

UCH-FC
Biotecnología
M623
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

**INFLUENCIA DE IL-4 EN LA FUNCIONALIDAD DE LAS CELULAS
DENDRITICAS**

MEMORIA DE TITULO

ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE

EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS

PARA OPTAR AL TITULO DE

INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

POR

PAULA ANDREA MICHEA VELOSO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA ROSA BONO
CODIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO ROSEMBLATT





“INFLUENCIA DE IL-4 EN LA FUNCIONALIDAD DE LAS CELULAS DENTRITICAS”

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

PAULA ANDREA MICHEA VELOSO.

Dra. María Rosa Bono Merino
Directora Seminario de Título

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'María Rosa Bono Merino', written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. Rosalba Lagos Mónaco
Presidente Comisión

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Rosalba Lagos Mónaco', written over a horizontal line.

Dr. Arturo Ferreira Vigoroux
Corrector

A large, stylized handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Santiago de Chile, Abril 2006

*A Victoria y Rolando,
a quienes admiro mucho,
como padres, personas y amigos*



Todos los cambios, aún los más anhelados, tienen su melancolía, pues lo que dejamos es una parte de nosotros mismos; hay que morir una vida para entrar en otra.
Anatole France

AGRADECIMIENTOS

Ufff! Que cosas han pasado hasta llegar a este punto, cosas buenas y otras no tanto, pero al final puedo decir, con una gran sonrisa, ¡lo logré! y todo lo que he vivido en esta etapa ha sido tremendamente enriquecedor. No lo hubiese logrado sola, así que aprovecho este espacio para agradecer a todos los que participaron en esta ardua tarea.

En primer lugar Gracias a María Rosa y Mario por ser más que “mis jefes”. No solo me apoyaron en lo académico, sino también en lo personal, en esos momentos difíciles. Gracias a todos los *Inmunolab*, partiendo obviamente por el Leito, el papá pollo del lab. Por supuesto Gracias Evita, Camilita, Pamela, Francisco, por hacer las tareas arduas del lab y por el cariño entregado. A los que migraron del lab y me acompañaron en los momentos claves: Karina, Pablo, Fernando, Claudio Cortés, Lily, Carolina, René. A los que conforman el equipo actual Dani, Raúl, Jenny, Gonzalo, Fabi, Ale, Jaime, Joce, Felipe, Pablo, Paz y por supuesto a Alberto y Jorge.

Gracias a Cecilia y Juan' por su preocupación y apoyo.

A mis amigos de la U, Carolina, Claudia, Karen, Karina, Mario y Pabla con quienes pasamos grandes momentos y al club OPA: Andrés, Ale, Karen, Lupe, Raúl, Chuki, Muela, Chili, Omar. Gracias a todos ellos por compartir su entusiasmo por la ciencia y las experiencias de la vida. En especial a Andrés por su cariño, apoyo y comprensión.

A mis grandes amigas desde el lejano colegio IPN, Vale y Caro, gracias por estar siempre presentes.

A mis abuelos que han estado siempre atentos y apoyándome en este recorrido.

A Rodrigo por ser mi hermano mayor ejemplar je je, te quiero mucho hermanito.

Y por último un Gran GRACIAS a quienes les debo todo lo que soy, mis padres, que siempre me han apoyado, han reído, llorado, rabiado (y mucho) conmigo. Me han dado todo para ser feliz. Espero que ahora más que padres seamos grandes amigos.

INDICE GENERAL

<u>AGRADECIMIENTOS</u>	<u>IV</u>
<u>INDICE GENERAL</u>	<u>V</u>
<u>INDICE DE FIGURAS</u>	<u>VI</u>
<u>INDICE DE TABLAS</u>	<u>VII</u>
<u>ANEXO</u>	<u>VII</u>
<u>ABREVIATURAS</u>	<u>VIII</u>
<u>ABREVIATURAS</u>	<u>VIII</u>
<u>RESUMEN</u>	<u>X</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>XII</u>
<u>INTRODUCCION</u>	<u>1</u>
<u>HIPOTESIS</u>	<u>9</u>
<u>OBJETIVO GENERAL</u>	<u>9</u>
<u>OBJETIVOS ESPECIFICOS</u>	<u>9</u>
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	<u>11</u>
<i>ANIMALES</i>	<i>11</i>
<i>CULTIVO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS A PARTIR DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN</i>	<i>11</i>
<i>PURIFICACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS</i>	<i>12</i>
<i>ACTIVACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS</i>	<i>13</i>
<i>CULTIVOS BACTERIANOS</i>	<i>13</i>
<i>AISLAMIENTO DE TIMOCITOS</i>	<i>14</i>
<i>COCULTIVOS DE TIMOCITOS Y CÉLULAS DENDRÍTICAS</i>	<i>15</i>
<i>CITOMETRÍA DE FLUJO</i>	<i>16</i>
<i>PREPARACIÓN DE RNA TOTAL</i>	<i>16</i>
<i>RT-PCR</i>	<i>17</i>

<i>ELISA</i>	18
RESULTADOS	20
FENOTIPO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS OBTENIDAS EN PRESENCIA O AUSENCIA DE IL-4.	22
EFEECTO FUNCIONAL DE IL-4 SOBRE CÉLULAS DENDRÍTICAS ACTIVADAS CON DIVERSOS ESTÍMULOS BACTERIANOS.	25
EL CONJUNTO DE ESTOS RESULTADOS DEMUESTRA QUE IL-4 AFECTA LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN LAS DCs EN FORMA DIFERENCIAL Y QUE IL-4 AFECTA TANTO LA DIFERENCIACIÓN COMO LA ACTIVACIÓN DE LAS DCs. POR OTRA PARTE DEMUESTRAN QUE LA NATURALEZA DEL ESTÍMULO AGREGA OTRA VARIABLE AL SISTEMA.	36
EFEECTO DE IL-4 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS DE RATONES BALBC	36
IL-4 REGULA DIRECTAMENTE LA SECRECIÓN DE IL-12 Y DE IL-10 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.	41
IL-4 INDUCE LA POLARIZACIÓN HACIA TH1 DE LOS LINFOCITOS T AL ACTUAR SOBRE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	44
POSIBLES MECANISMOS DE SECRECIÓN DE IL-2 POR CÉLULAS DENDRÍTICAS.	48
DISCUSION	51
EFEECTO DE IL-4 EN EL ESTADO DE MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.	53
INFLUENCIA DE IL-4 EN LA SECRECIÓN DE IL-12 E IL-10 POR CÉLULAS DENDRÍTICAS.	54
SECRECIÓN DE IL-12 POR CÉLULAS DENDRÍTICAS MADURADAS CON <i>B. CEREUS</i>	56
IL-4 POLARIZA LOS LT HACIA TH1 A TRAVÉS DE SU ACCIÓN SOBRE LA CÉLULA DENDRÍTICA	58
IL-2, UNA CITOQUINA VERSÁTIL FRENTE A LA ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CON LOS DISTINTOS FACTORES BACTERIANOS E IL-4	59
IL-4 INHIBE LA SECRECIÓN DE IL-2 A NIVEL POST-TRANSCRIPCIONAL	61
CONCLUSIONES	64
REFERENCIAS	66

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. GENERACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS A PARTIR DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN.....	21
FIGURA 2. EFECTO DE IL-4 EN EL ESTADO DE MADURACIÓN DE DCs PROVENIENTES DE RATONES C57BL/6	23
FIGURA 3. EFECTO DE IL-4 EN EL LINAJE CELULAR DE DCs OBTENIDAS DE MÉDULA ÓSEA.	24
FIGURA 4. EFECTO DE IL-4 EN EL ESTADO DE MADURACIÓN DE DCs ACTIVADAS CON ESTÍMULOS BACTERIANOS.....	26

FIGURA 5. EFECTO DE IL-4 EN EL PATRÓN DE CITOQUINAS SECRETADAS POR DCs ACTIVADAS CON DIVERSOS ESTÍMULOS BACTERIANOS.	29
FIGURA 6. EFECTO DE IL-4 EN EL PATRÓN DE CITOQUINAS SECRETADAS POR DCs ACTIVADAS CON DISTINTAS BACTERIAS.	31
FIGURA 7. EFECTO EN LA SECRECIÓN DE IL-2 DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE IL-4 DURANTE LAS ETAPAS DE DIFERENCIACIÓN O ACTIVACIÓN DE LAS DCs.	33
FIGURA 8. EFECTO EN LA SECRECIÓN DE IL-12 DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE IL-4 DURANTE LAS ETAPAS DE DIFERENCIACIÓN O ACTIVACIÓN DE LAS DCs.	34
FIGURA 9. EFECTO EN LA SECRECIÓN DE IL-10 DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE IL-4 DURANTE LAS ETAPAS DE DIFERENCIACIÓN O ACTIVACIÓN DE LAS DCs.	35
FIGURA 10. EFECTO DE IL-4 EN EL ESTADO DE MADURACIÓN DE DCs PROVENIENTES DE RATONES BALBc	37
FIGURA 11. COMPARACIÓN DEL PATRÓN DE CITOQUINAS PRODUCIDAS POR DCs ACTIVADAS PROVENIENTES DE RATONES C57BL/6 (Th1) VS. RATONES BALBc (Th2).....	40
FIGURA 12. EFECTO DE IL-4 EN EL ESTADO DE MADURACIÓN DE DCs PROVENIENTES DE RATONES KO IL-4R α	42
FIGURA 13. EFECTO DE IL-4 EN EL PATRÓN DE CITOQUINAS SECRETADAS POR DCs DE RATONES KO IL-4R α ACTIVADAS CON DIVERSOS ESTÍMULOS.....	43
FIGURA 14. ESQUEMA DE ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T TRANSGÉNICOS CON DC DIFERENCIADAS Y ACTIVADAS CON O SIN IL-4	46
FIGURA 15. LT COCULTIVADOS CON DCs DIFERENCIADAS Y ACTIVADAS EN LA PRESENCIA DE IL-4 PRODUCEN IFN- γ	47
FIGURA 16. EFECTO DE IL-4 EN LA EXPRESIÓN DEL RNAm DE IL-2 EN DCs ACTIVADAS.....	49

INDICE DE TABLAS

TABLA I. CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS SECRETADAS POR DCs PROVENIENTES DE RATONES C57BL/6 ACTIVADAS CON DIFERENTES ESTÍMULOS BACTERIANOS.....	28
TABLA II. CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS SECRETADAS POR DCs PROVENIENTES DE RATONES BALBc ACTIVADAS CON DIFERENTES ESTÍMULOS BACTERIANOS.....	39

ANEXO

ANEXO 1. EFECTO CsA EN EL PATRÓN DE CITOQUINAS SECRETADAS POR DCs ACTIVADAS CON DIVERSOS ESTÍMULOS BACTERIANOS.	69
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

ABREVIATURAS

APC	:	Célula presentadora de antígeno
CsA	:	Ciclosporina A
DC	:	Célula dendrítica
DMEM	:	<i>Dulbecco's modified Eagle's media</i>
DNA	:	Ácido desoxiribonucleico
RNA	:	Ácido ribonucleico
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	:	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FBS	:	Suero fetal bovino
FITC	:	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	:	Factor estimulador de colonias granulocíticas y monocíticas
IL	:	Interleuquina
LB	:	Linfocito B
LPS	:	Lipopolisacárido
LTA	:	Ácido lipoteicoico
LT	:	Linfocito T
Medio LB	:	Medio Luria Broth
MHC-II	:	Complejo principal de histocompatibilidad de clase II
MOI	:	Multiplicidad de infección
NFAT	:	Factor nuclear de células T activadas
NK	:	Natural killer

OLS	:	Órgano linfoide secundario
PAMP	:	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	:	Tampón fosfato salino
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	:	Ficoeritrina
PRR	:	Receptores de reconocimiento de patógenos
RT	:	Transcriptasa reversa
TCR	:	Receptor de linfocito T
Th1/Th2	:	T helper 1/ T helper 2
TLR	:	Receptor de tipo toll
TMB	:	Tetra metil benzidina

RESUMEN

Las células dendríticas (DCs) son elementos claves en el inicio de la respuesta inmune, ya que son las únicas capaces de activar los linfocitos T (LT) vírgenes e inducir así una respuesta inmune efectiva. La DC es capaz de activarse reconociendo patrones moleculares repetidos asociados a patógenos (PAMPs) a través de receptores de reconocimiento de estos patrones (PRR), entre los cuales se encuentra la familia de los TLRs. Así, TLR-4 reconoce principalmente componentes de bacterias Gram-negativas, mientras que TLR-2 reconoce motivos de bacterias Gram-positivas. Una vez activada, la DC es capaz de inducir la activación y polarización de los LT (Th1 o Th2). Entre los factores que pueden modular esta respuesta se encuentran principalmente la naturaleza del patógeno y las citoquinas presentes al momento de la activación del LT. Entre las citoquinas que afectan la polarización de la respuesta inmune se encuentra interleuquina -4 (IL-4) que ejerce su efecto tanto a nivel de la DC como a nivel del LT.

Esta tesis se llevó a cabo con el fin de determinar el efecto de IL-4 sobre la diferenciación de las DCs frente a distintos estímulos bacterianos, y su influencia en la polarización Th1/Th2 de los LT. Con este fin, se utilizaron DCs generadas a partir de médula ósea de ratones C57BL/6 que polarizan la respuesta de los LT preferencialmente hacia Th1 o BALBc que lo hacen hacia Th2. Los resultados muestran que IL-4 induce un porcentaje de DCs de fenotipo más maduro comparado a células diferenciadas en ausencia de IL-4 independiente de la cepa de origen de estas células. Este efecto no se observa en DCs *knock out* para la cadena α del receptor de IL-4 (KO IL-4R α). Además,

demostramos que la presencia de IL-4 durante la diferenciación y activación de las DCs induce una disminución en la secreción de IL-10 acompañada de un aumento en la secreción de IL-12, independiente del estímulo activador de las DCs. Este fenómeno resultó ser dependiente de la unión de IL-4 a su receptor, ya que DCs provenientes de ratones KO IL-4R α , activadas con diferentes estímulos no producen IL-12 y secretan cantidades notables de IL-10. Consecuentemente, observamos que IL-4 a través de su acción sobre la DC induce la secreción de IFN- γ en los LT, polarizando la respuesta hacia Th1, contrariamente a lo que ocurre cuando IL-4 actúa directamente sobre el LT.

Por otra parte, recientemente se demostró que las DCs son capaces de producir IL-2, citoquina esencial para la activación del LT. Por lo tanto, estudiamos el efecto de IL-4 en la producción de IL-2 durante la activación de las DCs. Nuestros resultados demuestran que IL-4 inhibe la secreción de esta citoquina durante la activación de las DCs independiente de la cepa de origen. Además, demostramos que la inhibición de IL-2, mediada por IL-4, ocurre a nivel post-transcripcional y no a nivel de su mRNA. Por último evaluamos el efecto de ciclosporina (CsA), una droga inmunosupresora que inhibe la producción de IL-2 en los LT, y demostramos que esta droga inhibe la secreción de IL-2 en DCs activadas con LPS, pero no en DCs activadas con bacterias vivas.

