alogénica.	38
FIGURA 6	Los fagosomas alogénicos regulan la respuesta inmune de manera antígeno dependiente.	40
FIGURA 7	El tratamiento con fagosomas alogénicos inhibe la activación de los LT CD4 y CD8 <i>in vivo</i> .	42

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH) ₂ D ₃ :	1 α ,25-Dihidroxitamina D ₃ . (Forma activa de la vitamina D ₃).
APC:	Alofocianina.
APC:	Células presentadora de antígenos profesional.
DC:	Célula dendrítica.
EDTA:	Ácido etilendiaminotetra acético.
FCS:	Suero fetal bovino.
FDA	<i>Food and Drug Administration.</i>
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína.
Foxp3:	<i>Forkhead box p3.</i>
FSC:	Forward Scatter.
GM-CSF:	Factor estimulador de colonia granulocito-macrófago.
IL-2	Interleuquina 2.
IL-6:	Interleuquina 6.
IL-12p70:	Subunidad p70 de la interleuquina 12.
IL-10:	Interleuquina 10.
IL-35:	Interleuquina 35.
INF- γ	Interferón gamma.
LB:	Linfocito B.
LPS:	Lipopolisacárido bacteriano.
LT:	Linfocito T.
LT CD4:	Linfocito T cooperador.
LT CD8:	Linfocito T citotóxico.
LTreg:	Linfocito T regulador.
LT Th17:	Linfocito T productor de interleuquina 17.
MHC-I/II:	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II.
mTOR	Blanco de rapamicina en mamíferos.

PBS:	Tampón de fosfato salino.
PD-L1/2:	Ligando 1/2 de muerte celular programada.
PE:	Ficoeritrina.
PE-Cy5/7:	Ficoeritrina en tandem con cianina 5 ó 7.
PLGA	<i>Poly Lactic-co-Glycolic Acid.</i>
RA:	Ácido retinoico.
SSC:	<i>Side Scatter.</i>
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β .
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral α .
TCR:	Receptor de linfocitos T.
TLR:	Receptor tipo toll.

RESUMEN

La supervivencia de un órgano trasplantado depende del control de la respuesta inmune contra el injerto. El uso de medicamentos inmunosupresores permite controlar la respuesta inmune, sin embargo, estas drogas tienen efectos colaterales como la aparición de infecciones oportunistas, neoplasias e hipertensión, que ponen en riesgo la vida de los pacientes. Es así como la inducción de tolerancia específica hacia antígenos del donante se ha convertido en un blanco de estudio para disminuir el uso de drogas inmunosupresoras y lograr mejores resultados en trasplantes.

La tolerancia inmunológica en el contexto del trasplante puede ser definida idealmente como un estado en el cual, el sistema inmune no genera una respuesta patológica contra aloantígenos y no se requiere de inmunosupresión exógena conservando la respuesta inmune contra otros antígenos, lo que permite la supervivencia del órgano trasplantado. Para lograr la tolerancia inmunológica, en este trabajo, se administraron aloantígenos del donante en forma de fagosomas a ratones receptores y luego se inmunizaron con células del donante como modelo de trasplante alotípico. Los fagosomas fueron producidos con micropartículas de PLGA aisladas desde células dendríticas inmaduras que fagocitan estas partículas y que transportan moléculas del donante. Se administró una única dosis de fagosomas alotípicos y se evaluó la respuesta inmune celular y humoral. Demostramos que el tratamiento con fagosomas previo a una inmunización con células del donante disminuye la respuesta inmune, siendo este efecto dependiente de la dosis de fagosomas aplicada y antígeno específica. Estos resultados sugieren que la utilización de fagosomas alotípicos previo al trasplante de órganos podría

permitir la inducción de tolerancia y disminuir el uso de drogas inmunosupresoras.

ABSTRACT

The survival of a transplanted organ depends on the control of the immune response against the graft. The immunosuppressive drugs control the immune response, however, these drugs have side effects such as opportunistic infections, neoplasms and hypertension that put in risk the life of the patients. Thus, the induction of specific tolerance to donor antigens has become a target to reduce the use of immunosuppressive drugs and achieve better results in transplantation.

Immunological tolerance can be defined as a state in which the immune system does not generate a pathological response against alloantigens and do not requires exogenous immunosuppression, but it is maintaining immune responses against other antigens, that allow the survival of transplanted organ. In this study, we administered donor alloantigens in the form of phagosomes to recipient mice and then they were immunized with donor cells as a model of allogeneic transplantation. Phagosomes were produced with PLGA microparticles isolated from immature donor dendritic cells, which transport MHC class I and II. We evaluated the effect of a single dose of allogeneic phagosomes in the cellular and humoral immune response. We demonstrate that the treatment with phagosomes prior to immunization with donor cells reduces the immune response, and this effect was dose dependent and antigen specific. These results suggest that the use of allogeneic phagosomes prior to organ transplantation could allow the

induction of tolerance and decrease the use of immunosuppressive drugs.

1. INTRODUCCION

El trasplante de órganos entre individuos de la misma especie ha sido uno de los avances en medicina más importantes y gracias a las nuevas técnicas quirúrgicas y terapias inmunosupresoras, el trasplante es un procedimiento común en los centros hospitalarios. El trasplante de órganos es utilizado como única alternativa en el caso de falla terminal renal, cardíaca y pulmonar o como tratamiento para mejorar la calidad de vida de pacientes diabéticos al reemplazar un páncreas defectuoso (Kresnsky & Pober, 2000; Leachler y cols, 2005). En Chile, se han realizado más de 200 trasplantes en el año 2010, siendo líderes en la región en este tipo de procedimientos. Sin perjuicio de esto, el éxito de los trasplantes depende de una inmunosupresión eficiente, la cual promueve la aparición de infecciones oportunistas, tumores secundarios y efectos colaterales como el aumento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Es imperioso la creación y el estudio de nuevas estrategias de inmunosupresión, donde se manipulen los mecanismos inmunológicos de tolerancia central y periférica del receptor para generar tolerancia antígeno específica que permita la aceptación de órganos a largo plazo, disminuyendo al mínimo el uso de drogas inmunosupresoras.

1.1. Alorreactividad y mecanismos celulares del rechazo.

La alorreactividad es la respuesta inmune en contra de las células de un órgano trasplantado de un individuo de la misma especie que presenta diferencias alélicas en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Los linfocitos T (LT) reconocen a los péptidos alogénicos cargados en las moléculas de MHC y se

activan, lo que favorece las respuestas de los linfocitos B (LB) y la activación de los mecanismos efectores de la respuesta inmune. Los LT se diferencian en LT citotóxicos CD8+ o LT de ayuda CD4+ dependiendo del reconocimiento de las moléculas MHC clase I y II, respectivamente (von Boehmer y cols, 2003). Existe una mayor frecuencia de LT alorreactivos que de LT específicos contra cualquier otro péptido foráneo, lo que sugiere la existencia de una degeneración en el reconocimiento de las moléculas de MHC (Felix & Allen, 2007). Las moléculas de MHC son altamente polimórficas, pues existen cientos de distintos alelos MHC presentes en la población humana y cada individuo puede expresar a lo menos seis diferentes alelos MHC clase I (MHC I) y seis alelos MHC clase II (MHC II). Las moléculas de MHC I se expresan en todas las células, mientras que las moléculas de MHC II sólo están expresadas en las células presentadoras de antígenos profesionales (APC) como las células dendríticas (DC), los macrófagos, los LB y las células epiteliales del timo, siendo las DC las únicas capaces de activar a los LT vírgenes e iniciar la respuesta inmune.

Debido a la alorreactividad y en ausencia de drogas inmunosupresoras, el órgano trasplantado es infiltrado densamente por leucocitos del receptor, fenómeno conocido como *rechazo agudo*, que se presenta típicamente entre 1 a 2 semanas después del trasplante. El rechazo agudo causa necrosis celular del injerto y/o trombosis de los vasos sanguíneos, siendo los LT CD8+ citotóxicos los principales involucrados, pues las drogas inmunosupresoras que se usan en pacientes como la ciclosporina y el tacrolimus, bloquean la respuesta de los LT CD4+ más eficientemente que la de los LT CD8+ (Strehlau y cols, 1997). Los aloanticuerpos reconocen las moléculas MHC expresadas por las células endoteliales y son causantes del rechazo vascular de los aloinjertos.

Los agentes inmunosupresores pueden prevenir o revertir en gran medida el rechazo agudo, pero el injerto puede sucumbir a un rechazo a largo plazo, conocido como *rechazo crónico*, que se caracteriza por un reemplazo del parénquima del injerto por fibrosis. En el rechazo crónico, participan los LT CD4+ alorreactivos productores de citoquinas, los LT CD8+ alorreactivos citotóxicos y los anticuerpos alorreactivos producidos por los LB. Los LT CD4+ activados por el reconocimiento de aloantígenos promueven la generación de LT CD8+ y la activación de LB productores de aloanticuerpos y activan de manera antígeno independiente a los macrófagos que generan especies reactivas de oxígenos, óxido nítrico y enzimas degradativas. Los LT CD8+ pueden producir IFN- γ , dañando a los injertos por citólisis directa del parénquima y de las células vasculares (Lowry, 1996).

Gracias a la aplicación de drogas inmunosupresoras el rechazo agudo del trasplante es menor al 10% de los casos, pero la introducción de nuevas drogas inmunosupresoras no han alterado la pérdida tardía de injertos debido al rechazo crónico (Libby & Pober, 2001).

Las DCs regulan el rechazo agudo y crónico porque presentan aloantígenos a los LT del receptor a través de la presentación directa, indirecta y semidirecta. En la presentación directa, existe el reconocimiento de las moléculas de MHC de las DCs y/o macrófagos del injerto por parte de los LT CD4+ del receptor. La presentación indirecta involucra el reconocimiento de los péptidos provenientes de fragmentos de células del donante cargados en moléculas de MHC propias. (Felix & Allen, 2007). En la vía semidirecta, los linfocitos T del receptor reconocen a las moléculas de MHC del donante que son transferidas intactas desde las células del donante a la superficie de las DC del receptor a través de la transferencia de vesículas. El nivel de participación de cada vía de presentación depende del tiempo transcurrido

después de realizado el trasplante, el tipo de trasplante y el modelo experimental utilizado (Morelli & Thomson, 2007).

La vía directa ha sido considerada clásicamente como el mecanismo de presentación involucrado en el rechazo agudo, pero la vía de presentación indirecta predomina tardíamente, convirtiéndose en el principal mecanismo involucrado en el rechazo crónico.

También existen otros mecanismos que contribuyen al rechazo de aloinjertos, como la hipoxia por isquemia/reperfusión, la hiperlipidemia, infecciones y traumas mecánicos que pueden provocar respuestas pro-inflamatorias. También la preexistencia de lesiones arterioscleróticas son sustrato para la evolución acelerada de lesiones provocadas por activación inmunológica (Lyson y cols, 1993).