En conjunto, estos resultados aportan nuevos elementos sobre el efecto de IL-4 en la respuesta inmune, sugiriendo que el microambiente en el cual se encuentra la DC al momento del encuentro con el patógeno podría ser determinante en el tipo de respuesta inmune inducida posteriormente.

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are key elements in the initiation of the immune response since they are able to prime naive T lymphocytes inducing an effective immune response. Dendritic cells are activated after the recognition of *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) on microbes, through receptors called *Pattern recognition receptors* (PRR). Among these receptors we find the Toll-like receptors (TLR) family. Thus, TLR-4 recognizes mainly components of Gram-negative bacteria wall such as lipopolysaccharide (LPS), while TLR-2 recognizes components of Gram-positive bacteria like lipoteichoic acid (LTA). Once DCs are activated, they are able to prime and polarize T lymphocytes to either a Th1 or a Th2 phenotype. Among the factors that modulate this type of response, the nature of the antigen and the cytokines secreted at the moment of T lymphocytes activation are crucial. One of the cytokines that affects importantly the polarization of the immune response is IL-4, since it can act on DCs and T lymphocytes.

The aim of this thesis was to study first, the effect of IL-4 on DCs differentiation, second, the IL-4 effect on the maturation step of these cells induced by different bacterial stimuli, and finally, to determine its influence on the polarization of T lymphocytes to Th1/Th2 phenotype. To this end we generated DCs from bone marrow of C57/BL6 and BALBc mice which present preferentially Th1 or Th2 responses respectively. Our results demonstrate that IL-4 produce DCs with a more mature phenotype compared to cells differentiated in the absence of IL-4, independently from the origin of the DCs. This effect is lost when DCs are produced from α -chain IL-4

receptor knock out mice (KO IL-4R α). Moreover, we demonstrated that the presence of IL-4 during the differentiation and activation of the DCs produces a decrease in the secretion of IL-10 and an increase of IL-12, compared to DCs differentiated in the absence of IL-4, independent of the stimulus used to activate the DCs. This phenomenon was dependent of IL-4 binding to its receptor since DCs from KO IL-4R α activated with all stimulus studied do not produce IL-12 and instead they secrete considerable amounts of IL-10. Consequently, we observe that IL-4 acts over the DCs inducing the secretion of interferon gamma by T lymphocytes, leading to a polarization to Th1, contrary to the known effect of IL-4 acting directly over T lymphocytes.

On the other hand, it has been shown recently that DCs produce IL-2, a cytokine essential for the proliferation and activation of T lymphocytes. Thus, we studied the effect of IL-4 on the production of this cytokine by the DCs. Our results revealed that IL-4 inhibits IL-2 secretion mainly during the activation step in a strain-independent manner. Additionally, we found that IL-2 inhibition is post-transcriptional since IL-2 mRNA level are not altered by IL-4 treatment. Finally, we evaluated the effect on DCs of cyclosporine A (CsA) an immunosuppressive drug that inhibits IL-2 production by T lymphocytes. We observed that CsA inhibits IL-2 secretion of LPS-activated DCs but not if DCs are activated with whole bacteria.

The findings presented here add new data on the role of IL-4 in the immune response and suggest that microenvironmental factors present during pathogen-DC encounter and during T lymphocyte-DC interaction may be determinant for the development of the immune response.

INTRODUCCION

El sistema inmune es el responsable de la defensa de nuestro organismo frente a agentes infecciosos provenientes del medio ambiente, discriminando entre lo ajeno y lo propio. Este sistema se compone de un sistema inmune innato y un sistema inmune adquirido o adaptable. El sistema inmune innato es evolutivamente el más antiguo, presentando la primera barrera de defensa frente a la entrada de patógenos y se conforma principalmente de células epiteliales, células *natural killers* (NK), linfocitos NKT, macrófagos y células dendríticas (Hoffmann, Kafatos et al. 1999). El sistema inmune adquirido, encontrado exclusivamente en los organismos vertebrados, permite un reconocimiento específico para la eliminación del patógeno, y en este proceso participan principalmente los linfocitos T (LT) y los linfocitos B (LB). Esta clasificación no implica una desconexión entre estos dos sistemas, por el contrario, existen distintas vías de comunicación entre ellos. La principal es la generada por las células dendríticas (DCs), que en conjunto con los macrófagos y los LB forman parte del grupo de células presentadoras de antígeno profesionales. Las DCs se encuentran tanto en los tejidos periféricos como en los órganos linfoides secundarios (OLS). Su principal función es sensor en la periferia los patógenos que ingresen al organismo, capturarlos y procesarlos para luego migrar hacia el OLS más cercano donde presentarán péptidos provenientes del patógeno a los LT vírgenes. Los LT específicos para un antígeno, una vez que se encuentran con la DC, pueden activarse, proliferar y diferenciarse para luego migrar al tejido en el cual ocurrió la infección, en un proceso conocido como *homing*, con el fin de eliminar el patógeno. Así, la célula dendrítica es conocida como la célula presentadora

de antígenos por excelencia del sistema inmune, debido a su capacidad única de activar y modular la función efectora de los linfocitos T vírgenes (Banchereau and Steinman 1998). Por otro lado, se le adjudica a las DCs la capacidad de mantener la tolerancia periférica, presentando péptidos propios a los LT en un contexto no inflamatorio, anergizando así al LT, o bien generando LT reguladores (Steinman, Hawiger et al. 2003). Una vez que los LT CD4⁺ son activados por las DCs, estos se diferencian a células Th1 o Th2. Si la activación ocurrió en un medio rico en IL-12 o IL-18 los LT se polarizarán hacia un fenotipo Th1, células capaces de secretar altas cantidades de interferón (IFN)- γ y de activar a los macrófagos, mientras que si los LT se diferencian en un medio rico en IL-4 se polarizarán hacia un fenotipo Th2, y se convertirán en células productoras de IL-4, IL-13, IL-6 e IL-5. La polarización del LT depende principalmente de la naturaleza del antígeno y del microambiente generado en el proceso de activación, donde el tiempo de contacto con la DC, la concentración y afinidad del péptido antigénico influyen en el balance mantenido por las citoquinas (Rogers and Croft 1999). Así la participación de las DCs en la polarización de la respuesta inmune es fundamental, ya que tanto factores de contacto como factores solubles proporcionadas por las DCs y el microambiente influyen directamente en la activación y polarización del LT (Palucka and Banchereau 2002).

Las DCs se renuevan continuamente a partir de células precursoras hematopoyéticas que ocupan la médula ósea. Estas células se pueden subdividir dependiendo de la expresión de los marcadores de superficie, función y ubicación en los tejidos. En humanos se ha descrito dos subtipos principales: DCs mieloides, y plasmacitoides, mientras que en

ratones, las DCs se han subdividido en tres grupos según la expresión de los marcadores de superficie CD8 α , CD4, CD11b y B220/Gr1. En particular, DCs CD8 α ⁺ se encuentran en la corteza del timo y en las áreas T de los OLS, incluyendo las placas de Peyer. Las DCs CD8 α - residen principalmente en el seno marginal del bazo, en la parte subepitelial del domo de las placas de Peyer y en los tejidos periféricos (Pulendran, Smith et al. 1999; Shortman and Liu 2002).

Las DCs residen en forma inmadura en los tejidos periféricos siendo incapaces de inducir la activación de LT vírgenes, pero tienen la capacidad de migrar hacia el OLS al sufrir un proceso parcial de maduración. Este proceso de maduración comprende el aumento en la expresión de moléculas de co-estimulación, tales como CD80, CD86 y CD40, el aumento en la superficie de las moléculas presentadoras de antígenos MHC-I y MHC-II, y una disminución en la capacidad endocítica y fagocítica (Kapsenberg 2003). Además, las DCs inmaduras sufren un cambio en la expresión de algunos de sus receptores de quimioquinas, lo que posibilita su migración hacia el OLS (Sallusto, Schaerli et al. 1998). Durante un proceso infeccioso, las DCs pueden reconocer al patógeno a través de receptores de superficie y madurar durante el trayecto hacia el OLS más cercano. Una vez en el OLS, las DCs maduras activarán LT específicos para el antígeno. Recientemente se ha demostrado que la activación del LT ocurre gracias a citoquinas liberadas por la DC, en particular IL-6 la cual, logra revertir el efecto supresor de los LT reguladores sobre los LT efectores (Medzhitov R, 2003; Pasare and Medzhitov 2004). Este proceso sería dependiente de la activación de la DC a través de una familia de receptores específico, los *toll-like receptors* (TLRs).

Janeway (Janeway 1989) fue el primero en postular la existencia de un grupo de receptores en la superficie de las células presentadoras, capaces de reconocer de manera específica moléculas ausentes en el huésped, esenciales para la función del patógeno. A estos receptores se los denominó PRR (receptores de reconocimiento de patógenos) y a sus ligandos, patrones moleculares conservados del patógeno (PAMP). Algunos de estos PRRs son los receptores de manosa, langherinas, DEC-205 y lectinas, los cuales al unirse a sus ligandos no son capaces de inducir una activación efectiva en la célula (Reis e Sousa 2001). En 1997 se descubrió otra familia de PRRs en mamífero, los *Toll-like receptors* (TLRs) (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997), de los cuales hasta la fecha se han descrito 10 en humanos y 9 en ratones (Janeway and Medzhitov 2002). Estos TLRs son capaces de reconocer motivos de bacterias Gram-negativas, bacterias Gram-positivas, hongos e incluso virus que gatillarían la activación de las células presentadoras de antígenos. Dentro de los más estudiados está el TLR-4 que reconoce principalmente el lipopolisacárido (LPS) de la pared de las bacterias Gram-negativas, y TLR-2 que se acopla a TLR-1 o TLR6 para ejercer su función y reconoce entre otros a lipoproteínas, ácido lipoteicoico (LTA), peptidoglicano de bacterias Gram-positivas, y zymosan componente de la pared de la levadura. TLR-5 reconoce la flagelina, proteína que compone el flagelo de algunas bacterias mientras que TLR-9 reconoce motivos CpG de DNA no metilado presentes principalmente en bacterias (Hacker, Mischak et al. 1998; Medzhitov 2001; Takeda, Kaisho et al. 2003). Estos receptores son capaces de discriminar incluso entre distintas conformaciones del LPS induciendo una respuesta diferencial dependiendo de la naturaleza del lipopolisacárido (Pulendran, Kumar et al. 2001). Por otro lado, durante el reconocimiento del patógeno, las DCs pueden activarse

combinando la unión de varios TLRs distintos, produciendo una respuesta diferente a aquella inducida por los mismos TLRs por separado (Re and Strominger 2004). La estimulación a través de los TLRs gatilla la asociación de la proteína adaptadora MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*) con el fragmento intracelular del receptor, produciendo una cascada de eventos intracelulares que culmina con la translocación al núcleo de la proteína NF- κ B (nuclear factor- κ B) y la inducción de la transcripción de genes blancos (Akira and Takeda 2004), tales como citoquinas pro- y anti-inflamatorias. Se ha descrito una vía alternativa a MyD88 la cual no produce la secreción de citoquinas, pero sí induce el aumento de moléculas co-estimuladoras y presentadoras de antígenos. Estudios en ratones deficientes en MyD88 han permitido demostrar la importancia de los TLRs en la secreción de citoquinas y en la expresión de moléculas de coestimulación en células dendríticas (Pasare and Medzhitov 2004).

Últimamente se han analizado por *microarrays* los genes expresados en DCs luego de la activación por distintos patógenos tanto en ratones (Granucci, Vizzardelli et al. 2001) como en humanos (Hacker, Mischak et al. 1998; Huang, Liu et al. 2001). Estos estudios muestran genes comunes expresados frente a distintos tipos de estímulo, y genes expresados en forma diferencial dependiendo de la naturaleza del patógeno, tales como factores de transcripción y citoquinas. Por otra parte estos estudios han demostrado que la principal citoquina secretada por las DCs luego de la activación por bacterias es IL-12. Esta proteína posee una forma bioactiva, IL-12p70 y una forma inhibitoria natural, el homodímero IL-12p40, ambas secretadas principalmente por células fagocíticas (Trinchieri 2003). También es ampliamente aceptado que IL-12, favorecería la

diferenciación del LT hacia Th1 (Moser and Murphy 2000). IL-10 es otra de las citoquinas secretada por la DC luego de su activación a través de los TLRs, por bacterias o sus componentes. IL-10 posee propiedades inmunosupresoras inhibiendo la maduración de las DCs mediante el bloqueo de la expresión de moléculas coestimuladoras y la inhibición de la producción de IL-12, impidiendo la polarización del LT hacia Th1 por la DC (Caux, Massacrier et al. 1994; Qi, Denning et al. 2003). Es importante destacar el análisis de expresión génica en DCs realizado por Granucci F et al. (Granucci, Vizzardelli et al. 2001), en el cual los autores observan que DCs activadas con *E. coli* expresan y secretan IL-2. La importancia de este hallazgo radica en que hasta ese momento se le atribuía la secreción de esta citoquina exclusivamente a los LT, pero además los autores demuestran, utilizando ratones *knock out* para IL-2, que la secreción de IL-2 por las DCs es esencial en el inicio de la respuesta inmune.

Como se indicó anteriormente, tanto la naturaleza del patógeno como el microambiente donde se localiza la DC, sea este mucosa u órgano linfoide secundario, influyen sobre el fenotipo y el patrón de citoquinas secretadas por las DCs, los cuales a su vez repercuten en la polarización de los LT vírgenes. Sin embargo, ha sido difícil describir la influencia del microambiente sobre la función de las DCs. Este factor debiera ser considerado en los protocolos de generación *in vitro* de DCs. La mayoría de estos protocolos en ratones utilizan células precursoras hematopoyéticas de la médula ósea las cuales son diferenciadas en cultivo en presencia de GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos), obteniendo DCs con un fenotipo relativamente inmaduro. Variaciones de este protocolo son la utilización de GM-CSF derivado de líneas celulares transfectadas con el gen que codifica para esta proteína en reemplazo a la proteína

recombinante (Inaba, Inaba et al. 1992; Winzler, Rovere et al. 1997; Lutz, Kukutsch et al. 1999), o bien la inclusión de IL-4 en el cultivo, lo que aumenta levemente el rendimiento de obtención de las DCs. Incluso se han originado líneas celulares de DCs inmaduras derivadas tanto de médula ósea como de bazo (Granucci, Vizzardelli et al. 2001). Todos estos factores influyen directamente en el fenotipo de la DC y por ende en la función que ejercerá una vez enfrentada a los distintos estímulos.

En esta tesis nos propusimos estudiar el efecto que ejerce IL-4 en la respuesta de las DCs activada con distintos estímulos bacterianos, ya que probablemente esta citoquina esté presente en el microambiente durante la diferenciación o activación de las DCs.

IL-4 es una citoquina producida por linfocitos Th2 de memoria, basófilos, mastocitos, y células NKT, en respuesta a estímulos de activación (Seder 1996; Nelms, Keegan et al. 1999) las cuales podrían interactuar con las DCs en los tejidos periféricos. Estudios anteriores de nuestro laboratorio (Sauma, Michea et al. 2004) muestran que cultivos de DCs generados *in vitro*, en presencia de IL-4 a partir células precursoras de ratones C57BL/6 presentan un fenotipo más maduro que DCs cultivadas en ausencia de esta citoquina. Al estimular estas DCs con LPS en presencia de IL-4, la secreción de IL-12 aumenta considerablemente, mientras que la secreción de IL-2 es inhibida por esta citoquina.

Las vías de señalización de IL-4 han sido estudiadas principalmente en LT CD4+. El receptor de IL-4 (IL-4R) puede encontrarse en varias formas, todas compuestas por la subunidad α de 140 KDa del IL-4R que une IL-4 con alta afinidad (Kd 20 a 300 pM). El receptor de tipo I de IL-4 se compone de IL-4R α asociado a la cadena γ_c , la cual es

compartida además por los receptores de IL-2, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 (Sugamura, Asao et al. 1996) (Habib T, 2002). La homodimerización artificial del IL-4R α también es capaz de generar señales bioquímicas al interior de la célula, pero no se ha demostrado su existencia fisiológica (Nelms, Keegan et al. 1999). Por último, IL-4R α puede unirse a la cadena α del receptor de IL-13 y formar el receptor de tipo II para IL-4, además varias funciones de IL-4 pueden ser sustituidas por la acción de IL-13 en ratones KO para IL-4 (Lutz, Schnare et al. 2002).

Otro factor importante en el desarrollo de una respuesta inmune es el fondo genético de los ratones utilizados. Evidencias de la literatura (Guler, Jacobson et al. 1997; Filippi, Hugues et al. 2003; Alexander and Bryson 2005) muestran que ratones C57BL/6 inducen en LT preferentemente un fenotipo Th1 frente a determinadas infecciones, mientras que ratones BALBc inducen un fenotipo de tipo Th2 no protector frente al mismo estímulo. Por lo tanto existirían propiedades genéticas que influenciarían el tipo de respuesta inmune que se establece.

En conclusión, es importante destacar que al momento de iniciarse una respuesta inmune, son muchas las piezas que participan y determinan en definitiva el tipo de respuesta que se generará. En este aspecto, es de particular interés investigar el papel de IL-4 durante una agresión bacteriana, ya que, como se mencionó más arriba, IL-4 sobre el LT CD4⁺ induce su diferenciación hacia Th2 fomentando una respuesta inmune humoral, mientras que IL-4 a través de su acción sobre las DCs podría inducir una respuesta de tipo Th1 tal como lo muestran nuestros resultados, promoviendo la actividad citotóxica de los LT CD8⁺.

HIPOTESIS

El efecto de IL-4 sobre las células dendríticas depende de la naturaleza del antígeno que las estimula, de componentes genéticos propios de la cepa de ratón de la cual provienen las células dendríticas y del estado de diferenciación de las DCs. En consecuencia esto afectaría la polarización de la respuesta inmune.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de IL-4 sobre las células dendríticas activadas por diferentes estímulos bacterianos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Comparar el estado de maduración de DCs diferenciadas en presencia o ausencia de IL-4.
- Analizar el efecto de IL-4 en el estado de maduración y en el patrón de citoquinas secretadas por DCs activadas con estímulos bacterianos purificados y bacterias vivas.
- Estudiar el efecto de IL-4 durante las etapas de diferenciación y activación de las DCs, a través del patrón de secreción de citoquinas de estas células.

- Comparar la respuesta frente a IL-4 de DCs provenientes de ratones C57BL/6 (fenotipo Th1) y BALBc (fenotipo Th2).
- Estudiar la maduración y el patrón de secreción de citoquina en DCs activadas provenientes de ratones KO IL-4R α .
- Analizar la polarización de LT cocultivados con DCs diferenciadas y activadas en presencia de IL-4.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6 (H2^b), ratones BALBc (H2^d), ratones KO para la cadena α del receptor de IL-4 (H-2^d) y ratones F1 cruce entre ratones AND (H2^b) y B10.BR (H2^k), cuyos LT transgénicos para el TCR ($V\alpha 11^+V\beta 3^+$) reconocen específicamente el péptido C-terminal del citocromo c de paloma (PCC₈₇₋₁₀₄) presentado en un contexto de MHC-II IE^k. Todas las cepas se obtuvieron de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EE.UU.) y fueron posteriormente mantenidas en un vivero higienizado.

Cultivo de células dendríticas a partir de médula ósea de ratón

Se obtuvieron células precursoras hematopoyéticas a partir de médula ósea del fémur y tibia de ratones C57BL/6, BALBc, KO IL-4R α y F1 de 2 a 4 meses de edad. Luego de sacrificar los ratones mediante sobredosis de éter, se perfundió la médula ósea con RPMI. La médula ósea se disgregó por agitación fuerte hasta obtener una suspensión celular homogénea que fue centrifugada a 300 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Con el fin de lisar los glóbulos rojos, las células se resuspendieron en 1 ml de una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 10 mM, Na₂EDTA 0,1 mM, pH 7,2-7,4) y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 20 ml de RPMI, y las células se centrifugaron a 300 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendieron a 1 x 10⁶ células/ml en

RPMI + 10% FBS (GIBCO BRL, Life Technologies, Bethesda, MD, EE.UU.) suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, gentamicina 50 µg/ml (GIBCO BRL, Life Technologies, EE.UU.) y GM-CSF 10 ng/ml (BD PharMingen, San Diego, CA, EE.UU.). En algunos casos, se agregó 1 ng/ml de IL-4 (BD PharMingen, EE.UU.) o 750 ng/ml de Ciclosporina A (CsA) (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.). Las células se distribuyeron en placas de 24 pozos (1 ml/pozo) y se incubaron a 37°C en 5% CO₂ por 5 días. Al segundo y cuarto día, 75% del sobrenadante del cultivo se reemplazó por medio fresco que contenía GM-CSF, GM-CSF más IL-4 o GM-CSF más CsA, según se señale.

Purificación de células dendríticas

Con el fin de enriquecer la población celular en DCs, al quinto día de cultivo las células se recolectaron e incubaron por 15 minutos a 4°C con 5 µl de anticuerpo anti-CD16-CD32 de ratón (Fc Block de ratón, BD PharMingen) en 500 µl de suero normal de cabra (GIBCO BRL, Life Technologies, EE.UU.). Luego, las células se centrifugaron a 300 x g por 5 minutos, diluidos en 300 µl de tampón MACS (PBS + 2 mM EDTA + 5% FBS) y se incubaron con 30 µl de anticuerpo monoclonal anti-CD11c de ratón acoplado a microesferas magnéticas (clon N418, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), por 20 minutos a 4°C con agitación rotatoria. Luego las células se lavaron con 1ml de tampón MACS y se resuspendieron en 500 µl de tampón MACS. Esta suspensión celular se sometió a una selección positiva con un imán (VarioMACS) y columna magnética

(Columns LS; Miltenyi Biotec, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Finalmente se recolectó la fracción positiva para CD11c, que contiene DCs con una pureza de alrededor del 95%, determinado mediante citometría de flujo.

Activación de células dendríticas

Las células dendríticas purificadas se centrifugaron a 300 x g a 4°C por 5 minutos y se resuspendieron a 4×10^6 células/ml en 250 μ l de RPMI + 10% FBS suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 μ g/ml, gentamicina 50 μ g/ml y GM-CSF 10 ng/ml. En algunos casos, se agregó además 1 ng/ml de IL-4 o 750 ng/ml de CsA. Las células dendríticas se activaron con los siguientes estímulos; LPS purificado de *Salmonella typhosa* 100 ng/ml, LTA purificado de *Streptococcus sanguis* 10 μ g/ml, (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, EE.UU.), o con las bacterias vivas: *Escherichia coli* 10 moi, *Salmonella typhimurium* 10 MOI, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus epidermidis* 5 moi. La activación se llevó a cabo durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂, luego de la cual se recuperaron las células y se recolectaron los sobrenadantes para el análisis de citoquinas mediante ELISA de captura. Las células fueron evaluadas en cuanto a su estado de madurez y en algunos casos se extrajo RNA total a partir de los cuales se determinó la expresión del mRNA de IL-2 por RT-PCR.

Cultivos bacterianos

Las bacterias que se utilizaron en la activación fueron: *Escherichia coli* cepa VCS257, *Salmonella typhimurium* cepa LT2, *Bacillus cereus* sp. (Facilitadas por la Dra. Rosalba

Lagos, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile) y *Staphylococcus epidermidis* (Facilitada por el Dr. Nicolás Guiliiani, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile). Las bacterias fueron preacondicionadas colocando una colonia aislada de cada cepa en 5 ml de medio LB e incubándola toda la noche a 37°C. Posteriormente, se colocaron estos cultivos en matraces conteniendo medio LB en una razón de 1:50 y se incubaron por 2 horas a 100 rpm y 37°C. La concentración bacteriana se estimó midiendo la densidad óptica de los cultivos a una longitud de onda de 600 nm, en un espectrofotómetro 6405 UV/Vis (Jenway Limited, Dunow, Inglaterra). 10×10^8 células de los cultivos de *E. coli* o *S. typhimurium*, y 5×10^8 de los cultivos de *B. cereus* y *S. epidermidis* se centrifugaron a $5000 \times g$ por 15 minutos a 4°C, y se resuspendieron en 1 ml de medio LB. Los cultivos se mantuvieron a 4°C hasta su utilización. 10 µL de cada cultivo fueron utilizados para activar 1×10^6 DCs, determinando una multiplicidad de infección (MOI) de 10 para *E. coli* y *S. typhimurium* y 5 para *B. cereus*. Se confirmó la MOI contando las unidades formadoras de colonia (UFC) en una titulación en placas de Agar LB (Bacto-Agar, Becton Dickinson, MD, EE.UU.) para cada cultivo bacteriano utilizado para activar las DCs.

Aislamiento de timocitos

Los timocitos se aislaron a partir de ratones F1. El timo se disgregó con tijeras y se homogenizó pasándolo a través de una malla metálica de 90 µm. Posteriormente, la suspensión celular se enriqueció en timocitos por selección negativa utilizando el anticuerpo monoclonal anti-IA^b (clon KH74, BD PharMingen, EE.UU.) para eliminar

células presentadoras de antígenos. Para esto, las células se incubaron por 30 minutos a 4°C con 1 µl del anticuerpo por cada 5×10^5 células presentadoras (considerando que cerca de un 10% de la población total de células extraídas del timo son células presentadoras) en 2 ml de medio DMEM + 2% FBS suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 50 µg/ml. Las células se lavaron y resuspendieron en 500 µl de tampón MACS y se incubaron con 40 µl del anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con perlas magnéticas (Miltenyi Biotec, Alemania) por cada 100×10^6 células, por 15 minutos a 4°C con agitación rotatoria. Una vez finalizada esta incubación, las células se lavaron y se resuspendieron en 1 ml de tampón MACS para luego purificarlas utilizando un magneto (VarioMACS) y columnas de selección negativa (Columns CS, Miltenyi Biotec, Alemania) según las instrucciones del fabricante. De esta manera se recolectó la fracción I-A^b negativa que contiene sobre 95% de timocitos medido en base a la expresión de Vα11 por citometría de flujo.

Cocultivos de timocitos y células dendríticas

Para la mayoría de los experimentos, las DCs activadas y los timocitos derivados de ratones F1 (AND x B10.BR) se cocultivaron a una razón de 1: 5 en placas de 24 pozos en RPMI + 10% FBS suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, gentamicina 100 µg/ml y GM-CSF 10 ng/ml. Las DCs que fueron previamente activadas con bacterias por 4h se lavaron y esterilizaron en RPMI + 10% FBS suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 300 U/ml, estreptomicina 300 µg/ml. Para activar los linfocitos T, se agregó a los cocultivos el péptido PCC₈₇₋₁₀₄ a una concentración de 2,5 µM en un volumen final de 2 ml. Las células se cocultivaron

por 5 días a 37°C y 5% CO₂. Al tercer día de cocultivo, se reemplazó la mitad del medio de cada pozo por medio fresco sin péptido. Al cabo de 3, 4 y 5 días se cuantificaron los niveles de IFN- γ presentes en los sobrenadantes de los cocultivos mediante ELISA de captura.

Citometría de flujo

Las células dendríticas y esplenocitos se resuspendieron en medio DMEM + 2% FBS y se incubaron por 20 minutos a 4°C con las diferentes combinaciones de anticuerpos conjugados directamente con un fluorocromo. Luego de esta incubación, las células se lavaron y resuspendieron en PBS + 2% FBS para ser analizadas por citometría de flujo utilizando un FACScan (BD Biosciences, Mountain View, CA) y el software CELLQuest. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales de PharMingen: anti-CD86-FITC (clon GL1), anti-CD80-FITC (clon 6-10A1), anti-I-A/I-E -FITC (clon 2G9), anti-CD11c biotilado (clon HL3), anti-CD11c-PE (clon HL3), anti-CD11b-PE (clon M1/70), anti-CD8 α -FITC (clon 53-6.7), B220 (clon RA3-6B2),

Preparación de RNA total

Se extrajo el RNA total de las DCs activadas utilizando TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), seguido de extracción con cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania). El RNA se precipitó con isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 12 horas a -20°C, luego se lavó con etanol 75% (Merck, Darmstadt, Alemania), se secó

al aire y se resuspendió en H₂O-DMPC (Sigma Chemical CO, St. Louis; MO, EE.UU). El RNA se cuantificó determinando la densidad óptica a 260nm en un espectrofotómetro 6405 UV/Vis (Jenway Limited, Dunow, Inglaterra). La calidad del RNA obtenido se evaluó en un gel de agarosa al 0,8% (W&Z, Winkler Ltda., Santiago, Chile).