1.2. Tolerancia central y periférica.

El sistema inmune posee dos mecanismos para impedir la respuesta inmune contra los antígenos propios conocidos como tolerancia central y tolerancia periférica. La tolerancia central se produce a nivel de los órganos linfoides centrales a través de la deleción los progenitores linfoides autorreactivos en el timo y en la médula ósea (LT y LB, respectivamente). En el timo cerca del 90-99% de los LT autorreactivos son deleccionados por apoptosis a través de la interacción del receptor Fas y su ligando FasL. Los linfocitos que salen del timo y circulan en la periferia han sorteado los mecanismos de selección positiva donde se eliminan a los progenitores que no reconocen o poseen una baja afinidad por las moléculas de MHC, y la selección negativa, donde se eliminan los linfocitos T que poseen una alta afinidad por el

complejo antígeno propio-MHC. (Hogquist, 2005).

Sin embargo, en adultos existen algunos linfocitos con la capacidad de reconocer los componentes propios, pues en el timo y en la médula ósea no se produce la eliminación completa de los linfocitos autorreactivos, esto implica que los clones autorreactivos que persisten requieren de un control a nivel periférico para evitar la activación de una respuesta autoinmune, este control fuera de los órganos linfoides primarios es conocido como tolerancia periférica (Li y cols, 2001).

Pero, a pesar de estos mecanismos de control, existe alrededor de un 10% de LT totales que reconocen antígenos alogénicos (Suchin y cols, 2001), por lo que la magnitud de LT que se deben delecionar para generar tolerancia a los antígenos provenientes de un órgano trasplantado es enorme. Estas consideraciones sugieren que el mecanismo de delección es crítico para la inducción de tolerancia en trasplantes, y se ha propuesto la introducción de células alogénicas en el timo para generar la delección clonal de los LT autorreactivos (Sykes, 2001).

La mantención de la tolerancia periférica es realizada a través de varios mecanismos inmunológicos, entre ellos está la anergia clonal que corresponde a un estado refractario de los LT causado por la presentación de antígenos por parte de algunas APC que no poseen moléculas co-estimuladoras como CD80 o CD86. Otro mecanismo de tolerancia periférica es la ignorancia clonal en donde los linfocitos T autorreactivos nunca se encuentran con el antígeno apropiado pues están secuestrados en tejidos inaccesibles que provoca su muerte por la falta de estimulación (Li y cols, 2001; Sprent & Kishimoto, 2001).

Otro de los mecanismos de tolerancia periférica fue propuesto por primera

vez en los años 80, donde se encontró que existía un subconjunto de células reguladoras que suprimen predominantemente los LT efectoras y en especial los autorreactivos que existen normalmente en la periferia que escapan al control de la delección clonal del timo (Sakaguchi S. y cols, 2007). Estas células fueron primeramente reconocidas como linfocitos T reguladores (LT reg) con un fenotipo CD25⁺ CD4⁺ (LT reg), que expresan el factor de transcripción Foxp3. Los LT reg representan entre el 5-10% de los LT circulantes y su ausencia provoca enfermedades autoinmunes (Sakaguchi y cols, 1995) pues controlan negativamente casi todas las respuestas inmunes adaptativas tanto en contextos fisiológicos como patológicos (Wing & Sakaguchi, 2010).

Los LT reg requieren para su función de la activación antígeno específica del TCR, pero una vez activados son capaces de suprimir de manera no específica (Thornton y cols, 2004). Se ha propuesto que los LT reg Foxp3⁺ ejercen su acción reguladora suprimiendo la proliferación, la diferenciación o la secreción de citoquinas a través de un mecanismo dependiente del contacto célula-célula (Tang y cols, 2008), por muerte de las células efectoras a través de la granzima B y las perforinas (Grossmann, 2004), o por mecanismos mediados por factores solubles como las citoquinas inmunosupresoras (IL-10, TGF- β , IL-35 y la galentina-1) (Maloy y cols, 2003), o por deprivación de citoquinas necesarias para la supervivencia de células efectoras como IL-2. Se propone que los mecanismos de acción de los LT reg podrían operar de manera sinérgica o complementaria. (Wing & Sakaguchi, 2010).

La generación de los LTreg radica principalmente en el timo, pero también los LT naive de la periferia pueden aumentar la expresión de Foxp3 y adquirir las funciones y el fenotipo de los LT reg. En nuestro laboratorio se ha desarrollado un

protocolo de generación de LT reg a partir de LT CD4+ CD25- aislados del bazo en presencia de TFG- β y ácido retinoico (RA). Estos LT reg generados *de novo* son capaces de suprimir la proliferación de LT efectores de manera antígeno dependiente y expresan marcadores clásicos de *homming* intestinal (Moore y cols, 2010).

1.3. La célula dendrítica como reguladora de la tolerancia.

Las células dendríticas DCs son células presentadoras de antígenos profesionales derivadas de médula ósea con la capacidad única de iniciar y regular la respuesta inmune (Banchereau & Steinman, 1998). La naturaleza de la respuesta inmune generada por las DC dependen de su estado de maduración y diferenciación funcional, influenciada por factores del microambiente linfóide como los productos microbianos y las citoquinas (Banchereau y cols, 2000). En el estado inmaduro, las DC son intrínsecamente tolerogénicas y pueden regular la respuesta de los LT contra los péptidos propios o extraños, en cambio si son expuestas a estímulos inflamatorios adquieren una potente función inmunoestimuladora asociada a una mayor expresión de moléculas MHC-II y moléculas coestimuladoras. Las DC tolerogénicas se caracterizan por un baja expresión de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y, son resistentes a la maduración en respuesta a señales de peligro producido por los ligandos de los receptores tipo toll (TLR) o el ligando de CD40, (CD40L). Además tienen la habilidad para generar y/o expandir LT reg, promover la apoptosis de LT efectores, secretan una elevada concentración de IL-10 y baja secreción de IL-12p70 y pueden migrar a los tejidos linfoides secundarios a través de la expresión en la superficie de receptores de quimioquinas. Esta dicotomía en el funcionamiento de las DC unida a su gran plasticidad, provee una base para el desarrollo de DCs tolerogénicas con aplicación

terapéutica (Hackstein & Thomson, 2004).

Se ha demostrado que las DC inmaduras cargadas con antígenos en forma de debris de células apoptóticas no aumenta la expresión de MHC o de moléculas coestimuladoras y fallan en activar la respuesta inmune de los LT, (Steinman y cols, 2000) porque generan delección clonal y anergia de los LT (Kurts y cols, 1997). Los LT apoptóticos y los LT anérgicos inhiben la maduración de las DC por lo que la delección y la anergia provocada en los LT por las DC representan un proceso de retroalimentación negativa, manteniendo el estado tolerante.

1.4. Estrategias experimentales usadas para la regulación de la respuesta inmune en trasplantes.

A pasar de los mecanismos tanto centrales como periféricos para inducir y mantener un estado de tolerancia inmunológica, en el caso de trasplantes, es necesario generar un estado de tolerancia operacional, en donde se inhiba la respuesta inmune hacia los antígenos del donante, pero se mantenga la respuesta inmune activable en contra de infecciones y neoplasias. La inmunosupresión es el único recurso clínico disponible, pero se ha realizado un gran esfuerzo por parte de los investigadores en esta área para proponer alternativas a la inmunosupresión.

Una de las alternativas, es a través de la modulación del estado de maduración de las DC *in vitro*, con drogas inmunosupresoras como la rapamicina, que inhibe la función de la quinasa serina/treonina mTOR, que es central en el control del crecimiento celular, proliferación y traducción de proteínas. En las DC, la rapamicina disminuye la producción de citoquinas inflamatorias como IL-12p70 y

TNF- α e inhibe su maduración (Hackstein y cols, 2003). Se ha demostrado que las DC tratadas con rapamicina cargadas de aloantígenos del donante regulan a los LT de manera antígeno específica y prolonga la supervivencia de un trasplante de corazón (Taner y cols, 2005).

También se ha demostrado que la forma activa de la vitamina D₃ (1 α ,25(OH)₂ D₃) inhibe la diferenciación y la maduración de las DC *in vitro* (Gleisner A., 2010) y en combinación con drogas inmunosupresoras se induce tolerancia a un trasplante de islotes pancreáticos en ratones tratados con DC diferenciadas en vitamina D₃ (Gregori, 2001).

Otra estrategia utilizada es la depleción de LT alorreactivos del receptor con anticuerpos, inmunotoxinas y/o irradiación, pero ninguna de estas estrategias son antígeno específicas y no mantienen un estado de tolerancia permanente, porque luego de la depleción se generan nuevos LT alorreactivos (Matzinger & Anderson, 2001). Se ha visto, en modelos murinos, que en el trasplante de médula ósea alogénico las células del donante son alojadas en el timo y los LT alorreactivos son eliminados por apoptosis, generando un estado de quimerismo mixto en donde el receptor tolera a los injertos del donante de manera permanente, sin ningún tipo de inmunosupresión (Wekerle, 1998). La gran desventaja de inducir la deleción clonal vía quimerismo mixto en el timo es que las células del donante pueden rechazar a las células del receptor generando una enfermedad llamada "injerto versus receptor" (*graft versus host disease*), siendo más severo el remedio que la enfermedad, por lo que este procedimiento no ha sido implementado como un método previo al trasplante de órganos sólidos. Hacer posible el quimerismo mixto a través de un trasplante de médula ósea sin la necesidad inicial de una severa inmunosupresión como lo es la irradiación completa corporal, haría del trasplante

de médula ósea central un procedimiento más frecuente.

La regulación de la respuesta inmune alogénica con LT reg es otra alternativa propuesta. Se han realizado experimentos en donde se han transferido adoptivamente a ratones que previamente han sido irradiados con 5Gy, LT reg CD4+CD25+Foxp3+ que han sido estimulados *in vitro* con aloantígenos, lo que produjo la aceptación a largo plazo de un trasplante de médula ósea y la posterior aceptación de un trasplante cardíaco y de piel (Joffre y cols, 2009). Pero, recientemente se ha sugerido que los LT reg son capaces de reprogramarse y cambiar su función supresora en presencia de IL-6 y TFG- β , lo que promueve la generación de LT pro-inflamatorios TH17 (Bertelli y cols, 2007), por lo que la transferencia adoptiva *in vivo* de LT reg podría tener un efecto contrario al deseado.

Numerosos estudios en ratones han mostrado que el uso de anticuerpos bloqueantes contra los co-receptores CD4, CD8 o contra la molécula de co-estimulación CD40L (CD154), puede usarse para la inducción de tolerancia en trasplantes. (Waldmann & Cobbold, 2001; Larsen y cols, 1996). Sin embargo, ninguna de estas estrategias ha mostrado una inmunosupresión al largo plazo en primates, y sólo recientemente se están iniciando las pruebas clínicas en humanos (Turka & Lechler, 2009).