RT-PCR

La expresión del RNAm de IL-2 en DCs de ratones C57BL/6 se determinó por RT-PCR. Para esto se incubaron por 10 minutos a 70°C, 3µg de RNA con 500 pmoles de poli-dT en un volumen final de 17 µl, con el propósito de desnaturar el RNA. Posteriormente, se agregaron 8 µl de una mezcla de dNTP (1,25 mM) (Invitrogen, Brasil), tampón de reacción (Tris-HCl 50mM pH 8,3, 375 mM KCl, MgCl₂ 3 mM y 10 mM de dTT) (Promega, EE.UU), inhibidor de RNasa 40 U (RNasin®, Promega Madison, WI, EE.UU) y 200 U/ml transcriptasa reversa (M-MLV-RT, Promega, Madison, WI, EE.UU.), completando un volumen de 23 µl. Para los controles sin transcriptasa reversa se completó el volumen con H₂O-DMPC. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (PTC-150 MiniCycler, MJ Research INC, Watertown, MA, EE.UU.) por 1 hora a 42°C, con un ciclo final de 10 minutos a 65°C para inactivar la enzima. Luego la reacción de PCR se llevó a cabo utilizando 2 µl del DNAc obtenido, 1,5 mM Mg₂Cl (Invitrogen), 200µM c/dNTP, tampón de reacción (200mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM de KCl (Invitrogen), 8 ng/ml de partidores sentido y antisentido y DNA polimerasa 1,25 U (Invitrogen). Los partidores utilizados para la amplificación de IL-2 fueron:

Sentido : ACTTGTGCTCCTTGCAACAGC

Antisentido : CCATCTCCTCAGAAAGTCCACC

El fragmento amplificado producido por esta reacción es de 430 pb. Como control de expresión constitutivo se utilizó el RNAm de β -actina, amplificado con los siguientes partidores:

Sentido : GTGATGATGCCCAGAAAGACC

Antisentido : CTATTGGCTATTGATTGATTGCTGA

El fragmento amplificado producido por esta reacción es de 719 pb. Todos los partidores utilizados en este trabajo fueron comprados a BiosChile (BiosChile, Ingeniería Genética S.A., Santiago, Chile). La reacción se llevó a cabo en un termociclador MiniCycler™ utilizando para IL-2 una etapa inicial de 94°C por 5 minutos, luego 29 ciclos con una etapa de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, una etapa de apareamiento a 60°C por 1 minuto y una etapa de elongación a 72°C por 2 minutos, y por último una etapa final a 72°C por 10 minutos. En el caso de β -actina, se utilizó una etapa inicial a 94°C por 5 minutos, 19 ciclos con una etapa de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, una etapa de apareamiento a 58°C por 45 segundos, y una etapa de elongación a 72°C por 90 segundos, finalmente una etapa a 72°C por 10 minutos. El producto de PCR fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta y digitalizado con una cámara (Kodak DC120 digital science, Rochester, NY, EE.UU.) a partir de un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

ELISA

La concentración de IL-2, IL-12p70, IL-10 e IFN- γ se midió utilizando kits de ELISA de captura (BD PharMingen, EE.UU.). Se utilizaron placas de 96 pozos Immuno-plate

Maxisorp (Nunc, EE.UU) a las cuales se les agregó 100 µl por pozo de una dilución del anticuerpo de captura (1:250 para cada citoquina) en "coating buffer" (NaHCO₃ 0,33 M., Na₂CO₃ 0,66 M., pH 9,5) y se incubaron a 4°C toda la noche. Posteriormente la placa se lavó 3 veces con una solución de lavado (PBS + 0,1% Tween 20 (Sigma, EE.UU)), se bloquearon los sitios libres de la placa agregando 400 µl por pozo de una solución de bloqueo (PBS + 10% FBS) y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con la solución de lavado, luego de lo cual a diferentes pozos se agregó 100 µl de una dilución estándar de citoquina recombinante o sobrenadantes experimentales. Las muestras se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente la placa se lavó 5 veces con la solución de lavado y se incubó con 100 µl del anticuerpo de detección biotinilado y conjugado con avidina-peroxidasa (según indicaciones del fabricante). Al cabo de 1 hora, la placa se lavó 7 veces con la solución de lavado y se agregó 100 µl por pozo de una solución TMB Substrate Reagent Set (BD PharMingen, EE.UU.). Luego de 20 minutos de incubación, la reacción se detuvo agregando 50 µl de H₃PO₄ 1M. La placa se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro Emax Precision Microplate Reader (Molecular Devices, CA, EE.UU.). Los límites de detección para IL-2, IL-12p70, IL-10 e IFN-γ fueron 3,1, 62,5, 31,3 y 31,3 pg/ml respectivamente.

RESULTADOS

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de IL-4 sobre la diferenciación y maduración de las células dendríticas. IL-4 es una citoquina producida por varios tipos celulares, algunos de los cuales como linfocitos B, mastocitos y linfocitos Th2 de memoria podrían encontrarse en los sitios donde ocurren estos procesos (Seder 1996; Nelms, Keegan et al. 1999). IL-4 es ampliamente utilizada en protocolos de generación de DCs, sin embargo no ha sido bien estudiado el efecto de esta citoquina sobre la diferenciación de la DC, excepto por el conocido aumento en el estado de maduración de las DCs, evidenciado por una mayor expresión de moléculas MHC-II y CD86 (Lutz, Suri et al. 2000).

En este trabajo se generaron DCs a partir de médula ósea de ratones C57BL/6, las cuales se diferenciaron con GM-CSF recombinante, citoquina esencial en cualquier protocolo de generación de DCs, en presencia o ausencia de IL-4. Las dosis de las citoquinas fueron aquellas corrientemente reportadas en la literatura para la producción de DCs (Lutz, Suri et al. 2000; Lennon-Dumenil, Bakker et al. 2002). Puesto que estos protocolos permiten un enriquecimiento de entre 20 a 30% en DCs, al final del cultivo se procedió a purificar las DCs mediante aislamiento inmunomagnético con micropartículas conjugadas con un anticuerpo anti-CD11c, un marcador específico de DCs. Esto nos permitió obtener DCs con una pureza cercana al 95%. La Fig.1 muestra un esquema del procedimiento.

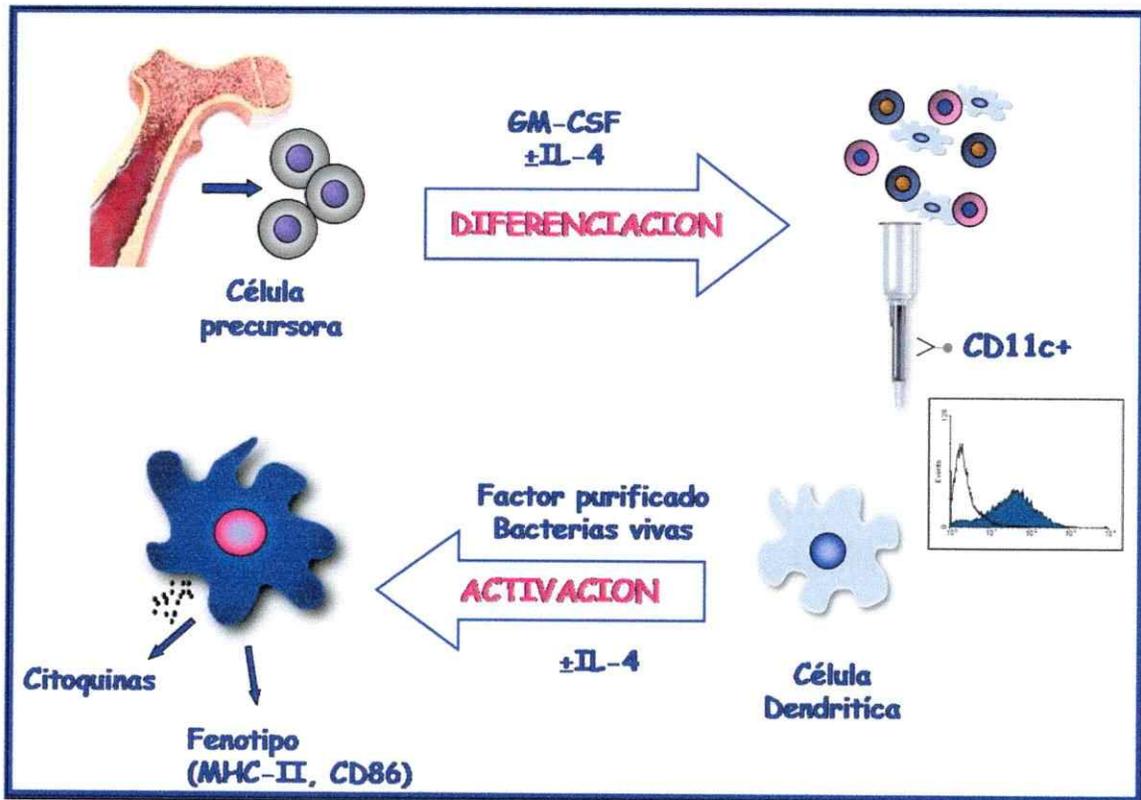


Figura 1. Generación de células dendríticas a partir de médula ósea de ratón.

Células hematopoyéticas provenientes de la médula ósea de ratones C57BL/6, BALBc, KO IL-4R α y F1 fueron diferenciadas con GM-CSF en presencia o ausencia de IL-4. Luego de 5 días de diferenciación, se purificaron las células CD11c⁺ por selección inmunomagnética, obteniendo un 95% de células CD11c⁺ determinado por citometría de flujo. Las DCs fueron activadas en presencia o ausencia de IL-4 con factores purificados bacterianos: LPS o LTA, o con bacterias vivas: *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. cereus* y *S. epidermidis* durante 4h. El estado de madurez de las DCs fue determinado por la expresión de las moléculas MHC-II, CD80 y CD86. La secreción de IL-2, IL-12 e IL-10 producida durante la activación de las DCs se cuantificó a partir de los sobrenadantes de los cultivo mediante ELISA de captura.

Fenotipo de células dendríticas obtenidas en presencia o ausencia de IL-4.

La Fig.2 muestra el análisis por citometría de flujo de DCs obtenidas de médula ósea de ratones C57BL/6. Tal como reportado en la literatura, la presencia de IL-4 durante el proceso de diferenciación de las DCs produce alrededor de un 10% de células con un alto nivel de moléculas MHC-II y una mayor expresión de CD86. Además, analizamos la expresión de CD80 y observamos que IL-4 disminuye en un 10% la población de DCs que expresan este marcador. Cabe destacar que los niveles de expresión de MHC-II permiten visualizar 3 subpoblaciones de DCs (MHC-II bajo, MHC-II mediano, MHC-II alto), mientras que si consideramos la expresión de CD86 y CD80, parecieran existir solo 2 subpoblaciones, aquellas con bajo o mediano nivel de expresión. Por lo tanto la interpretación de estos resultados en la literatura parece más bien errónea ya que no todas las DCs obtenidas en presencia de IL-4 son más maduras que las obtenidas en ausencia de esta citoquina, sino más bien existiría una pequeña población de DCs más madura en la población total y que podemos cuantificar en alrededor de un 10%.

Nuestro paso siguiente fue determinar el linaje celular de las DCs diferenciadas en presencia o ausencia de IL-4. Tal como muestra la Fig. 3, las DCs generadas de médula ósea son de origen mieloide, ya que independiente de la presencia o no de IL-4, todas las DCs generadas expresan la integrina CD11b, y son negativas para CD8 α , marcador característico de DCs de origen linfoide. En la Fig.3 distinguimos además 2 subpoblaciones en base al nivel de expresión de CD11b (CD11b alto, CD11b mediano) y la presencia de IL-4 durante la generación de las DCs aumenta en alrededor de un 15% la proporción de células con un nivel medio de expresión de CD11b.

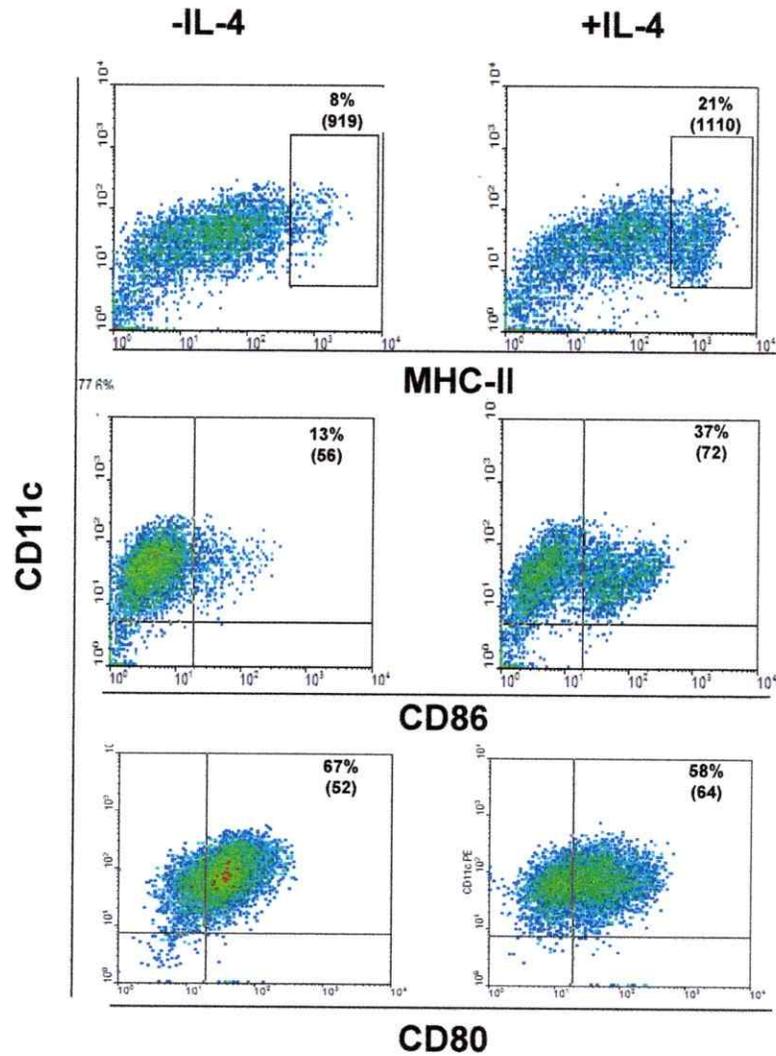


Figura 2. Efecto de IL-4 en el estado de maduración de DCs provenientes de ratones C57BL/6

Análisis por citometría de flujo de DCs obtenidas a partir de precursores hematopoyéticos provenientes de ratones C57BL/6 diferenciadas en presencia o ausencia de IL-4. Se analizó la expresión de MHC-II, CD86 y CD80 de DCs CD11c⁺ recién purificadas. Los gráficos muestran el porcentaje y entre paréntesis la intensidad media de fluorescencia de las poblaciones indicadas en el cuadrante o en la ventana analizada. Los resultados son representativos de 15 experimentos independientes.