Una de las estrategias que ha abordado nuestro laboratorio para inducir la tolerancia a largo plazo, es por medio de la entrega de aloantígenos a DC inmaduras del receptor en forma de fagosomas, las cuales presentarían en un contexto no inflamatorio a los aloantígenos. Se ha demostrado con anterioridad que las DC del receptor son capaces de incorporar fagosomas que transportan moléculas alogénicas en una alta proporción y mantienen un fenotipo resistente a la

maduración sin alterar el patrón de secreción de citoquinas (Ramírez V., 2009).

Los fagosomas se generan a partir de DC inmaduras del donante con micropartículas o perlas de PLGA (*poly D,L lactic-co-glycolic acid*). El PLGA es un material biodegradable, biocompatible e hidrolizable en ácido láctico y ácido glicólico en el cuerpo humano de manera inocua, siendo ambos metabolitos productos de varias vías metabólicas (Gad, 2008; Raghavendra C. y cols, 2008). Este material está aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamientos terapéuticos como sistema controlado de entrega de fármacos, péptidos, vacunas, genes, antígenos, factores de crecimiento, etc. En este trabajo utilizamos perlas de 1-3 μm de PLGA para producir y aislar fagosomas, siendo utilizados como soporte para antígenos del donante. Por lo tanto, definimos nuestros fagosomas como una perla de PLGA rodeado de una membrana proveniente de la célula dendrítica.

En esta investigación se demuestra que los fagosomas pueden regular la respuesta inmune alogénica *in vivo* en un modelo murino produciendo un estado de tolerancia periférica que podría permitir la aceptación de injertos del donante con una total o parcial suspensión de drogas inmunosupresoras. Consideramos que esta estrategia es técnicamente superior a otras estrategias utilizadas con anterioridad, ya es que reproducible, almacenable y genera un efecto de regulación tanto a nivel de respuesta humoral como celular.

HIPÓTESIS

La intervención de los mecanismos de tolerancia periférica a través del uso de fagosomas transportadores de antígenos alogénicos permite la disminución de la respuesta inmune alogénica *in vivo*.

OBJETIVO GENERAL

Generar un protocolo de administración de aloantígenos con el fin de modular la respuesta inmune alogénica celular y humoral *in vivo*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar fagosomas con partículas de PLGA recubiertas de la membrana de células dendríticas inmaduras provenientes del donante.
2. Evaluar la respuesta inmune celular alogénica *in vivo* después de la administración intravenosa (*i.v.*) de aloantígenos en forma de fagosomas. Para esto, previo a la inmunización de ratones con esplenocitos del donante, los ratones fueron pretratados con fagosomas alogénicos y la respuesta celular se midió mediante ELISPOT para IFN- γ .

3. Utilizando la misma estrategia que en el objetivo anterior, se evaluó la respuesta inmune humoral *in vivo* midiendo por citometría de flujo la cantidad de aloanticuerpos generados en el receptor.

4. Estudiar el efecto dosis dependencia de la administración de fagosomas en cuanto a la regulación de la respuesta inmune *in vivo*.

5. Determinar si el efecto modulador de la respuesta inmune alogénica es antígeno específica.

6. Evaluar el estado de activación de los LT después de la administración de fagosomas *in vivo*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Animales.

Se utilizaron ratones C57BL/6, BALB/c y CBA que poseen un fondo genético H-2^b, H-2^d, H-2^k, respectivamente. La edad de los ratones utilizados fluctúa entre 2 y 3 meses.

2.2. Anticuerpos y Reactivos.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales comerciales de BD PharMingen anti- ratón:

Conjugados con FITC: anti-IA^b (clon 25-9-17), anti-IA^d (clon AMS-32.1), anti-CD86 (clon GL1), anti-CD80 (clon 16-10A1), anti-H2K^b (clon AF6-88.6). Conjugados con PE: anti-CD11c (clon HL3), anti-H2K^d (clon SF1-1.1) y anti-IEK (clon 14-4-45). Conjugados con APC: anti-CD11c (clon HL3), anti-CD4 (clon RM4-5) y anti-CD83 (clon Michel-19). Conjugado con PECy5: anti-CD3 (clon 17 A2).

También se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales comerciales de eBioscience anti-ratón:

Conjugado en PE: anti-PD-L1 (clon MIHS). Conjugados en APC: anti-CD40 (clon 1C10) y anti-PD-L2 (clon TY25). Conjugado en PECy7: anti-CD8a (clon 53-6.7).

Se utilizó el anticuerpo monoclonal de BD PharMingen Fc Block CD16/CD32

(clon 2.4G2) para bloquear los receptores de baja afinidad para las IgG (FcγII y FcγIII).

Se utilizó el anticuerpo policlonal secundario de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con FITC de Dako (F0232).

Además se usaron los siguientes reactivos: 2-mercaptoetanol (Invitrogen), gentamicina (Laboratorio Sanderson), tripsina (Gibco BRL), agua desionizada (Laboratorio Sanderson), MACS anti-CD11c (clon N418) (Miltenyi Biotec) y GM-CSF recombinante murino (BD PharMingen).

Las perlas de PLGA y las perlas PLGA marcadas con el fluoróforo Alexa 647 fueron gentilmente donadas por el Dr. S. Little de la Universidad de Pittsburgh y se almacenaron a -20°C, hasta su uso.

Se utilizó el Kit de medición de IFN- γ para ELISPOT de BD PharMingen.

2.3. Generación y caracterización de fagosomas alogénicos.

2.3.1. Generación de los fagosomas alogénicos.

Los fagosomas se generaron con partículas de PLGA a partir de DC inmaduras producidas desde precursores de médula ósea, los cuales son cultivados con el sobrenadante de la línea celular J558L transducida establemente con el gen murino de GM-CSF. A continuación se detalla el protocolo para la generación de los fagosomas.

Los precursores de DC se extrajeron desde las tibias y fémures de un ratón donante BALB/c. Los huesos se lavaron en etanol 70% por 1 minuto y se perfundieron con medio RPMI suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/mL y se eliminaron los glóbulos rojos incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente en una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH_4Cl 0.15 M, KHCO_3 10 mM y Na_2EDTA 0.1 mM, pH 7.2-7.4). Posteriormente se lavaron las células con medio RPMI y se cultivaron en placas de Petri bacteriológicas (140mm, Sterilin, Barloworld Scientific) a una densidad de 10^7 células totales por placa en 20 ml de medio completo que contiene: RPMI + 10% FCS + 50µM de 2-Mercaptoetanol + 50µg/mL de gentamicina + 3% vol/vol del sobrenadante de la línea celular J558L secretora de GM-CSF murino. Las células se cultivaron a 37°C y 5% de CO_2 . A los días 4 y 8 de cultivo se recuperaron tanto las células adherentes (por tripsinización) como las no adherentes, y fueron sembradas a una densidad de 10^7 células por placa en 20 mL de medio fresco. Por último, al día 12 del cultivo se recuperaron todas las células de las placas y se sembraron a $50 \cdot 10^6$ DC en un tubo Falcon de 50 ml con $250 \cdot 10^6$ perlas de PLGA para producir la fagocitosis de las partículas. La incubación se realizó por 20 minutos a 37°C en un volumen final de 1 ml de medio RPMI+ 10% FCS en un baño termostático. Posteriormente se agregó 4 ml de medio RPMI + 10% FCS, se centrifugó por 2 min a $400 \times g$ y se continuó la incubación por otros 70 minutos a 37°C en el baño termostático. Para detener la fagocitosis, las células se lavaron 3 veces con 40 ml de PBS frío y se resuspendieron en 1 mL de PBS + 2% FCS. Luego de la incubación, las células se lisaron mecánicamente con una jeringa de 21G (60 veces) en un tubo Eppendorf. Finalmente el lisado celular se centrifugó a $155 \times g$ por 5 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante, el cual se almacenó a 4°C, hasta su utilización. Se midió la cantidad de proteína presente en los fagosomas a través del kit de cuantificación Qubit (Invitrogen).

2.3.2. Microscopía electrónica.

La incorporación de las perlas de PLGA por parte de las DC fue visualizado por microscopía electrónica en las dependencias de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Brevemente, las células dendríticas se incubaron con o sin perlas de PLGA, por 90 min a 37°C y 5% de CO₂ en medio de RPMI + 10% FCS y se centrifugaron a una velocidad de 400 × g por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en glutaraldehído 3% disuelto en buffer cacodilato de sodio 0,138 M, pH 7,2 durante 4 horas a temperatura ambiente. Luego las muestras se lavaron por 2 horas con cacodilato de sodio 0,138 M con cambios de medio cada 30 min y se incubaron con tetróxido de osmio al 1% en medio acuoso durante 90 min, después se lavó con agua destilada y las muestras se trataron con acetato de uranilo al 1% por 60 min. Luego se deshidrataron con etanol a concentraciones crecientes: 50, 70, 95 y 100% incubando durante 20 minutos en cada concentración para luego ser pre-incluidas en epon/etanol toda la noche (16 horas). Para el proceso de inclusión se incubaron las muestras en epon fresco (resina) a 60°C por 24 horas para permitir la polimerización de la resina. Se cortaron las muestras con un ultramicrotomo Sorval MT-5000, se tiñeron con acetato de uranilo al 4% en metanol durante 1 min y luego con citrato de plomo por 5 min. Finalmente, los cortes se observaron en un microscopio electrónico (Phillips Tecnai 12BT) a 80 kV.

2.4. Evaluación de la regulación de la respuesta inmune alogénica *in vivo* mediada por fagosomas.

2.4.1 Protocolo experimental para evaluar la respuesta inmune alogénica *in vivo*.

Para evaluar la capacidad de los fagosomas alogénicos de regular la respuesta inmune que se genera en el trasplante *in vivo*, se desarrolló el siguiente protocolo de inmunización: a ratones receptores C57BL/6 (H-2^b), se les inyectó de manera intravenosa (*i.v*) una única dosis de fagosomas (150 ó 300 µg) en un volumen de 200 µl. Los fagosomas fueron y aislados generados desde DC de ratones BALB/c (H-2^d) (día 1). Luego, a los días 7 y 14 después del pretratamiento con fagosomas se les administró de manera intraperitoneal (*i.p*) 10x10⁶ esplenocitos provenientes de un ratón BALB/c en un volumen de 200 µl.

Se tomaron muestras de sangre antes del pretratamiento con fagosomas y 7 días después de la segunda inmunización con esplenocitos de ratones BALB/c para evaluar la generación de aloanticuerpos en los ratones receptores. Al día 21, los ratones se sacrificaron y se les extrajo los bazo para analizar por ELISPOT el número de células alorreactivas secretoras de IFN-γ.

También se evaluó la especificidad de los fagosomas midiendo la respuesta celular y humoral contra una tercera cepa como lo es la cepa CBA de haplotipo H-2^k, para ello las inmunizaciones se realizaron con esplenocitos de CBA y se analizó la respuesta alogénica celular y humoral.