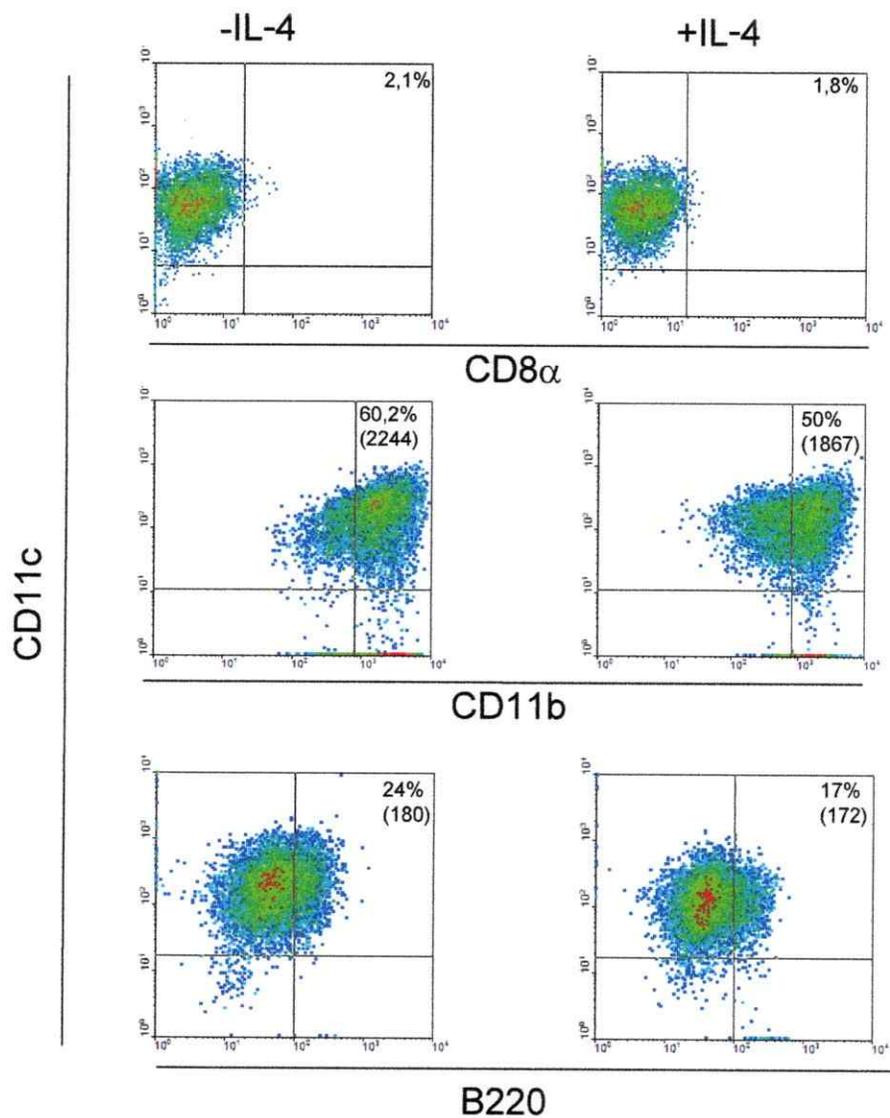


Figura 3. Efecto de IL-4 en el linaje celular de DCs obtenidas de médula ósea.

Análisis por citometría de flujo de las sub-poblaciones de DCs obtenidas a partir de precursores hematopoyéticos provenientes de ratones diferenciados en presencia o ausencia de IL-4. Se analizó la expresión de CD8 α , CD11b y B220 en DCs CD11c⁺ recién purificadas. Los gráficos muestran el porcentaje y entre paréntesis la intensidad media de fluorescencia de las poblaciones indicadas en el cuadrante analizado. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Por otra parte, estudiamos la expresión de B220 (anticuerpo que reconoce la molécula CD45), el cual es normalmente expresado en DCs plasmacitoides. En la Fig.3 observamos 2 subpoblaciones de DCs para el marcador B220 independiente de la presencia o no de IL-4. El conjunto de estos resultados demuestran que en médula ósea existen al menos 2 subpoblaciones de DCs distinguibles por la expresión de marcadores de linaje y maduración.

Efecto funcional de IL-4 sobre células dendríticas activadas con diversos estímulos bacterianos.

Nuestro objetivo siguiente fue determinar si los cambios en la diferenciación de las DCs atribuidos a la presencia de IL-4 tienen un efecto funcional manifestado por cambios en el fenotipo celular y la secreción de citoquinas.

En primer lugar analizamos cambios en el fenotipo de las DCs una vez activadas por 4h con productos bacterianos purificados como LPS y LTA, o bacterias vivas de las cepas *E. coli*, *S. typhimurium* o *B. cereus*. Como ya se mencionó IL-4 puede estar presente tanto en el sitio de diferenciación de la DC como en el sitio de activación o maduración de la DC, por lo tanto realizamos experimentos tomando en cuenta estas diferentes situaciones. En los experimentos mostrados en la Fig. 4, las DCs fueron diferenciadas y activadas en presencia o ausencia de IL-4 durante los 2 procesos. Tal como se observa en esta figura, la activación tanto con LPS como con bacterias *E. coli*, produce un aumento en la expresión de MHC-II, no así en el porcentaje de células MHC-II positivas. Sin embargo, para la molécula de coestimulación CD86, se produce un aumento en la expresión y en el porcentaje de células CD86 positivas, todo esto ocurre tanto en DCs diferenciadas y activadas con o sin IL-4.

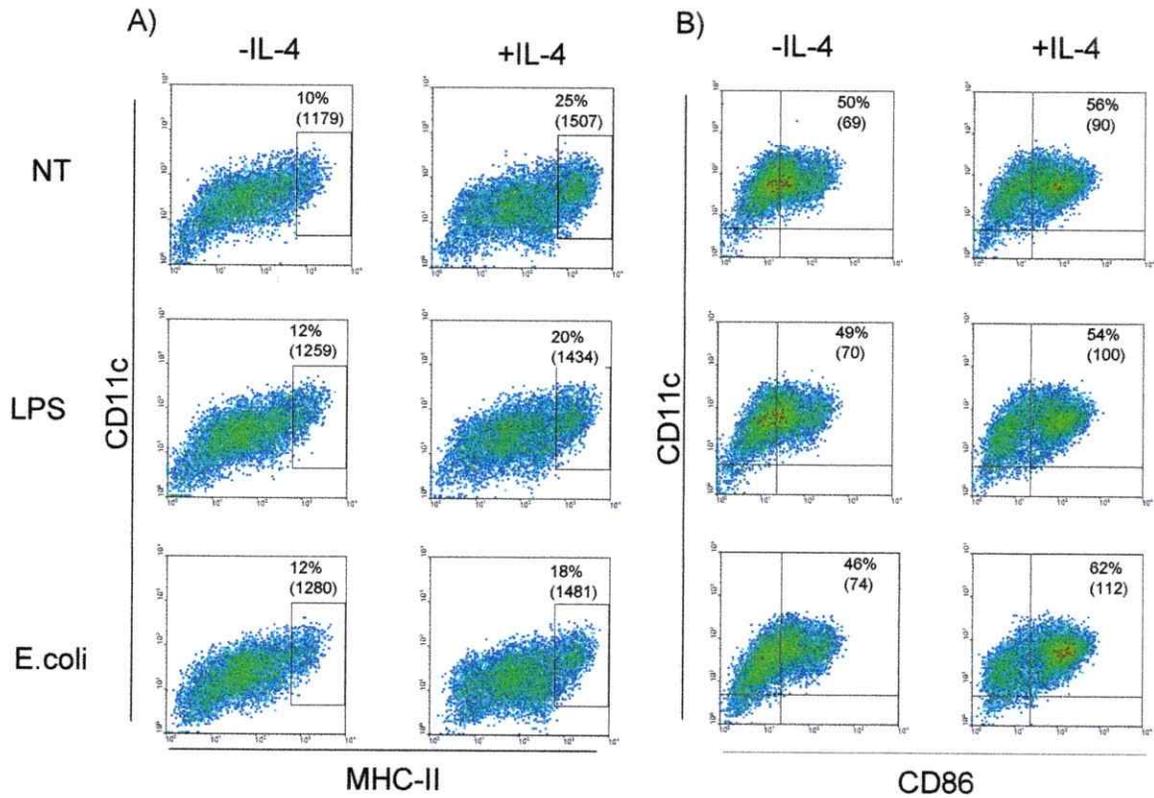


Figura 4. Efecto de IL-4 en el estado de maduración de DCs activadas con estímulos bacterianos.

Análisis por citometría de flujo de DCs obtenidas a partir de precursores hematopoyéticos provenientes de ratones C57BL/6 diferenciados en presencia o ausencia de IL-4 y activadas bajo las mismas condiciones con LPS o *E. coli* durante 4h. Se analizó la expresión de MHC-II A) y CD86 B) de DCs CD11c⁺. Los gráficos muestran el porcentaje y entre paréntesis la intensidad media de fluorescencia de las poblaciones indicadas en el cuadrante o en la ventana analizada. Los resultados son representativos de 12 experimentos independientes.

Además, si comparamos para un mismo estímulo el efecto de IL-4, se mantienen las diferencias encontradas en la diferenciación. Cabe notar que la sola incubación de las DCs por 4h a 37°C produce un aumento en el porcentaje de DCs maduras (comparar DCs no tratadas de la Fig. 4 con Fig.2). En los experimentos realizados con estímulos Gram-positivos (LTA y *B. cereus*) los resultados fueron similares (datos no mostrados). De estos experimentos se recuperaron los sobrenadantes de cultivo obtenidos después de las 4h de estimulación, y se midió la producción de las citoquinas IL-2, IL-12 e IL-10, ya que son citoquinas que podrían tener un efecto en la posterior interacción de las DCs con los linfocitos T. Como se mencionó, el solo hecho de cultivar las DCs por 4h a 37°C muestran cambios fenotípicos de maduración, sin embargo cuando medimos la producción de citoquinas sin otro estímulo adicional, no encontramos producción alguna de las citoquinas analizadas, a excepción de IL-10 donde los niveles encontrados son mínimos comparados a los secretados por DCs activadas con estímulos bacterianos. Por esta razón solo reportamos estos valores en la Tabla I y no en los gráficos que siguen.

Tal como lo habíamos reportado (Sauma, Michea et al. 2004), las DCs producen pequeñas cantidades de IL-2 al ser estimuladas con LPS o LTA y esta secreción de IL-2 es inhibida por la presencia de IL-4 (Fig.5). Por otra parte observamos que al estimular las DCs con bacterias vivas *E. coli* o *B. cereus* se induce una producción 4-5 veces mayor de IL-2, pero a diferencia de LPS o LTA, la presencia de IL-4 aumenta al doble la producción de IL-2 cuando las DCs son estimuladas por *E. coli*, mientras que *B. cereus* no produce un incremento adicional de IL-2, pero en ningún caso inhibe la producción de IL-2. Estos experimentos fueron repetidos al menos 4 veces con resultados similares.

Tabla I. Cuantificación de citoquinas secretadas por DCs provenientes de ratones C57BL/6 activadas con diferentes estímulos bacterianos

Estímulo	Diferenciación	Activación	IL-2	IL-12	IL-10
NT	-	-	<	<	145 ± 97
	IL-4	IL-4	<	<	<
LPS	-	-	25 ± 23	925 ± 243	1533 ± 705
		IL-4	11 ± 6	2404 ± 137	755 ± 358
	IL-4	-	38 ± 15	3007 ± 424	120 ± 57
	IL-4	IL-4	9 ± 8	5654 ± 3396	94 ± 72
LTA	-	-	27 ± 15	1272 ± 553	1822 ± 987
		IL-4	4 ± 5	2900 ± 644	815 ± 597
	IL-4	-	15 ± 2	1167 ± 1047	40 ± 17
	IL-4	IL-4	4 ± 4	3818 ± 1476	80 ± 80
<i>E. coli</i>	-	-	103 ± 19	1427 ± 419	6349 ± 1713
		IL-4	48 ± 6	4640 ± 1789	4673 ± 2313
	IL-4	-	218 ± 49	6047 ± 217	1118 ± 563
	IL-4	IL-4	200 ± 65	16397 ± 3416	895 ± 525
<i>B. cereus</i>	-	-	104 ± 54	13437 ± 6278	6283 ± 1919
		IL-4	38 ± 21	14224 ± 11424	4144 ± 2603
	IL-4	-	87 ± 18	10860 ± 11172	770 ± 111
	IL-4	IL-4	102 ± 19	20017 ± 10650	551 ± 370

< corresponde a niveles de citoquina bajo el límite de detección

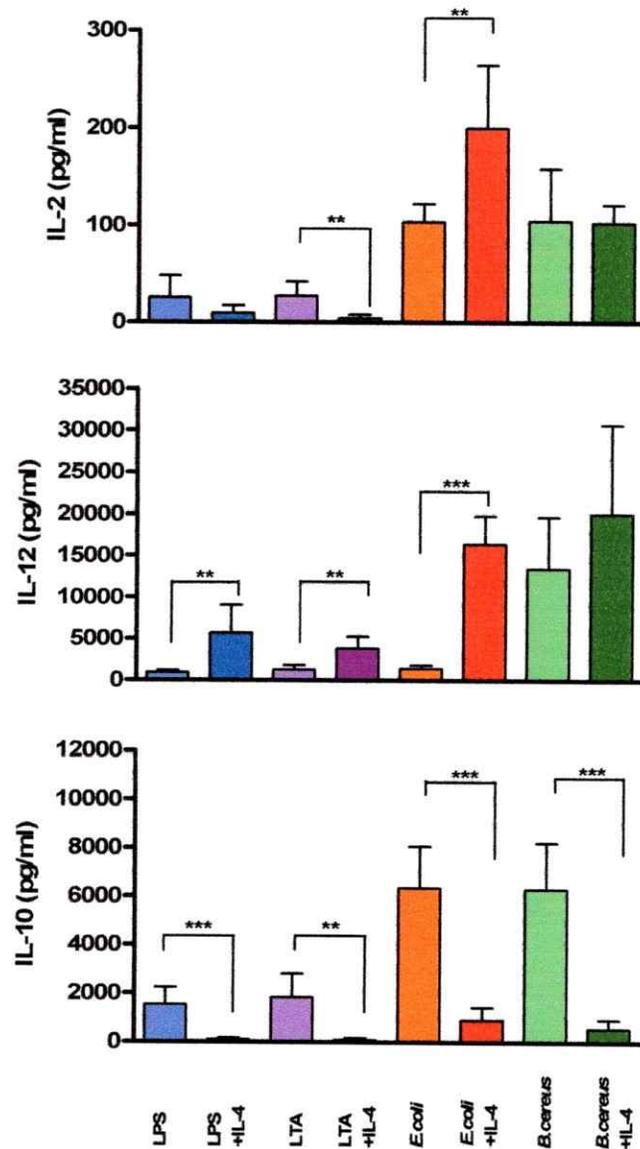


Figura 5. Efecto de IL-4 en el patrón de citoquinas secretadas por DCs activadas con diversos estímulos bacterianos.

DCs de ratones C57BL/6 fueron activadas con LPS, LTA, *E. coli* o *B. cereus* durante 4h en presencia (barras oscuras) o ausencia (barras claras) de IL-4. Los niveles de IL-2, IL-12 e IL-10 presentes en los sobrenadantes se cuantificaron mediante ELISA de captura. Los gráficos muestran el promedio + DE de 4 experimentos independientes. **P<0,01; ***P<0,001

Respecto de la producción de IL-12, estímulos como LPS, LTA o *E. coli* vivas inducen la producción de pequeñas cantidades de esta citoquina comparada a la producida cuando las DCs son activadas con *B. cereus*, donde observamos 10 veces más IL-12. Sin embargo cuando las DCs son activadas en presencia de IL-4, se produce un notable aumento en la producción de IL-12 con todos los estímulos estudiados.

En el caso de IL-10 los resultados son más simples de interpretar ya que cualquiera sea el estímulo aplicado a las DCs, solo se produce IL-10 en ausencia de IL-4 y al igual que para IL-2 e IL-12, la producción de citoquinas es siempre mayor cuando el estímulo es bacterias vivas.

Con el objetivo de determinar si los efectos observados son generales incluimos en este estudio otra cepa de bacterias Gram-negativa (*S. typhimurium*) y otra Gram positiva (*S. epidermidis*). Como muestra la Fig.6 en la cual se comparan solo estímulos bacterianos, se observa que en general aunque en diferente medida la presencia de IL-4 aumenta la secreción de IL-12 e inhibe la secreción de IL-10, pero no existe un patrón claro de acción sobre la IL-2.

Estos resultados nos llevaron a preguntarnos si el efecto de IL-4 era sobre la diferenciación o la activación de las DCs. Para ello realizamos experimentos en los cuales IL-4 estuvo presente o ausente durante los 2 procesos, o bien presente solo durante la diferenciación o durante la activación de las DCs, y medimos la secreción de IL-2, IL-12 e IL-10 en cada uno de estos casos. En la Fig. 7 observamos que para todos los estímulos estudiados, la sola presencia de IL-4 durante la etapa de activación inhibe completamente o en forma significativa la producción de IL-2 en comparación a la ausencia de IL-4 durante todo el proceso.

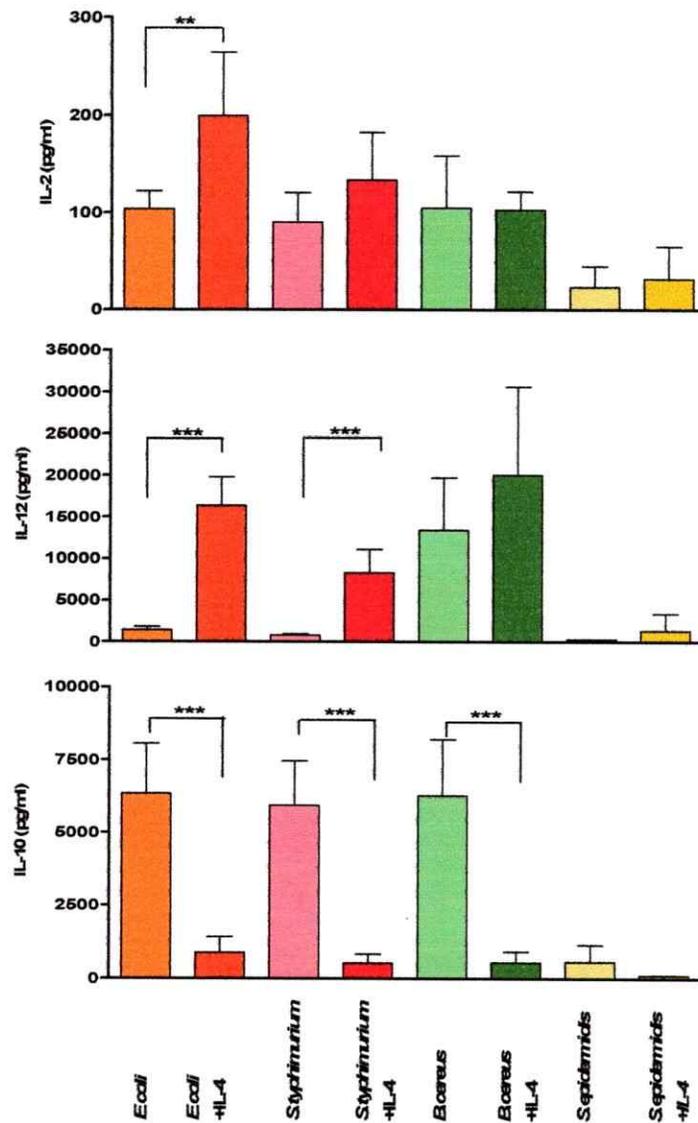


Figura 6. Efecto de IL-4 en el patrón de citoquinas secretadas por DCs activadas con distintas bacterias.

DCs de ratones C57BL/6 fueron activadas con *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. cereus* o *S. epidermidis* durante 4h en presencia (barras oscuras) o ausencia (barras claras) de IL-4. Los niveles de IL-2, IL-12 e IL-10 presentes en los sobrenadantes se cuantificaron mediante ELISA de captura. Los gráficos muestran el promedio + DE de 3 a 4 experimentos independientes. **P<0,01; ***P<0,001

Por otra parte, la presencia de IL-4 durante la diferenciación pero no en la etapa de activación de las DCs afecta diferencialmente la producción de IL-2. Observamos que las DCs diferenciadas en presencia de IL-4 secretan cantidades importantes de IL-2 si son activadas con *E. Coli* independiente de si IL-4 está o no presente durante la activación. Lo mismo ocurre con *B. cereus*, aunque en este caso la cantidad de IL-2 producida es menor comparada a la ausencia de IL-4 durante todo el proceso. (Fig.7 y Tabla I)

Por otra parte la Fig.8 muestra que DCs diferenciadas en presencia de IL-4 y activadas con LPS, LTA o *E. Coli* producen mayor secreción de IL-12 comparadas a DCs diferenciadas en ausencia de IL-4. Adicionalmente la presencia de IL-4 durante la etapa de activación de las DCs potencia la capacidad de secretar IL-12 para todos los estímulos estudiados. La activación de las DCs con *B. Cereus* presenta diferencias importantes ya que este estímulo induce la secreción de IL-12 en forma importante de manera relativamente independiente de IL-4.

En la Fig. 9 observamos el efecto de IL-4 en la secreción de IL-10. En el caso de LPS y LTA la presencia de IL-4 durante la activación de las DCs produce una inhibición en la secreción de esta citoquina. La presencia de IL-4 durante la diferenciación de las DCs produce una inhibición completa e irreversible de la secreción de IL-10, hecho que es mucho más evidente cuando las DCs son estimuladas con bacterias vivas. Sin embargo, la activación de las DCs con bacterias vivas en presencia de IL-4 no afecta la producción de IL-10.

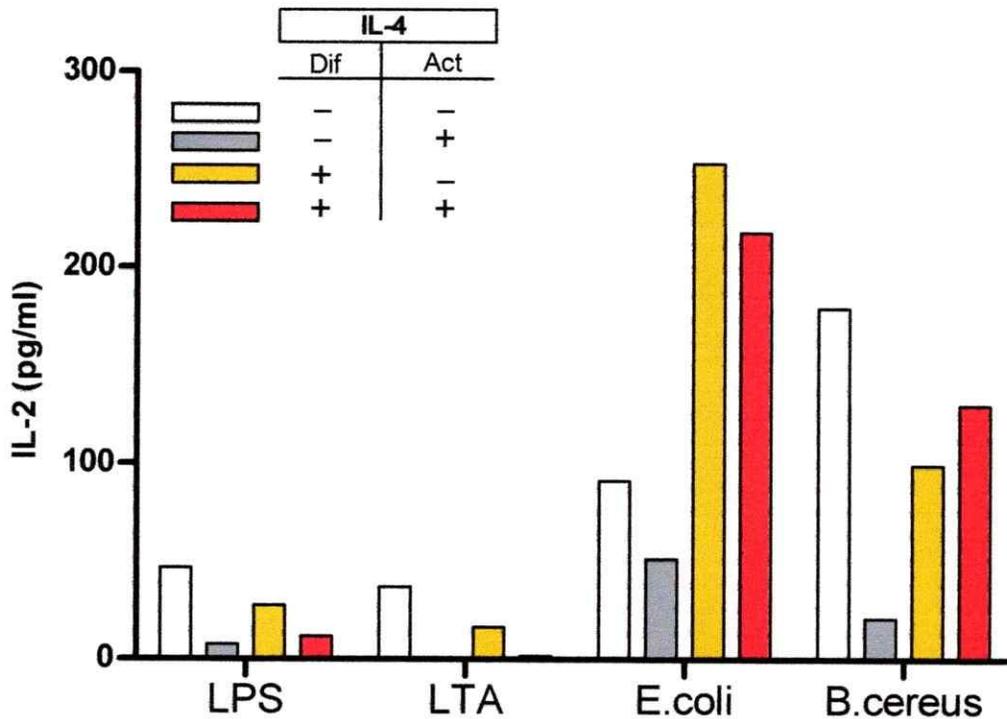


Figura 7. Efecto en la secreción de IL-2 de la presencia o ausencia de IL-4 durante las etapas de diferenciación o activación de las DCs.

DCs provenientes de ratones C57BL/6 fueron activadas con LPS, LTA, *E.coli* o *B.cereus* durante 4h. IL-4 se adicionó o no (blanco) durante la activación (gris), la diferenciación (amarillo), o ambas etapas (rojo). Los niveles de IL-2 presente en los sobrenadantes fueron cuantificados mediante ELISA de captura. El gráfico muestra un experimento representativo de 2 a 4 experimentos independientes.

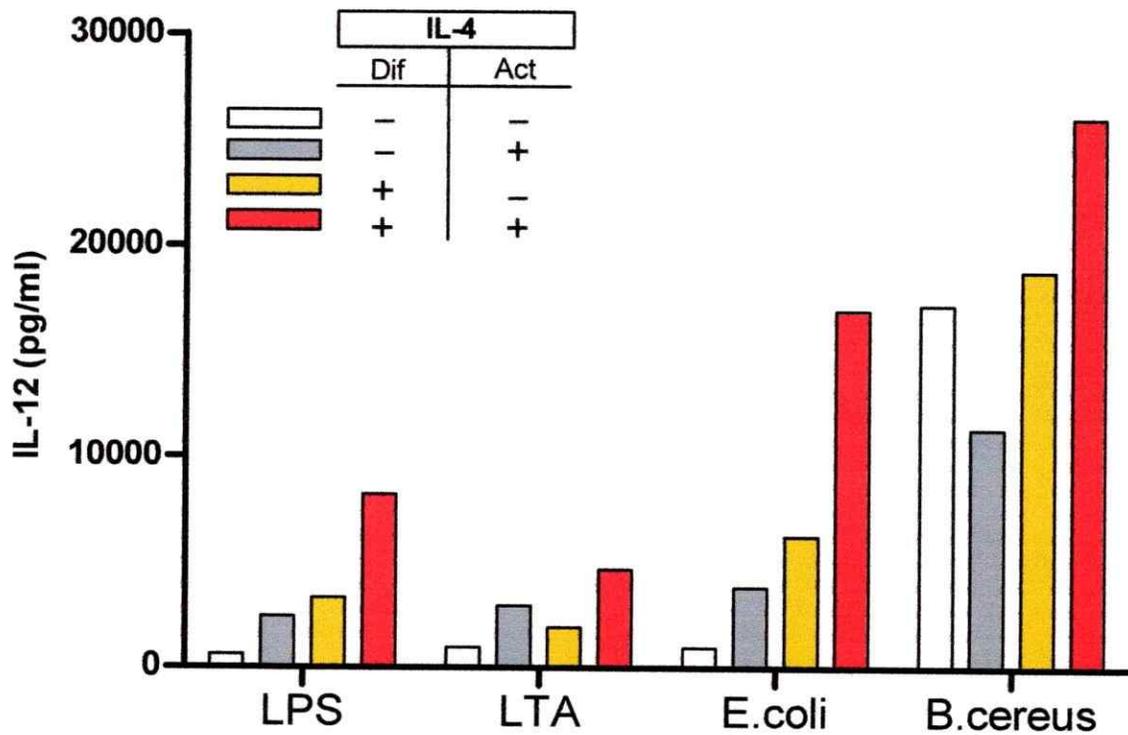


Figura 8. Efecto en la secreción de IL-12 de la presencia o ausencia de IL-4 durante las etapas de diferenciación o activación de las DCs.

DCs provenientes de ratones C57BL/6 fueron activadas con LPS, LTA, *E. coli* o *B. cereus* durante 4h. IL-4 se adicionó o no (blanco) durante la activación (gris), la diferenciación (amarillo), o ambas etapas (rojo). Los niveles de IL-12 presente en los sobrenadantes fueron cuantificados mediante ELISA de captura. El gráfico muestra un experimento representativo de 2 a 4 experimentos independientes.

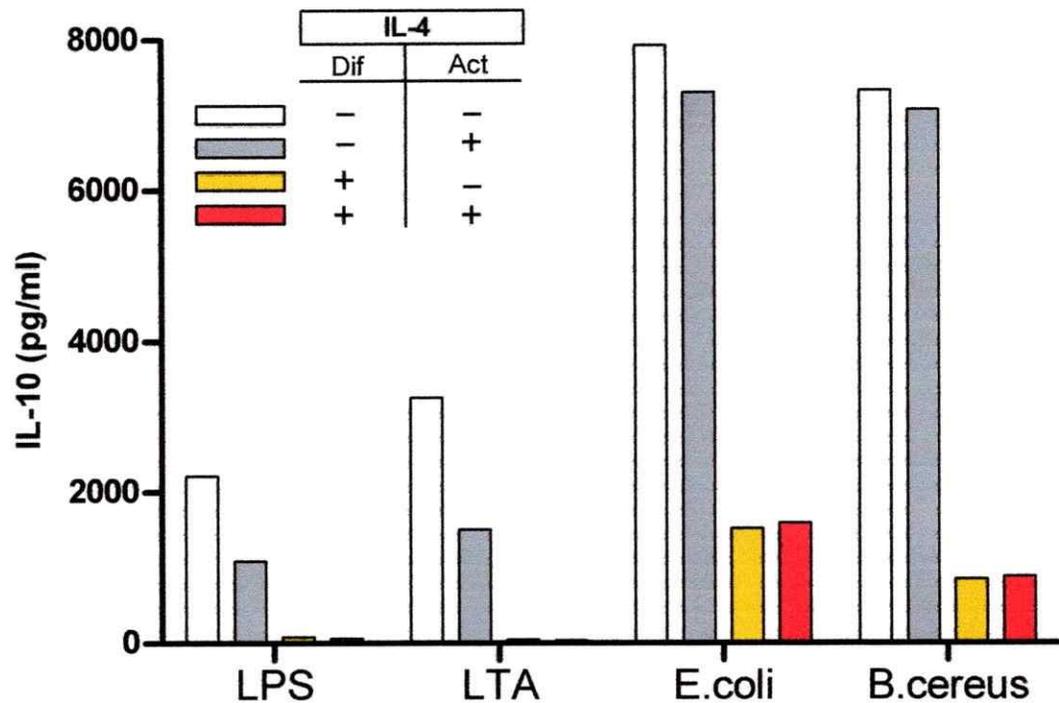


Figura 9. Efecto en la secreción de IL-10 de la presencia o ausencia de IL-4 durante las etapas de diferenciación o activación de las DCs.

DCs provenientes de ratones C57BL/6 fueron activadas con LPS, LTA, *E. coli* o *B. cereus* durante 4h. IL-4 se adicionó o no (blanco) durante la activación (gris), la diferenciación (amarillo), o ambas etapas (rojo). Los niveles de IL-10 presente en los sobrenadantes fueron cuantificados mediante ELISA de captura. El gráfico muestra un experimento representativo de 2 a 4 experimentos independientes.

El conjunto de estos resultados demuestra que IL-4 afecta la producción de citoquinas en las DCs en forma diferencial y que IL-4 afecta tanto la diferenciación como la activación de las DCs. Por otra parte demuestran que la naturaleza del estímulo agrega otra variable al sistema.