2.4.2. Medición de aloanticuerpos.

Las mediciones de aloanticuerpos circulantes en el suero se realizaron por citometría de flujo a través del ensayo FCXM (*flow cross match assay*), que se basa en el reconocimiento de aloantígenos presentes en una célula por aloanticuerpos generados en un ratón receptor (Utzing, 1997). Para ello, se obtuvieron esplenocitos del ratón donante de haplotipo H-2^d que se incubaron con alícuotas de suero de los ratones receptores inmunizados.

Se recolectó sangre desde la cola de los ratones receptores inmunizados infringiendo una pequeña herida en ésta. Se tomó alrededor de 200 µl de sangre y las muestras se dejaron a 4°C por 16 horas de manera de separar el plasma del suero. Luego, se tomó el suero, se centrifugó a 300 × g por 10 min a 4°C, y se guardó a – 20°C hasta el análisis de anticuerpos.

El ensayo se realizó incubando 0,5x10⁶ esplenocitos BALB/c en 50 µl de PBS + 2% FCS con suero extraído de los ratones receptores a una dilución de 1/40 por 30 min a 4°C, en oscuridad. Esta dilución fue determinada en experimentos realizados con anterioridad en el laboratorio. Luego se lavó 3 veces con PBS + 2% FCS centrifugando cada vez a 500 × g por 7 min a 4°C. Luego se incubaron las células por 20 min a 4°C con anti-ratón FITC (Dako).

2.4.3. ELISPOT (*Enzyme- Linked Immunospot*)

Se determinó por ELISPOT el número de células respondedoras secretoras de IFN-γ provenientes de ratones receptores que fueron inmunizados con

esplenocitos de un ratón donante. Las células respondedoras son activadas alogénicamente con esplenocitos extraídos de un ratón donante de la cepa BALB/c irradiados previamente con 30cGy radiación gamma (realizado en Clínica Las Condes) siendo por lo tanto, incapaces de activarse y producir citoquinas, sirviendo sólo como fuente de activación alogénica para las células respondedoras.

Para la medición de IFN- γ , se utilizó el protocolo recomendado por los fabricantes. Brevemente, en esterilidad, se diluyó el anticuerpo de captura para IFN- γ en PBS a una razón de 1/200. Se agregó 100 μ l de está solución a cada pozo y se incubó por 16 horas a 4°C. Al día siguiente, se eliminó el anticuerpo de captura y se lavó cada pozo con 320 μ l de solución de bloqueo que consiste en RPMI + 10% FCS + 1% penicilina/estreptomicina/L-Glutamina y luego se dejó con 320 μ l de la solución de bloqueo por 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se descartó la solución de bloqueo y se agregaron $0,1 \times 10^6$ células respondedoras (receptoras) más $0,1 \times 10^6$ células activadoras irradiadas (donantes) en un volumen final de 200 μ l de medio de cultivo (RPMI+ 10% suero). Se incubó por 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se lavó la placa 2 veces con agua desionizada, con 320 μ l por pozo, esperando 5 min entre cada lavado. Luego se lavó 3 veces con 320 μ l por pozo con el buffer de lavado que corresponde a PBS + Tween-20 al 0,05%, esperando 5 min entre los lavados. Luego, se diluyó el anticuerpo de detección a una razón de 1/250 en el buffer de dilución (PBS + 10%FCS) y se agregó 100 μ l de la dilución a cada pozo. Se incubó por 16 horas a 4°C con las placas tapadas sobre una toalla absorbente húmeda.

Al día siguiente, se desechó el anticuerpo de detección y se lavó 3 veces con 320 μ l de buffer de lavado esperando 5 minutos entre los lavados. Se diluyó la

enzima HRP conjugada con estreptavidina a una razón 1/100 en buffer de dilución y se agregaron 100 μ l a cada pozo. Se incubó por 2 horas a temperatura ambiente cubriendo la placa de la luz. Se desechó la enzima y se lavó 4 veces con buffer de lavado remojando 5 min entre cada lavado, luego se lavó 2 veces con PBS y se agregó 100 μ l del sustrato final. Para la preparación del sustrato final se requieren 20 ml de buffer AEC + 333 μ l de solución AEC por placa. La mezcla se pasó por un filtro de 0,45 μ m y se agregó a los pozos. Se observó cuidadosamente la aparición de spots en los pozos de las placas y se detuvo la reacción con agua desionizada aproximadamente 40 min después de agregado el sustrato. Se dejó secar la placa por 16 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Para la cuantificación del número de células secretoras de IFN- γ se desprendió la superficie inferior de la placa y se analizó por el programa A.EL.VIS™. Se graficó el número de spots producidos después de la activación de los esplenocitos con células alogénicas menos el número de spots producidos por los esplenocitos sin activar.

2.4.4. Activación alogénica de esplenocitos.

Se extrajeron esplenocitos de los ratones que fueron inmunizados y tratados previamente o no con fagosomas alogénicos y se congelaron a -80°C hasta su uso. Posteriormente, se descongelaron calentando brevemente el tubo de congelación en un baño termostático a 37°C, se centrifugaron a 500 \times g por 7 min y se contabilizaron. Se cultivaron $0,5 \times 10^6$ esplenocitos en un volumen final de 200 μ l de medio RPMI + 10% FCS en una placa de 96 pozos por triplicado. Además se agregó a cada pozo $0,5 \times 10^6$ esplenocitos irradiados de células BALB/c para activar alogénicamente las células respondedoras. Se realizaron dos tipos de controles, primero se cultivaron solamente $0,5 \times 10^6$ de células respondedoras y segundo se

cultivaron solamente $0,5 \times 10^6$ esplenocitos BALB/c. La incubación se realizó por 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Al día siguiente se extrajeron las células y se analizó por citometría de flujo la viabilidad celular con ioduro de propidio (PI) y la activación midiendo la expresión de CD25 (cadena α para el receptor de IL-2), para las células CD4+ y CD8+.

2.5. Análisis Estadístico.

Se utilizó el programa Graph Prism versión 5 para los análisis estadísticos. Se graficó el promedio más/menos el error estándar. La comparación entre 2 grupos se hizo por el test de Student. Valores de p menores a 0.05 fueron considerados significativos.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización de los fagosomas alogénicos.

3.1.1. Caracterización de las DC utilizadas para la preparación de fagosomas.

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio, se demostró que las DCs generadas con GM-CSF del sobrenadante de la línea celular J558L, tienen propiedades tolerogénicas, pues presentan baja expresión de MHC-II y de moléculas coestimuladoras como CD86. En este trabajo, se analizó la expresión de otras moléculas co-estimuladoras relevantes para la activación o inhibición de la respuesta inmune, que pudieran estar presentes en las DC y luego ser transportadas por los fagosomas. Se evaluó la expresión de marcadores relacionados con la mantención de la tolerancia periférica y con la generación de LT reg adaptativos como es PD-L1 (Wang & Pino-Lagos y cols, 2008) y PD-L2 (Keir y cols, 2008; Zhang y cols, 2006). También se determinó la expresión de otras moléculas co-estimuladoras como CD83, marcador específico de activación de células dendríticas de humano y de ratón (Breloer & Fleischer, 2008) y CD40, que tiene un rol esencial en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa (Elgueta y cols, 2009).

Como se observa en la figura 1, a los 12 días de cultivo, las DC presentan una alta expresión para el marcador clásico de DC, CD11c, pero son negativas en su mayoría para CD86, CD40 y CD80, existiendo sólo un 6% de células positivas para estos marcadores. Este resultado indica que estas células están en un estado inmaduro o no activado. Alrededor de un 50% de las DC expresan moléculas de

MHC-II, lo cual es esperable puesto que se trata de células presentadoras de antígeno profesionales. Un 100% de las DC expresan la molécula de MHC-I (dato no mostrado) . Al evaluar la expresión de PD-L1, se observa que un 67% de las células expresan este receptor y que existe una co-expresión cercana al 100% entre las células CD11c+ y las PD-L1+ (dato no mostrado), mientras que sólo en un 33% de las DC expresan el marcador PD-L2. Estos resultados confirma el fuerte fenotipo tolerogénico de las DC.

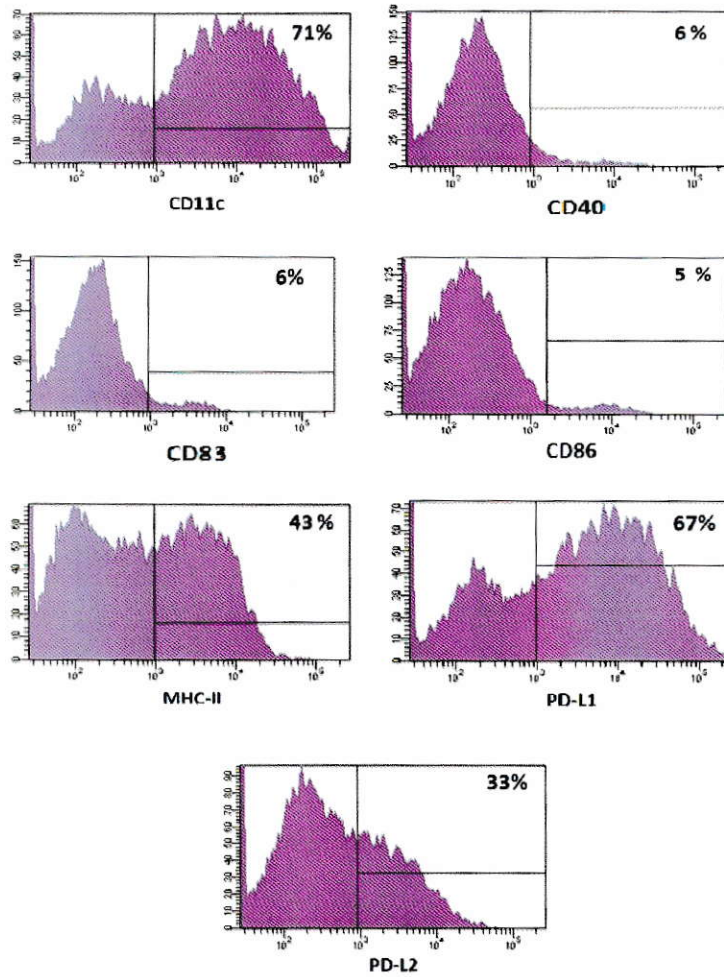


Figura 1. Las DC utilizadas para generar fagosomas presentan un fenotipo tolerogénico. Se evaluó por citometría de flujo la expresión de CD11c. Luego se evaluó los marcadores CD83, CD40, CD86, MCH-II, PD-L1 y PD-L2 en DC CD11c+ derivadas de médula. Las células presentan una baja expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD83 y CD86), pero una alta expresión de receptores relacionados con tolerancia (PD-L1 y PD-L2).

3.1.1. Caracterización de perlas de PLGA por citometría de flujo.

Para la generación de fagosomas alogénicos se utilizaron perlas de PLGA o ácido poli láctico-co-glicólico que es un material orgánico usado como soporte para medicamentos por sus cualidades biodegradables y biocompatibles. Las perlas de PLGA marcadas con el fluoróforo Alexa 647 permiten visualizar los fagosomas por citometría de flujo y de esta manera caracterizar las moléculas presentes en los fagosomas. En una primera instancia, evaluamos el porcentaje de perlas de PLGA que efectivamente son positivas para Alexa 647 utilizando parámetros independientes como el tamaño (FSC) y la granulosidad (SSC).

En la figura 2A, se muestra el tamaño y la granulosidad de las perlas de PLGA. En las figuras 2B y C se muestra la fluorescencia para Alexa 647, en perlas marcadas y no marcadas, respectivamente. Casi el 100% de las perlas marcadas fluorescen en Alexa 647. Este resultado indica que las perlas pueden ser analizadas por citometría de flujo. Luego, se generaron fagosomas con las perlas marcadas y se analizó por citometría de flujo el número de fagosomas presentes en la preparación, donde se encontró que más de un 40% de las partículas de la preparación son Alexa-674 positivas y que ellas también son positivas para MHC clase I y II (dato no mostrado). Este resultado a sido demostrado en el laboratorio por inmunoblot (Silva, 2011) y por microscopía confocal (Ruiz, tesis de doctorado). Por lo que se puede afirmar que los fagosomas son portadores de antígenos del donante.

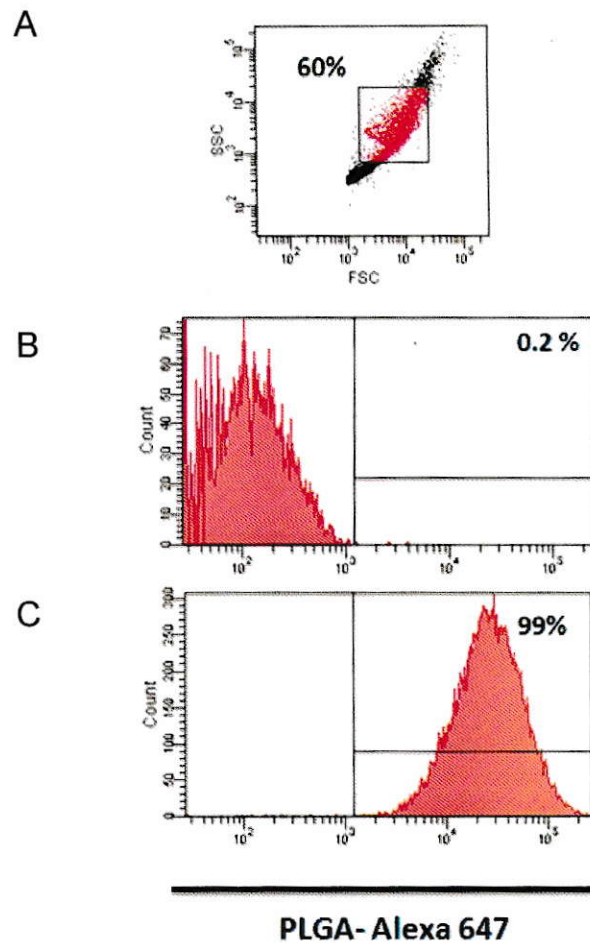


Figura 2. Caracterización de perlas de PLGA-Alexa 647 por citometría de flujo. Las perlas fueron resuspendidas en PBS y analizadas por citometría de flujo. En A, se muestra el gráfico para FSC y SSC de las perlas de PLGA. En B y C se observa la fluorescencia para Alexa 647 de perlas no marcadas y marcadas respectivamente. Figura representativa de 3 experimentos independientes.

3.1.3. Las DC incorporan perlas de PLGA sin alterar su estado de maduración.

En trabajos anteriores del laboratorio, se demostró que las DC generadas con el sobrenadante de la línea celular J558L presentan alta capacidad fagocítica y son resistentes a la maduración con LPS (Ramírez V., 2009). Por lo tanto, se evaluó el porcentaje de fagocitosis y el fenotipo de las DC después de la incorporación de perlas de PLGA marcadas con Alexa-647. Para ello se incubaron las DC con perlas de PLGA a 37°C por 90 minutos, y luego se detuvo la fagocitosis con PBS frío y se analizó por citometría de flujo el porcentaje de perlas de PLGA fagocitadas. Como control, se evaluó la incorporación de perlas a 4°C.

En la figura 3, se observa que un 71% de las DC CD11c positivas incorporan perlas de PLGA Alexa 647, lo que no sucede con los controles realizados a 4°C, donde la fagocitosis no supera el 3%. El análisis del estado de activación de las DC que incorporaron PLGA (en rosado), demuestra que no hay un aumento en CD86. En conjunto estos resultados muestran que las DC incorporan eficientemente las perlas de PLGA y mantienen su fenotipo inmaduro.

Por otra parte, evaluamos la incorporación de las perlas de PLGA a través de microscopía electrónica, de manera de determinar el número de perlas y la morfología de las DC después de la fagocitosis de las perlas. En la figura 4, se observan las DC antes de la incubación con las perla (izquierda) y después de la incorporación de éstas (derecha). El tratamiento para la fijación y tinción de las muestras afecta la composición de las perlas y en su mayoría las desintegra, por lo que los espacios circulares dentro del citoplasma de las células corresponden al lugar donde estuvo una perlas antes del tratamiento de las muestras. Se observa que las DC son capaces de incorporar una gran cantidad de perlas (más de 30), y

que poseen un tamaño entre 1-3 μm . Estos datos demuestran en conjunto, que las DC generadas a partir de precursores de médula ósea presentan un fenotipo inmaduro (Fig. 2) y además son capaces de fagocitar las perlas de PLGA (Fig. 3 y 4).

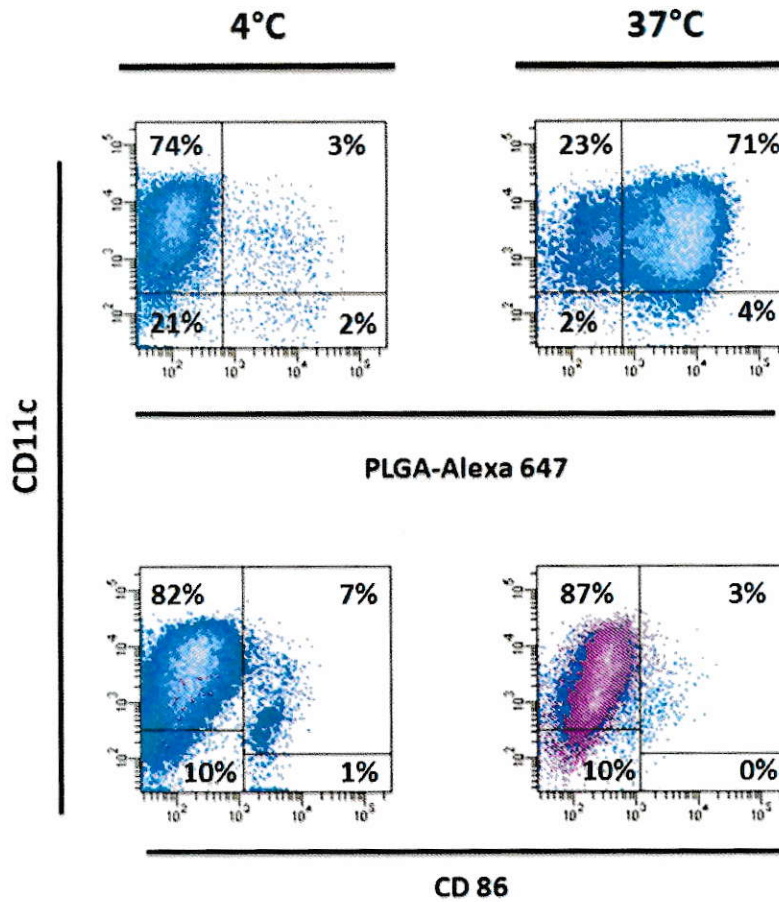


Figura 3. Las DC incorporan perlas de PLGA y se mantienen en un estado inmaduro. Se incubaron DC con perlas de PLGA a 4°C y 37°C y se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de células que fagocitan y el estado de activación a través del marcador CD86. Se observa que las DC incorporan en un alto porcentaje las perlas de PLGA (rosado) y que mantienen su fenotipo inmaduro. Figura representativa de 4 experimentos independientes.

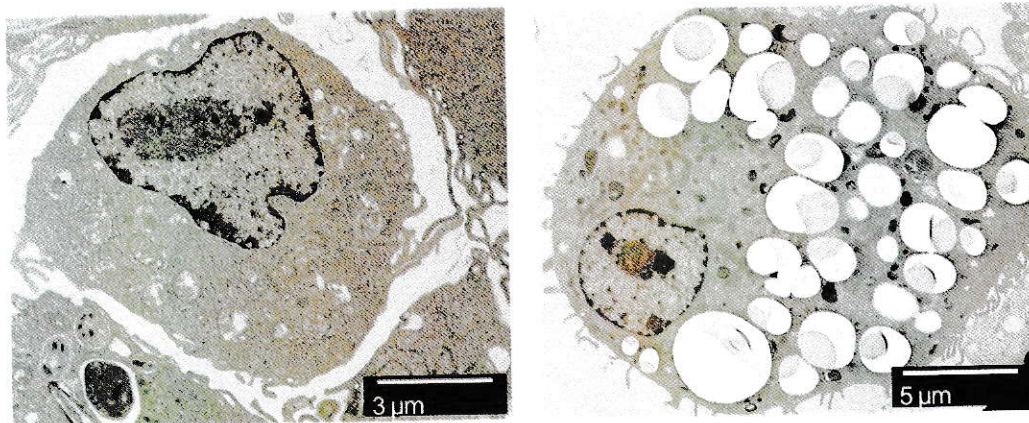


Figura 4. Las DC incorporan un gran número de perlas de PLGA. Izquierda. DC diferenciadas de médula ósea con el sobrenadante de la línea celular J558L vistas por microscopía electrónica. *Derecha.* DCs después de la incubación por 90 min a 37°C con perlas de PLGA.

3.2. Los fagosomas alogénicos modulan la respuesta inmune humoral y celular *in vivo*.

En un trabajo anterior del laboratorio, se demostró por experimentos *in vitro* que las DC que incorporan fagosomas alogénicos no cambian su patrón de secreción de citoquinas y tampoco aumentan la expresión de moléculas co-estimuladoras, si no más bien se generan DC resistentes a la maduración con LPS (Ramírez V., 2009). También se ha observado por experimentos *in vivo* que los fagosomas alogénicos administrados de manera *i.v* en ratones donantes son fagocitados por las DCs del bazo manteniendo su fenotipo no activado (Silva, 2011 datos no publicados).