Efecto de IL-4 en células dendríticas de ratones BALBc

Ya que la polarización de la respuesta inmune depende esencialmente de las citoquinas producidas en el curso de la interacción de los linfocitos T con la DC nos pareció interesante comparar el efecto de IL-4 en dos cepas de ratones en las cuales ha sido demostrado que tienen tendencias a producir, bajo diversos estímulos, una polarización de los linfocitos T hacia un determinado fenotipo Th. Por ello realizamos estudios funcionales en DCs de ratones BALBc, los cuales tienden a producir respuestas de tipo Th2, y los comparamos a ratones C57BL/6 que inducen mas bien respuestas de tipo Th1 (Guler, Jacobson et al. 1997; Filippi, Hugues et al. 2003; Alexander and Bryson 2005). Al igual que en los experimentos anteriores, analizamos el efecto de IL-4 tanto en el estado de madurez de las DCs como en el patrón de secreción de IL-2, IL-12 e IL-10. Tal como observamos en ratones C57BL/6, las DCs recién purificadas provenientes de ratones BALBc, diferenciadas en presencia de IL-4, poseen un fenotipo más maduro determinado tanto por el aumento en el porcentaje como en el nivel de expresión de CD86 y MHC-II (Fig.10). Del mismo modo que en ratones C57BL/6, el fenotipo de las DCs de BALBc activadas por 4h con los distintos agentes microbianos no presenta cambios notables en comparación con el fenotipo de DCs mantenidas en cultivo por este lapso de tiempo (resultados no mostrados).

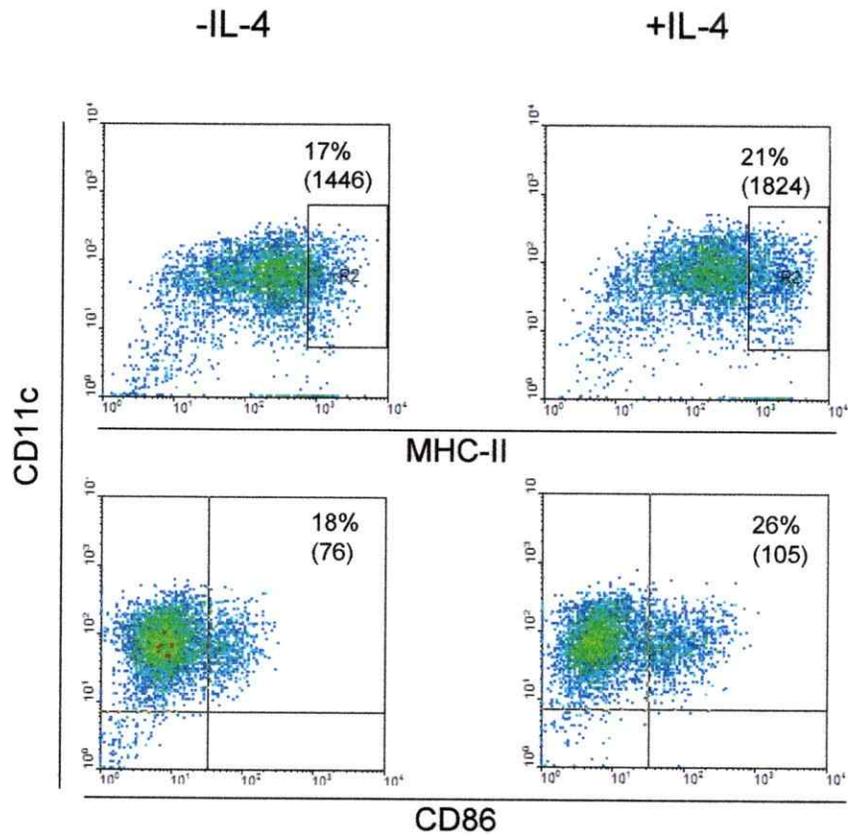


Figura 10. Efecto de IL-4 en el estado de maduración de DCs provenientes de ratones BALBc

Análisis por citometría de flujo de DCs obtenidas de precursores hematopoyéticos provenientes de ratones BALBc diferenciadas en presencia o ausencia de IL-4. Se analizó la expresión de MHC-II y CD86 de DCs CD11c⁺ recién purificadas. Los gráficos muestran el porcentaje y entre paréntesis la intensidad media de fluorescencia de las poblaciones indicadas en el cuadrante o en la ventana analizada. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Sin embargo cuando comparamos el patrón de secreción de citoquinas después de activar las DCs (Tabla II y Fig. 11), los resultados muestran que la presencia de IL-4 en los cultivos de DCs provenientes de ratones BALBc, induce una clara disminución en la secreción de IL-2, independiente de si se trata de bacterias vivas o estímulos puros provenientes de bacterias. Aunque para el caso de *E. coli* la diferencia no muestra significancia estadística, numerosos experimentos mostraron esta misma tendencia. Estos resultados contrastan con lo observado en el caso de DCs provenientes de C57BL/6, donde las bacterias vivas muestran un aumento en la secreción de IL-2, o bien niveles similares.

Al analizar la secreción de IL-12, se observó que DCs de BALBc activadas con los distintos estímulos bacterianos poseen, frente a la acción de IL-4, el mismo comportamiento que las DCs provenientes de C57BL/6, activadas bajo las mismas condiciones (Fig.11). Sin embargo, llama la atención la gran cantidad de IL-12 secretada por las DCs de ratones BALBc activadas con *E. coli*, en presencia de IL-4, comparada con la cantidad producida por la estimulación con *B. cereus*.

Por el contrario, el análisis de la secreción de IL-10 en DCs de ambas cepas de ratones activadas con los distintos agentes bacterianos, no muestra mayores diferencias y se observa claramente que IL-4 inhibe casi completamente la producción de esta citoquinas en todas las situaciones analizadas (Fig. 11).

El conjunto de estos resultados muestra que el efecto de IL-4 en la secreción de IL-2 depende en parte de la naturaleza del antígeno, pero también del origen genético de la cepa de origen de las DCs. Mientras que el efecto de IL-4 sobre la secreción de IL-12 e IL-10 es independiente de la cepa del ratón de la cual se originaron las DCs.

Tabla II. Cuantificación de citoquinas secretadas por DCs provenientes de ratones BALBc activadas con diferentes estímulos bacterianos

Estímulo	Tratamiento	IL-2	IL-12	IL-10
NT	-	<	<	<
	IL-4	<	<	<
LPS	-	56 ± 20	<	1389 ± 461
	IL-4	5 ± 3	5162 ± 4702	<
LTA	-	33 ± 22	<	1477 ± 973
	IL-4	<	1638 ± 981	<
<i>E. coli</i>	-	81 ± 65	<	8539 ± 1052
	IL-4	62 ± 46	15898 ± 10655	445 ± 337
	-	42 ± 13	3740 ± 462	6611 ± 4223
<i>B. cereus</i>	IL-4	13 ± 6	8053 ± 587	122 ± 27

< corresponde a niveles de citoquinas bajo el límite de detección

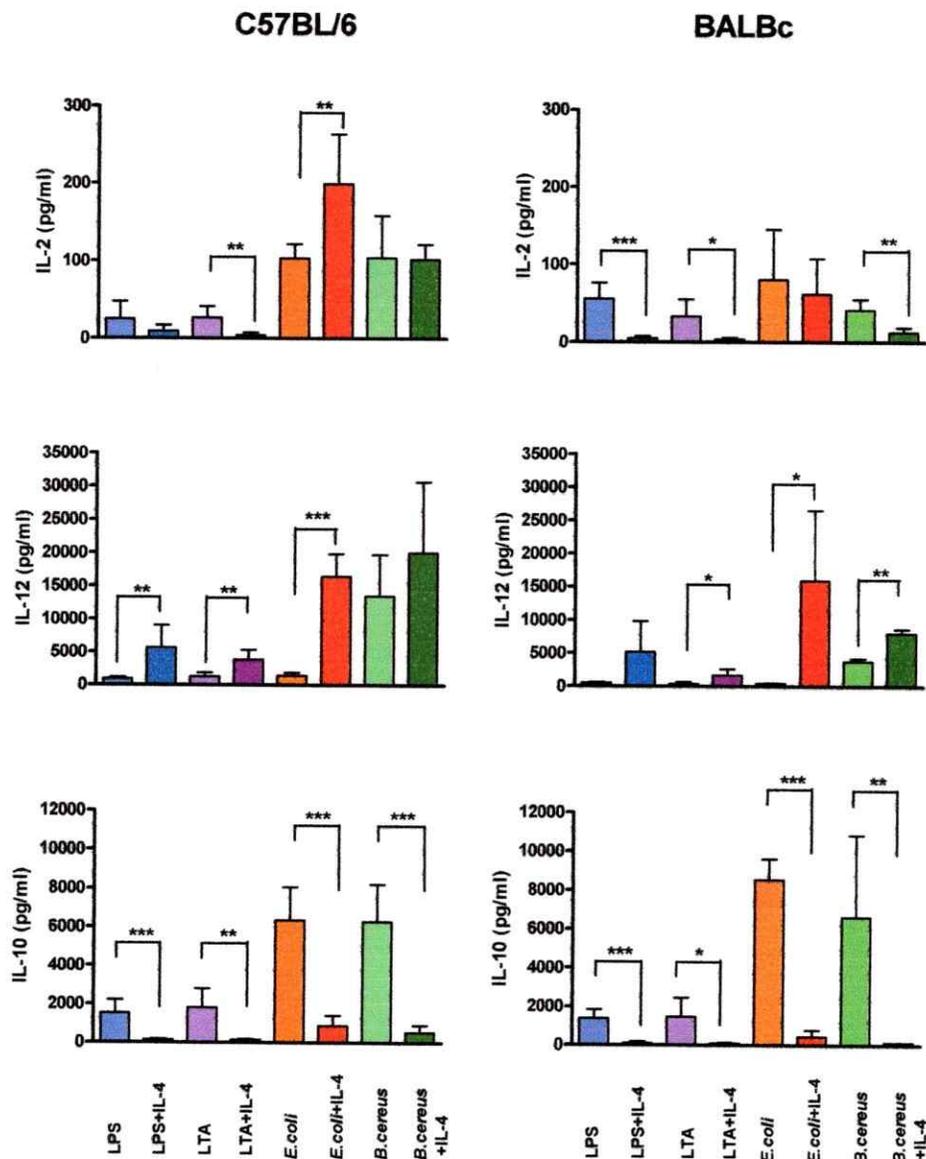


Figura 11. Comparación del patrón de citoquinas producidas por DCs activadas provenientes de ratones C57BL/6 (Th1) vs. ratones BALBc (Th2)

DCs de ratones C57BL/6 (izquierda) o BALBc (derecha) fueron activadas con LPS, LTA, *E. coli* o *B. cereus* durante 4h en presencia (barras oscuras) o ausencia (barras claras) de IL-4. Los niveles de IL-2, IL-12 e IL-10 presentes en los sobrenadantes se cuantificaron mediante ELISA de captura. Los gráficos muestran el promedio + DE de 3 a 4 experimentos independientes. *P<0,05. **P<0,01; ***P<0,001.

IL-4 regula directamente la secreción de IL-12 y de IL-10 en células dendríticas.

Con el objetivo de investigar si los efectos atribuidos a IL-4 son consecuencia directa de la unión de IL-4 a su receptor realizamos el mismo tipo de experimentos con ratones “knock out” o deficientes en el gen que codifica para la cadena α del receptor de IL-4 (KO IL4R α), subunidad responsable de la unión de esta citoquina. Las DCs se activaron durante 4h con los mismos estímulos bacterianos utilizados en los experimentos anteriores y aunque estos ratones en principio no pueden responder a IL-4 controlamos que esto era efectivo adicionando o no IL-4 durante todo el proceso de generación de las DCs y durante la activación.

Al analizar las DCs recién purificadas proveniente del ratón KO IL-4R α , se observó que como esperado, la presencia de IL-4 no induce un estado de maduración mayor en el fenotipo de estas células como sucede con DCs provenientes de ratones C57BL/6 o BALBc. Esto sugiere que el aumento de los niveles de expresión de CD86 y MHC-II observado anteriormente es una consecuencia directa de la interacción de IL-4 con su receptor (Fig.12).

Sorprendentemente, al analizar la producción de IL-2 en los sobrenadantes de las DCs KO IL-4R α maduras con factores purificados o bacterias vivas, observamos en forma reproducible una pequeña inhibición en la secreción de esta citoquina (Fig.13).

Por otro lado, la Fig.13 muestra que las DCs KO IL-4R α activadas con todos los estímulos estudiados no secretan IL-12, demostrando así que este fenómeno depende directamente de la acción de IL-4. Estos resultados fueron comparados a DCs de ratones BALBc ya que los ratones KO IL-4R α tienen como fondo genético esta cepa de ratones.

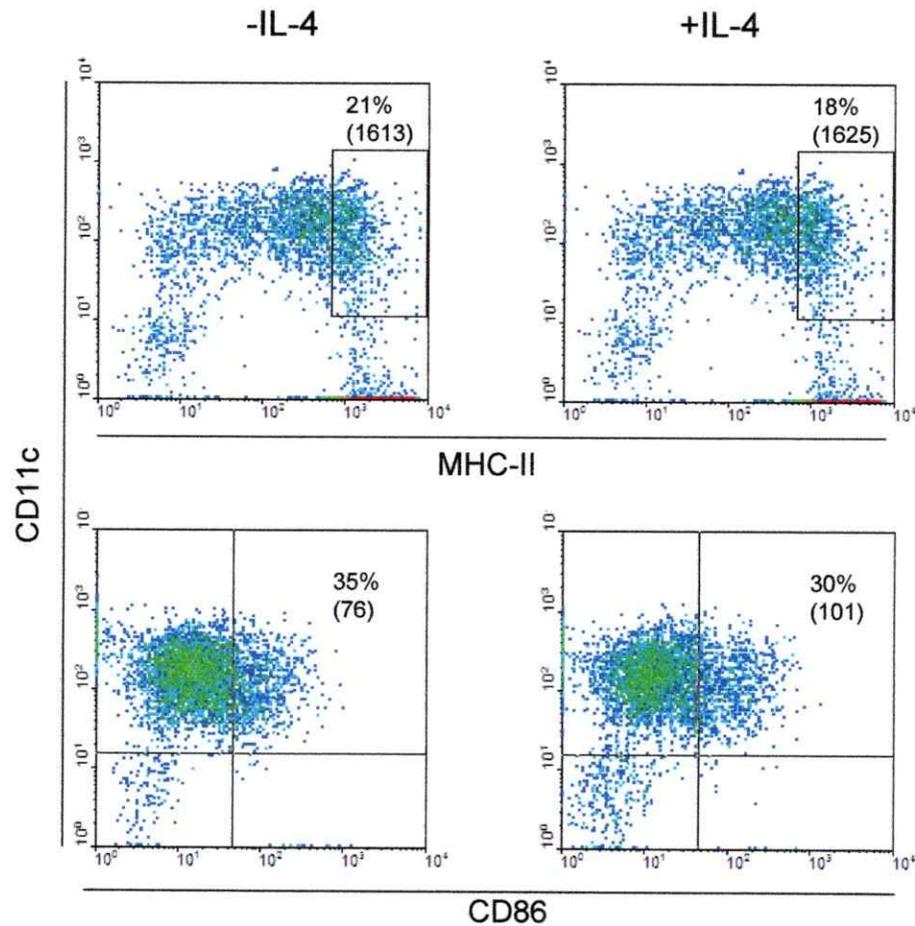


Figura 12. Efecto de IL-4 en el estado de maduración de DCs provenientes de ratones KO IL-4R α