Con estos antecedentes, se decidió evaluar la capacidad de los fagosomas de regular la respuesta inmune *in vivo*, para lo cual ratones C57/BL6 de haplotipo H-2^b fueron inmunizados *i.p* con esplenocitos alogénicos de un ratón BALB/c haplotipo H-2^d de manera de generar una respuesta inmune alogénica. Previo a la primera inmunización los ratones fueron inyectados *i.v* con una dosis de 150 µg de fagosomas alogénicos. Las inmunizaciones se realizaron luego de 7 y 14 días después de la primera inyección de los fagosomas. Siete días después de la segunda inmunización se tomó una alícuota de sangre de los ratones para evaluar por citometría de flujo la presencia de aloanticuerpos circulantes presentes y se sacrificaron los animales para determinar mediante ELISPOT el porcentaje de linfocitos alogénicos productores de IFN- γ . La técnica de ELISPOT es una forma cuantitativa de medir el número de células alorreactivas (Czerkinsky y cols, 1983), pues cuantifica el número de células activadas que producen una determinada citoquina con una alta sensibilidad.

En la figura 5A, se consideraron sólo los linfocitos CD3 positivos y se graficó el valor de IMF que representa la cantidad de aloanticuerpos presentes en el suero de los ratones inmunizados. Observamos que el tratamiento con una única dosis de fagosomas (150 µg) disminuye significativamente la cantidad de aloanticuerpos producidos por las 2 inmunizaciones con esplenocitos de un haplotipo diferente. En la figura 5B observamos que este tratamiento disminuye el número de LT alorreactivos que secretan IFN-γ. Este resultado sugiere que los fagosomas son capaces de modular la respuesta inmune humoral y celular *in vivo*.

Por otra parte, se decidió estudiar si la dosis de fagosomas inyectados en los ratones receptores influye en la regulación de la respuesta alogénica, y para ello se inyectaron 300 µg de fagosomas por ratón. Se analizó la respuesta inmune humoral, mediante citometría de flujo y la respuesta inmune celular por ELISPOT. Observamos que la aplicación de 300 µg de fagosomas alogénicos no disminuye el número de aloanticuerpos alorreactivos (Fig. 5A), pero aumenta el número de células secretoras de IFN-γ (Fig. 5B). Por lo tanto, la cantidad de aloantígenos administrados en forma de fagosomas es crucial para la modulación de la respuesta inmune, ya que una doble dosis de fagosoma produce activación alogénica que no sería beneficiosa para la modulación de la respuesta inmune en los trasplantes alogénicos.

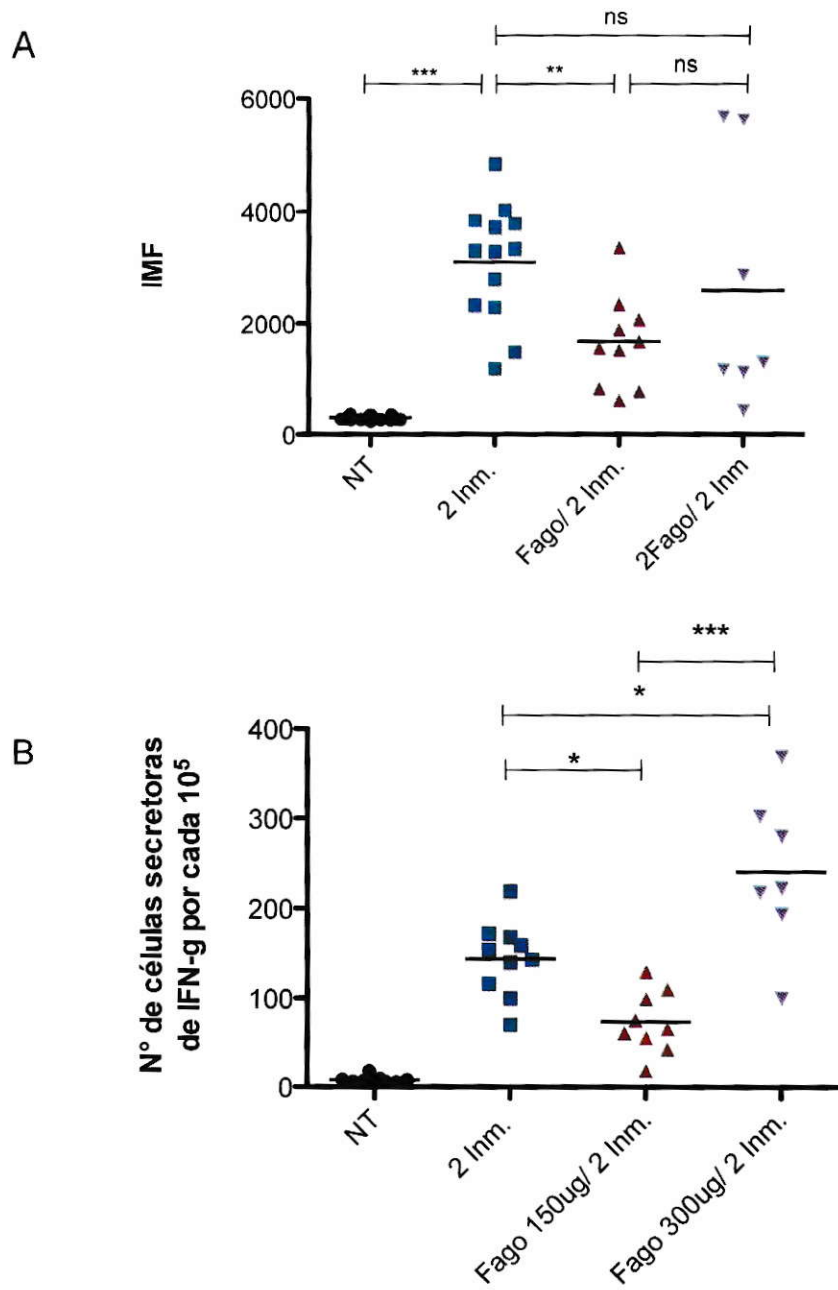


Figura 5. Los fagosomas alogénicos disminuyen la respuesta inmune alogénica. A ratones C57/BL6 se les administró 150 ó 300 μ g fagosomas previo a dos inmunizaciones con esplenocitos BALB/c. Se tomó muestras de suero 7 días después de la segunda inmunización y se analizó por citometría de flujo la cantidad de aloanticuerpos generados y el número de células alorreactivas por ELISPOT. La línea horizontal indica el valor promedio y cada punto equivale a un ratón. Se evaluó por un t-test no paramétrico. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns no significativo.

3.3. Los fagosomas alogénicos regulan la respuesta inmune de manera antígeno específica.

Las drogas inmunosupresoras como el tacrolimus y la ciclosporina, que activan la transcripción de la IL-2 (Liu y cols, 1991) tienen efectos secundarios adversos como la hipertensión arterial, la nefrotoxicidad, la hepatotoxicidad e incrementa la vulnerabilidad a infecciones por hongos y virus oportunistas, pues disminuyen la respuesta inmune de manera global, no sólo contra los antígenos del donante.

Con el fin de evaluar si la modulación de la respuesta inmune a través de los fagosomas ocurre de manera antígeno dependiente, se inmunizaron los ratones receptores de haplotipo b con esplenocitos provenientes de una tercera cepa CBA de haplotipo k, los cuales fueron pretratados con fagosomas de haplotipo d. Se determinó la cantidad de aloanticuerpos anti haplotipo k por citometría de flujo y la cantidad de células alorreactivas por ELISPOT. Tal como se observa en la figura 6, los fagosomas no son capaces de disminuir la producción de aloanticuerpos (Fig.6A) ni el número de células alorreactivas (Fig. 6B) de una tercera cepa. Este resultado indica que los fagosomas son capaces de modular la respuesta inmune dirigida solo en contra los antígenos presentes en los fagosomas, lo que sugiere que los fagosomas generan tolerancia antígeno específica.

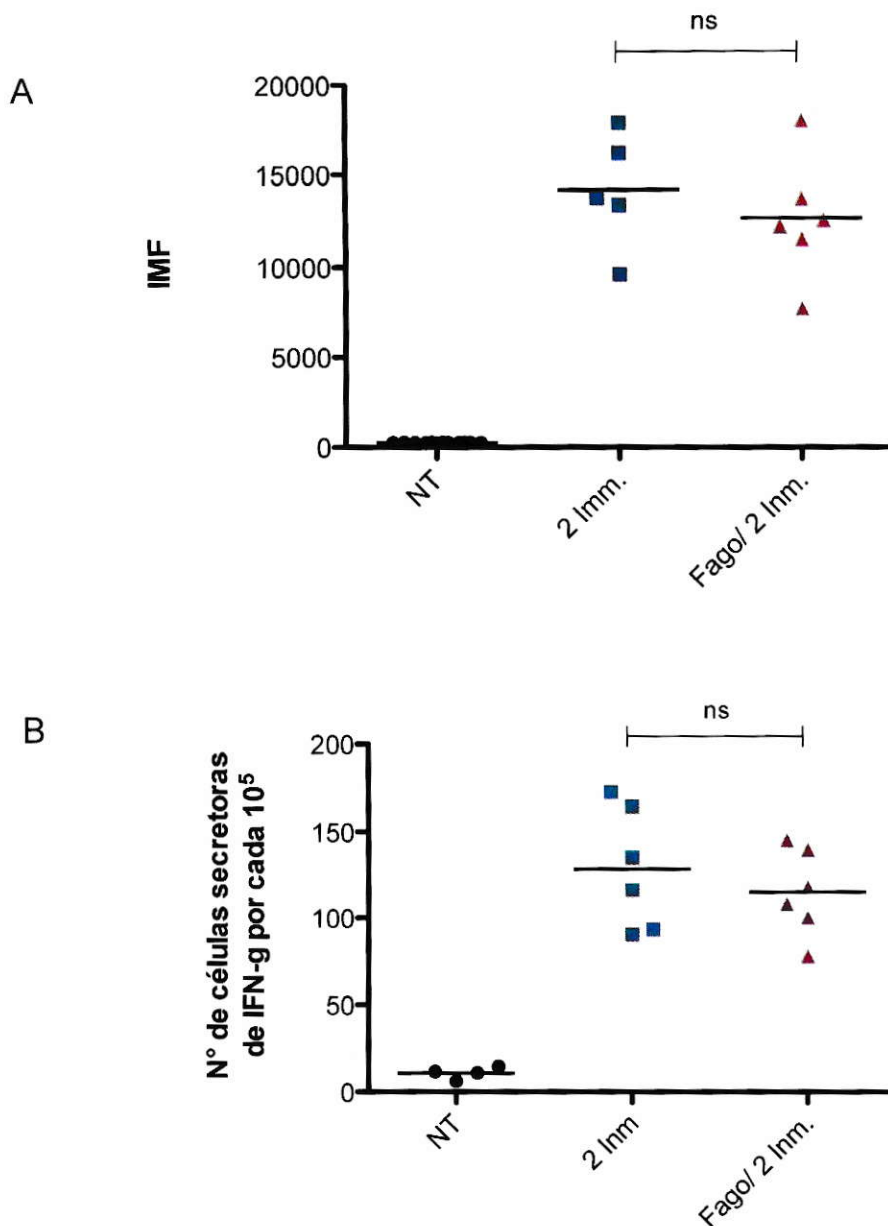


Figura 6. Los fagosomas regulan la respuesta inmune de manera antígeno dependiente. A ratones C57/BL6 se les administró 150 μ g fagosomas BALB/c y luego fueron inmunizados con esplenocitos CBA. Siete días después de la segunda inmunización se tomaron muestras de suero para analizar la producción de aloanticuerpos y se analizó en número de células alorreactivas por ELISPOT. La línea horizontal indica el valor promedio y cada punto equivale a la muestra de un ratón. Se evaluó por un t-test no paramétrico. ns no significativo.

3.4. La administración de fagosomas disminuye la activación de los LT CD4 y CD8 alogénicos.

Una de las primeras respuestas de los LT a la activación por células presentadoras es la secreción de citoquinas, y en especial la IL-2 que genera un aumento de la constante de afinidad del receptor de IL-2 en tres órdenes de magnitud (de K_d 10^{-8} a 10^{-11}). El receptor de IL-2, (IL-2R) esta conformado por 3 subunidades CD25(IL-2R α), CD122 (IL-2R β), y CD132 (γ_c). La expresión de CD25 aumenta en los LT después de la activación con antígenos (Malek & Castro, 2010). Este proceso mantiene la expresión del receptor de alta afinidad y conserva la señalización mientras se mantenga la fuente de IL-2. Por lo tanto, se evaluó el estado de activación de los LT CD4 y CD8 positivos (a través de la expresión de CD25) aislados desde ratones receptores tratados con fagosomas alogénicos antes y después de ser inmunizados. Los esplenocitos de los ratones receptores se activaron por 24 horas con esplenocitos irradiados provenientes de un ratón BALB/c. Se midió por citometría de flujo la expresión de CD25 en linfocitos T CD4 y CD8 de haplotipo b (C57/BL6).

Como se observa en la figura 7, la expresión de CD25 en los LT aumenta después de la activación con esplenocitos BALB/c irradiados, lo que es esperable. Sin embargo, la administración de fagosomas disminuye notablemente la expresión de CD25 en los LT CD8 y CD4, lo que se revierte si se aplica una doble dosis de fagosomas, en acuerdo con los resultados previamente mostrados (Fig.6). Este resultado sugiere que los fagosomas alogénicos regulan el estado de activación de los LT del receptor disminuyendo la respuesta inmune alogénica.

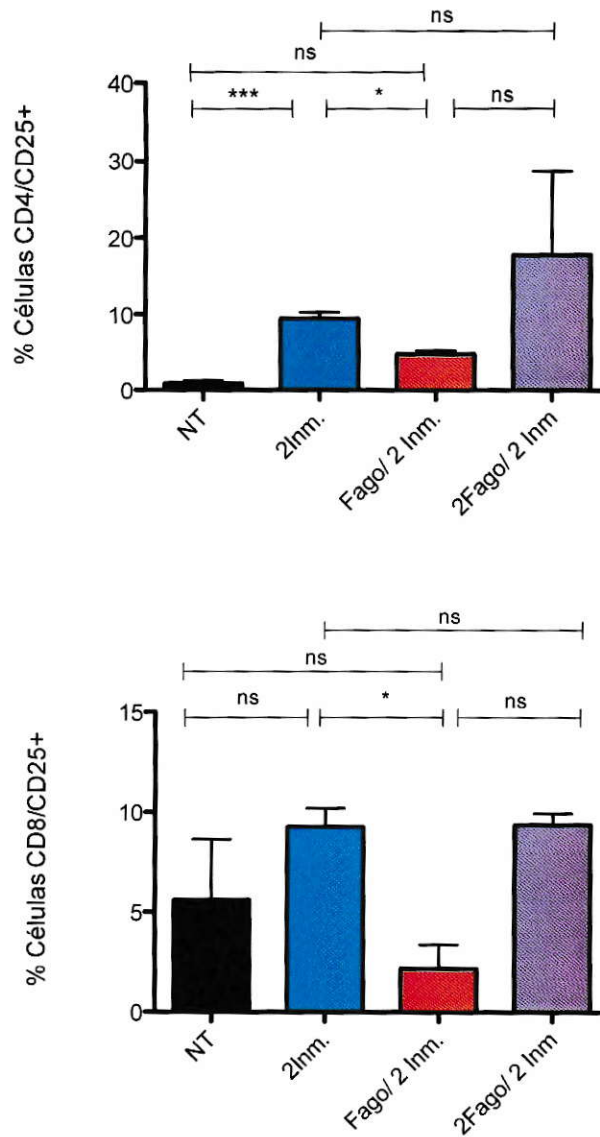


Figura 7. El tratamiento con fagosomas alogénicos inhibe la activación de los LT CD4 y CD8 *in vivo*. A ratones C57/BL6 se les administró 150 (Fago) ó 300 (2Fago) μ g fagosomas y fueron inmunizados 2 veces con esplenocitos BALB/c irradiados. Los esplenocitos fueron aislados y activados con esplenocitos BALB/c. Se evaluó por citometría de flujo la expresión de CD25 en LT CD4 y CD8. Se muestra el promedio de 4 ratones por condición \pm error estándar. Se analizó por t-test no paramétrico. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns no significativo.

4. DISCUSIÓN

El trasplante de órganos es un tratamiento utilizado para reemplazar un órgano defectuoso, incluyendo hígado, corazón, pulmones y páncreas. En el trasplante se necesita suprimir el sistema inmune del paciente con potentes drogas para prevenir el rechazo crónico, pero estas drogas aumentan la posibilidad de sufrir infecciones y desarrollar un cáncer. Por otro lado, la mayoría de los trasplantes sucumben al rechazo crónico que se desarrolla lentamente con los años donde finalmente el órgano se pierde.

La aceptación de un trasplante sin la necesidad del uso de drogas inmunosupresoras de por vida requiere del diseño de estrategias para generar tolerancia específica al injerto manteniendo la competencia del sistema inmune contra las infecciones y el cáncer.

En este trabajo, determinamos que la administración *in vivo* de antígenos del donante en forma de fagosomas disminuye la respuesta inmune alógena de manera antígeno específica en un modelo murino. Esto sugiere, que los ratones receptores tratados con fagosomas tienen un estado de tolerancia que les permite aceptar órganos alógenos.

En otros trabajos, se ha intentado generar un estado de tolerancia en ratones experimentales con otros protocolos de administración de aloantígenos, como el tratamiento con células apoptóticas y con exosomas derivados de DC (Morelli & Thompson, 2007). Las células apoptóticas poseen en su superficie ligandos que son reconocidos por los receptores de las DC que internalizan a las

células apoptóticas y las convierten en células resistentes a la maduración y las mantiene en un estado tolerogénico. (Larreguina & Morelli, 2006). En otro trabajo, se ha observado que esplenocitos del donante irradiados con UVB, generan células apoptóticas que al ser inyectadas de manera intravenosa en conjunto con anticuerpos que bloquean la interacción entre CD40 y CD154 en ratones receptores, genera un aumento en la supervivencia de un trasplante cardíaco alogénico, pues las células apoptóticas son capturadas y procesadas por las DC del bazo (Morelli y cols, 2003). Por otro lado, los exosomas son vesículas secretadas por las DC que transportan moléculas de MHC IIIas cuales pueden ser purificados e inyectados en ratones. Estos exosomas son capturados rápidamente por las DC del donante si afectar en su maduración. La administración sistémica de exosomas en combinación con drogas inmunosupresoras induce la supervivencia de aloinjertos (Peche, 2006).

Tanto el tratamiento con células apoptóticas como con exosomas han demostrado cierta efectividad para la generación de tolerancia antígeno específica, pero la generación de células apoptóticas es complejo pues la apoptosis es un proceso biológico altamente dinámico y difícil de controlar temporalmente, ya que rápidamente puede generar células necróticas que provocan un efecto contrario. Los exosomas, por otra parte, tienen la dificultad de ser difíciles de generar y purificar *in vitro*. La utilización de fagosomas tiene varias ventajas, pues para su producción se requiere de un material biodegradable como el PLGA que permite que los fagosomas sean almacenados y utilizados en el momento que se necesiten. Por otro lado, estas partículas de PLGA pueden ser marcadas con fluoróforos como Alexa 647, lo cual permitiría marcar y seleccionar a los fagosomas por tamaño o por cantidad de antígenos que transportan a través de *cell sorter*. Recientemente se está evaluando en nuestro laboratorio esta estrategia para generar una preparación

de fagosomas reproducibles, libre de debris celular. En este trabajo los fagosomas fueron generados a partir de DC con un fenotipo inmaduro (Fig. 2), lo que genera fagosomas transportadores de membrana que contienen antígenos alogénicos y otras moléculas que les confiere la capacidad de inducir tolerancia.

En trabajos anteriores del laboratorio se observó que los fagosomas alogénicos son activamente incorporados a las DC transformándolas en DC resistentes a la maduración después de la estimulación con LPS (Ureta y cols, 2007; Ramírez, 2009). Por esta razón, se administró de manera intravenosa DC del receptor cargadas con fagosomas del donante en un modelo de inmunización alogénica *in vivo*, pero con este tratamiento no se observó una disminución o un aumento en la producción de aloanticuerpos, por lo que esta estrategia de regulación de la respuesta inmune fue descartada (datos no mostrados). Por lo tanto, la utilización de fagosomas inyectados directamente fue propuesto como un método para la generación de tolerancia periférica. La administración de una única dosis de fagosomas disminuyó significativamente en el título de aloanticuerpos (Fig. 5A) y el número de células alorreactivas (Fig. 5B), sin alterar la respuesta inmune contra otros antígenos (Fig. 6), lo que sugiere que los fagosomas generan en el ratón un estado de tolerancia operacional, donde se suprime la respuesta inmune contra los antígenos del donante, pero se mantiene la respuesta inmune contra otros antígenos.

También observamos que a mayores concentraciones de fagosomas aumentan la respuesta inmune alogénica (Fig. 5A/B), mientras que a bajas concentraciones disminuyen la respuesta inmune celular y humoral. Además se ha visto que los fagosomas llegan en 48 horas al bazo y son capturados por las DC que mantienen su fenotipo (datos no publicados), por lo que suponemos que estos

antígenos son procesados y presentados a linfocitos T alorreactivos. Consideramos que en un contexto no inflamatorio y con bajas dosis de fagosomas, las células dendríticas cargadas con fagosomas sería capaces de generar a partir de LT CD4+ CD25-, LT reg antígeno específicos capaces de suprimir la respuesta inmune alogénica contra las células de un injerto alogénico, pero esto no ha sido demostrado pues no fue posible generar linfocitos T reg con DC cargadas con fagosomas alogénicos en cultivos (datos no mostrados). Por otra parte, tampoco hemos evaluado si los propios fagosomas funcionan directamente como vesículas que presenten aloantígenos y que regulen la respuesta inmune alogénica al interactuar directamente con LT.

En la figura 7, se observa que la administración de fagosomas *in vivo* disminuye la activación tanto de LT CD4 y LT CD8, pues disminuye la expresión de CD25 en ambas poblaciones celulares, lo que sugiere un efecto anérgico de los fagosomas en los LT, pues se sabe que en la anergia existe una disminución de la secreción de IL-2 en LT, los que lleva a una desregulación del receptor (Lechler y cols, 2001), pero la aseveración de que los fagosomas provocan anergia en los LT debe ser estudiada con más detalle.

El mecanismo por el cual los fagosomas regulan el alorreconocimiento y la respuesta inmune alogénica no pudo ser dilucidado en este trabajo, pero sabemos que los fagosomas generados a partir de DC son vesículas que presentan antígenos y entregan aloantígenos a las DC de manera no inflamatoria, estos antígenos podrían ser entregados a las células dendríticas a través del traspaso de membranas como en el alorreconocimiento semidirecto.

Sería interesante evaluar la posibilidad que la administración de fagosomas

permita la anidación de un trasplante de médula ósea sin la utilización de medios ablativos como la irradiación corporal total o parcial, pues si se reduce la necesidad de irradiación, el trasplante de médula ósea podría ser implementado como un proceso clave para inducción de tolerancia central para trasplantes alogénicos mientras que los fagosomas producirían tolerancia periférica, lo que aumentaría las posibilidades de evitar el rechazo y disminuir la dosis o definitivamente eliminar el uso de drogas inmunosupresoras.

Finalmente, se puede concluir que la incorporación de antígenos alogénicos en forma de fagosomas producidos con perlas de PLGA generaría un estado de tolerancia periférica *in vivo* que podría ser utilizado como un pre-tratamiento para el trasplante de órganos sólidos y/o de células hematopoyéticas. Esto representa una nueva estrategia no farmacológica para regular la respuesta inmune alogénica.

5. CONCLUSION

1. Las células dendríticas inmaduras diferenciadas a partir de precursores hematopoyéticos del donante incorporan micropartículas de PLGA sin alterar su estado de activación.
2. Los fagosomas son capaces de disminuir la respuesta inmune alogénica tanto humoral como celular *in vivo*.
3. El efecto inmunorregulador de los fagosomas alogénicos depende de la dosis inyectada.
4. Los fagosomas actúan disminuyendo la respuesta inmune de manera antígeno específica, sin alterar la respuesta inmune contra antígenos de otra cepa.
5. Los fagosomas podrían ser utilizados como un pretratamiento a un trasplante de médula ósea o de órganos sólidos para modular la respuesta inmune.

6. REFERENCIAS

- Banchereau J, Briere F, Caux C et al. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767–8.
- Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235.
- Breloer, Fleischer 2008. CD83 regulates lymphocyte maturation, activation and homeostasis. *Trends in immunology*, 29:186-194.
- Czerkinsky C, Nilsson L, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A 1983. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 65:109–21.
- Elgueta R, Benson Micah J., De Vries Victor C., Wasiuk Anna, Guo Yanxia, Noelle Randolph J. 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunological Reviews* 229: 152–172.
- Felix, N. J., P. M. Allen. 2007. Specificity of T-cell alloreactivity. *Nat Rev Immunol* 7:942-53.
- Gad HA, El-Nabarawi MA, Abd El-Hady SS. 2008. Formulation and Evaluation of PLA and PLGA In Situ Implants Containing Secnidazole and/or Doxycycline for Treatment of Periodontitis. *AAPS PharmSciTech*
- Gleisner A. 2010. Modulación de la respuesta inmune por células apoptóticas en combinación con vitamina D3. Seminario de título de Ing. en biotecnología Molecular.
- Gregori, S. Casorati M., Amuchastegui S., Smiroldo S., Davalli A. Adorini L. et al. 2001. Regulatory T cells induced by $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J. Immunol.* 167: 1945–1953.
- Grossman WJ. 2004. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 104:2840.
- Hackstein H, Taner T, Zahorchak AF et al. 2003. Rapamycin inhibits IL-4-induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo.

Blood 101: 4457–4463.

Hackstein H, Thomson AW. 2004. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol.* 4: 24–35.

Hogquist K., Baldwin T. A. and Jameson S. C. 2005. Central tolerance: learning Self-control in the thymus. *Nature imm reviews.* 5: 772 782.

Joffre, Santolaria, Calise, Al Saati, Hudrisier, Romagnoli & van Meerwijk. 2008. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nature Medicine* 14:

Keir, M. E., M. J. Butte, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 677–704.

Kresnsky A, Pober J. 2001. Immunologic frontiers of trasplantation. *Immunity* 14: 345-346.

Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F.R., Miller, J.F., and Heath, W.R. 1997. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8+T cells. *J. Exp. Med.* 186: 239–245.

Larregina, A. T. & Morelli, A. E. 2006. Handbook of Dendritic Dells: Biology, Diseases, and Therapies 591–618.

Larsen, C. P. et al. 1996. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 381:434–438.

Lechler R, Sykes M, Thomson A, Turka L. 2005. Organ transplantation-how much of the promise has been realized?. *Nat Medicine* 11: 605-611.

Li X, Strom T, Turka L, Wells A. 2001. T cell death and transplantation tolerance. *Immunity*, 14:407-406.

Libby & Pober. 2001. Chronic rejection, *Immunity* 14 387-397.

Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66:807-815.

Lowry, R.P. 1996. DTH-induced tissue injury. In *Transplantation, The clinical Biology: Cellular and Molecular Aspects Philadelphia: Lippincott Raven.* 33:487–502.

Lyson, T., Ermel, L.D., Belshaw, P.J., Alberg, D.G., Schreiber, S.L., and Victor, R.G.

1993. Cyclosporine- and FK506-induced sympathetic activation correlates with calcineurin-mediated inhibition of T-cell signaling. *Circ. Res.* 73:596–602.

Malek, Castro. 2010. Interleukin-2 Receptor Signaling: At the Interface between Tolerance and Immunity. *Immunity Rev* 33:153-165.

Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, et al. 2003. CD4+CD25+ TR cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 197:111.

Matzinger, P., and Anderson, C.C. 2001. Immunity or tolerance: opposite outcomes of microchimerism from skin grafts. *Nat. Med.* 7, 80–87.

Moore, C., D. Sauma, et al. 2010. Dendritic cells and B cells cooperate in the generation of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) allogeneic T cells. *Transplant Proc* 42: 371-5.

Morelli, A. E. et al. 2003. Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 101:611–620.

Morelli A. E., Thomson A. W. 2007. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol.* 7: 610-621.

Peche, H. et al. 2006. Induction of tolerance by exosomes and short-term immunosuppression in a fully MHC-mismatched rat cardiac allograft model. *Am. J. Transplant.* 6:1541–1550.

Raghavendra C. Mundargi, V. Ramesh Babu, Vidhya Rangaswamy, Pradip Patel, Tejraj M. Aminabhavi 2008. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release* 125:193–209.

Ramírez V. 2009. Efecto de la incorporación de fagosomas en el estado de maduración de células dendríticas. Seminario de título para Ing. en Biotecnología Molecular.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. 1995. Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155:1151–1164.

Sakaguchi, S., Wing, K. & Miyara, M. 2007. Regulatory T cells – a brief history and perspective. *Eur. J. Immunol.* 37 (suppl. 1), S116–S123.

Sprent, Kishimoto. 2001. -The thymus and central tolerance. *Phil.trans.r.soc.lond.B*

356:609-616.

Steinman, R.M., Turley, S., Mellman, I., and Inaba, K. 2000. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 191, 411–416.

Strehlau, J., Pavlakin, M., Lipman, M., Shapiro, M., Vasconcellos, L., Harman, W., and Strom, T.B.. 1997. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 695–700.

Suchin, Langmuir, Palmer, Sayegh, Wells, and. Turka 2001 Quantifying the Frequency of Alloreactive T Cells In Vivo: New Answers to an Old Question *J Immunol*;166:973-981.

Sykes Megan. 2001. Mixed Chimerism and Transplant Tolerance. *Immunity*.14: 417-424.

Taner, Hackstein, Wang, Morelli and Thomson, 2005 Rapamycin-Treated, Alloantigen-Pulsed Host Dendritic Cells Induce Ag-Specific T Cell Regulation and Prolong Graft Survival *American Journal of Transplantation*. 5: 228–236.

Tang Q, Bluestone JA. 2008. The Foxp3+ regulatory T cell: a Jack of all trades, master of regulation. *Nature Immunol* 9:239

Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, et al. 2004. IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* 172:6519.

Turka & Lechler. 2009. Towards the identification of biomarkers of transplantation Tolerance. *Nature reviews* 9:521-526.

von Boehmer, H., Aifantis, I., Gounari, F., Azogui, O., Haughn, L., Apostolou, I., Jaeckel, E., Grassi, F., and Klein, L. 2003. Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol. Rev.* 191, 62–78.

Ureta G, Osorio F, Morales J, Roseblatt M, M.R. Bono M.R, Fierro J.A. 2007. Generation of Dendritic Cells With Regulatory Properties. *Transplantation Proceedings*, 39: 633–637.

Utzig Martin J; Blümke, Martin; Wolff-Vorbeck, Guido; Lang Helmut; Kirste Günter. 1997. Flow cytometry cross-match: A Method for Predicting Graft Rejection *Transplantation* 63(4): 551-554.

Waldmann, H. & Cobbold, S. 2001. Regulating the immune response to transplants. a role for CD4+ regulatory cells? *Immunity* 14: 399–406.

Wang, Pino-Lagos, de Vries, Guleria, Sayegh, and Noelle. 2008. Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T

cells PNAS 105 : 9331–9336.

Wekerle, T., Sayegh, M.H., Hill, J., Zhao, Y., Chandraker, A., Swenson, K.G., Zhao, G., and Sykes, M. 1998. Extrathymic T cell deletion and allogeneic stem cell engraftment induced with costimulatory blockade is followed by central T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 187:2037–2044.

Wing, K. and S. Sakaguchi. 2010. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 11: 7-13.

Zhang, Chung, Bishop, Daugherty, Chute, Kurahara, Lott, Sun, Welcher, and Dong 2006. Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2. *PNAS*, 103:11695–11700.