Análisis por citometría de flujo de DCs obtenidas de precursores hematopoyéticos provenientes de ratones KO IL-4R α diferenciadas en presencia o ausencia de IL-4. Se analizó la expresión de MHC-II y CD86 de DCs CD11c⁺ recién purificadas. Los gráficos muestran el porcentaje y entre paréntesis la intensidad media de fluorescencia de las poblaciones indicadas en el cuadrante o en la ventana analizada. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

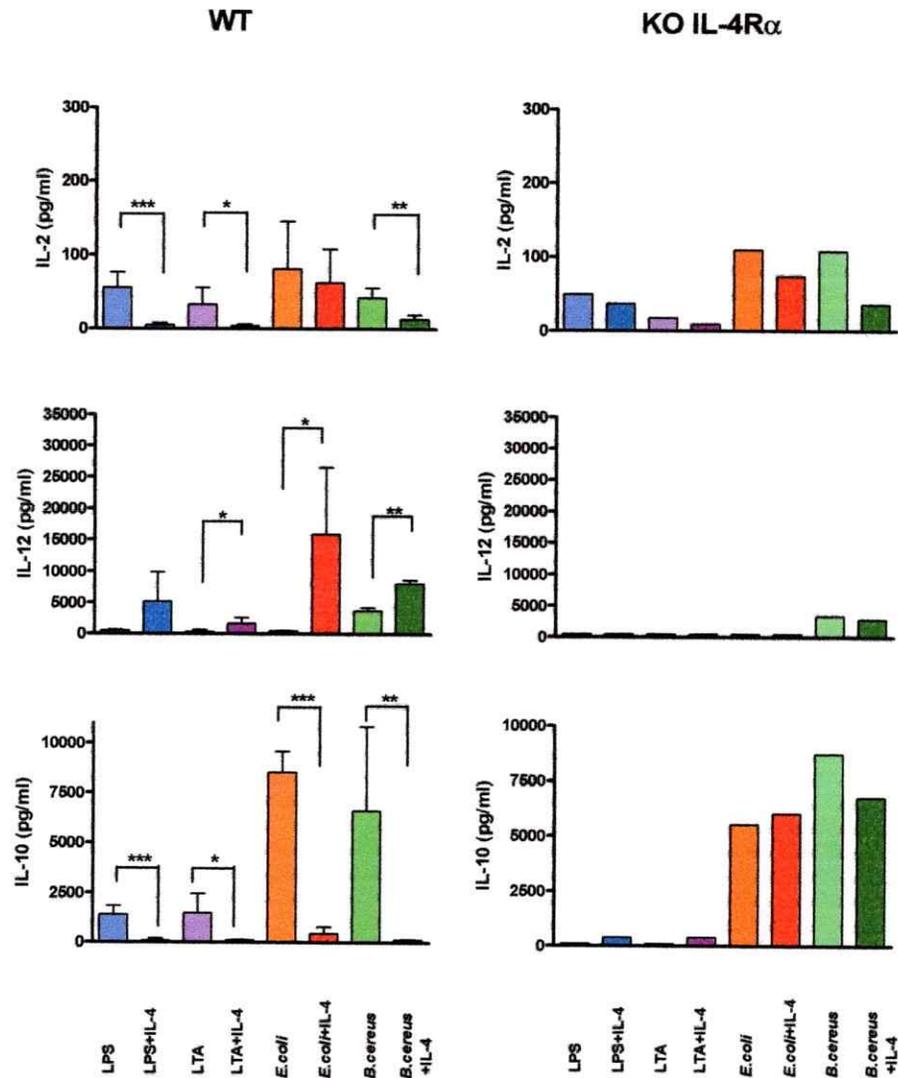


Figura 13. Efecto de IL-4 en el patrón de citoquinas secretadas por DCs de ratones KO IL-4R α activadas con diversos estímulos.

DCs de ratones BALBc (WT) o KO IL-4R α fueron activadas con LPS, LTA, *E. coli* o *B. cereus* durante 4h en presencia (barras oscuras) o ausencia (barras claras) de IL-4. Los niveles de IL-2, IL-12 e IL-10 presentes en los sobrenadantes se cuantificaron mediante ELISA de captura. Los gráficos de ratones WT muestran el promedio + DE de 3 experimentos independientes. Los gráficos de ratones KO son representativos de 2 a 3 experimentos independientes. *P<0,05. **P<0,01; ***P<0,001.

Cabe destacar que solo en el caso de activación con *B. cereus* detectamos la producción de pequeñas cantidades de IL-12 que no variaron con la presencia de IL-4 durante la activación de las DCs.

La situación contraria se observa (Fig.13) respecto de la secreción de IL-10, donde las DCs KO IL-4R α activadas con los distintos estímulos bacterianos producen en todos los casos altas cantidades de IL-10, lo que demuestra que la inhibición anteriormente observada de la secreción de IL-10 depende directamente de la acción de IL-4.

IL-4 induce la polarización hacia Th1 de los linfocitos T al actuar sobre las células dendríticas

Como mencionamos anteriormente, las citoquinas juegan un papel fundamental en la polarización de la respuesta inmune durante la interacción de la DC con el LT. Durante este proceso, la presencia de IL-12 induce la diferenciación de estas células hacia Th1, productoras de IFN- γ . Mientras que la presencia de IL-10 o de IL-4, en ausencia de IL-12, induce la diferenciación de los LT hacia Th2, células productoras de IL-4 (O'Garra 1998)

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que DCs diferenciadas y activadas en presencia de IL-4 producen mayoritariamente IL-12, fenómeno que es acompañado por una disminución en la secreción de IL-10. Esto permite predecir que en estas condiciones se debería inducir una respuesta de tipo Th1 en los LT. Para demostrar esto, aislamos LT de timo de ratones F1 (AND x B10.BR) los cuales expresan un receptor para el antígeno (TCR) transgénico, que reconoce específicamente un péptido del

citocromo c de paloma presentado en el contexto de MHC-II IE^k. Los LT fueron cocultivados con DCs de ratones F1 previamente diferenciadas y activadas en presencia o ausencia de IL-4, las cuales son cargadas con el péptido específico. El esquema experimental se encuentra en la Fig.14.

En la Fig.15 observamos que DCs diferenciadas y activadas en presencia de IL-4 inducen un aumento de IFN- γ en los sobrenadantes de los cocultivos, en comparación a aquellos obtenidos con DCs diferenciadas y activadas en ausencia de esta IL-4. Estos experimentos se realizaron 3 veces con resultados similares. Como control utilizamos DCs diferenciadas y mantenidas por 4h con IL-4 en ausencia de estímulos bacteriano, cargadas con el péptido específico de los LT. A diferencia de DC activadas con estímulos bacterianos, la presencia de IL-4 produce una disminución de la secreción de IFN- γ en los cocultivos comparado a la ausencia de IL-4 (Fig.15). Para descartar que la producción de IFN- γ en los cocultivos proviniese de las DCs, se midió IFN- γ en los sobrenadantes de las DCs activadas con los distintos estímulos bacterianos. No se detectó IFN- γ en ningún caso. (datos no mostrados). Esto demuestra que la producción de IFN- γ detectada en los cocultivos de DCs activadas proviene de los LT activados.

El conjunto de estos resultados muestra que DCs generadas y activadas en presencia de IL-4 inducen la diferenciación hacia Th1 de los LT, probablemente debido a la inducción de la secreción de IL-12 por las DCs.

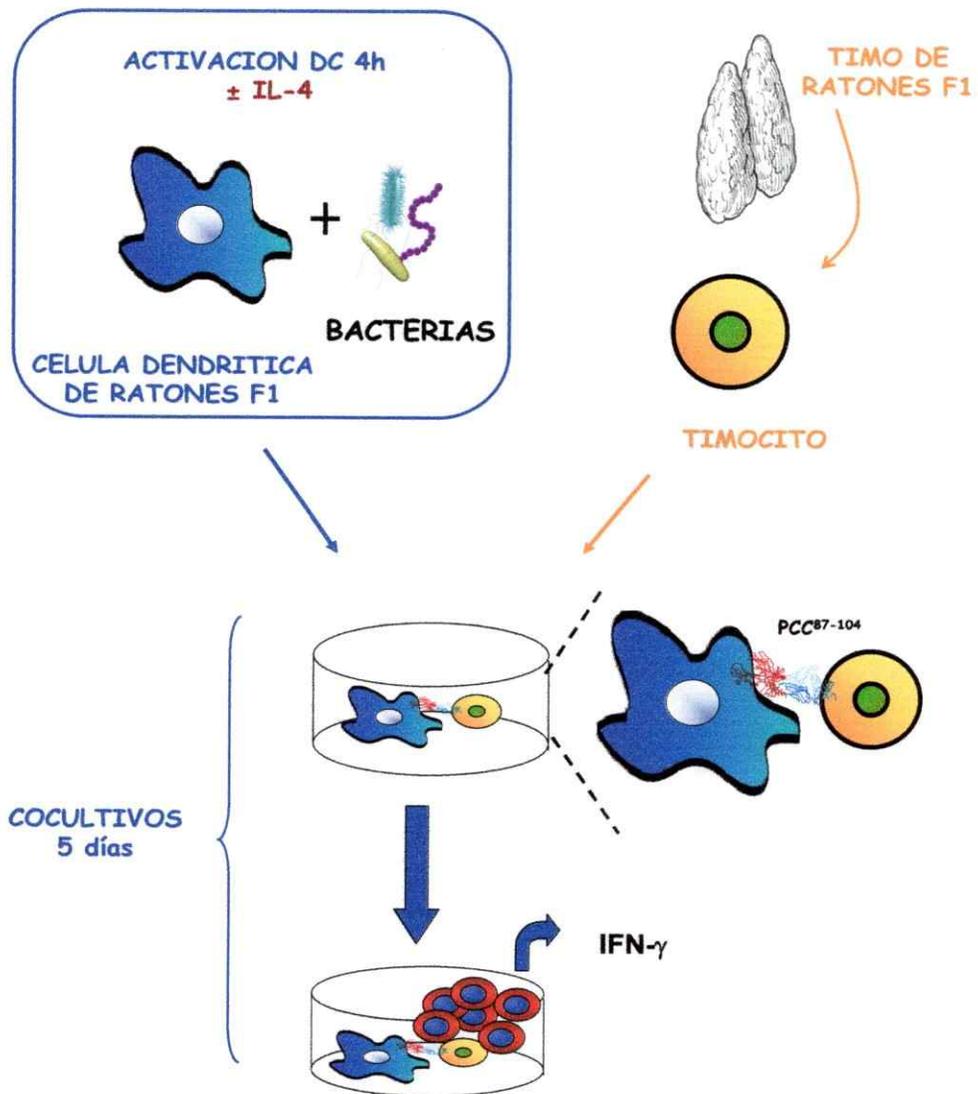


Figura 14. Esquema de activación de linfocitos T transgénicos con DC diferenciadas y activadas con o sin IL-4

DCs provenientes de ratones F1, diferenciadas y activadas en presencia de IL-4 (Fig. 1), fueron cocultivadas con Linfocitos T purificados de timo de ratones F1. Se adicionó el péptido específico PCC₈₇₋₁₀₄ a los cocultivos y los días 3,4 y 5 se rescató el sobrenadante y se evaluó la producción de IFN- γ mediante ELISA de captura.

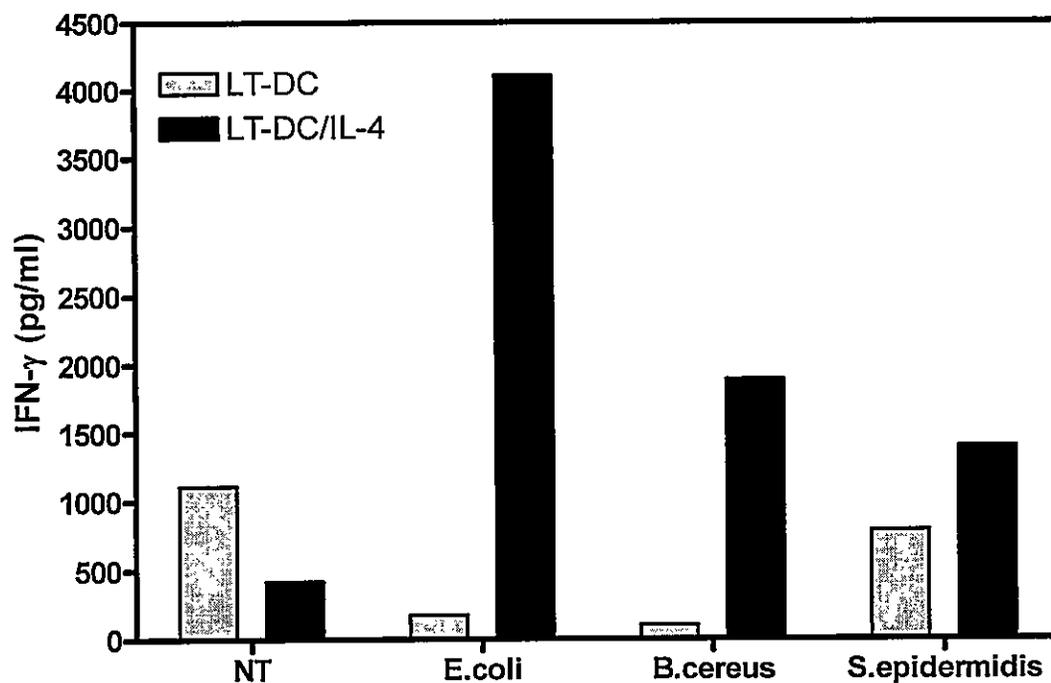


Figura 15. LT cocultivos con DCs diferenciadas y activadas en presencia de IL-4 producen IFN- γ .

DCs provenientes de ratones F1 fueron diferenciadas y activadas en presencia (barras negras) o ausencia de IL-4 (barras grises). Luego de la activación con *E. coli*, *B. cereus* o *S. epidermidis* durante 4h, las DCs fueron lavadas, esterilizadas y posteriormente cocultivadas durante 5 días con timocitos provenientes de ratones F1 en presencia del péptido PCC⁸⁷⁻¹⁰⁴. Los niveles de IFN- γ presentes en los sobrenadantes de los cocultivos de los días 3, 4 y 5 fueron cuantificados mediante ELISA de captura. El gráfico muestra la producción de IFN- γ al día 3 de cocultivo y es representativo de 3 experimentos independientes.

Posibles mecanismos de secreción de IL-2 por células dendríticas.

IL-2 es una citoquina secretada casi exclusivamente por los linfocitos T y solo recientemente se ha demostrado que las DCs son también capaces de secretar esta citoquina (Granucci, Vizzardelli et al. 2001). Sin embargo, poco se sabe sobre la función que la IL-2 producida por las DCs podría tener. Como ya demostramos, el efecto de IL-4 sobre la secreción de IL-2 depende de numerosos factores, entre ellos factores genéticos. Para investigar los mecanismos implicados en este fenómeno utilizamos DCs obtenidas de ratones C57/BL6 con las cuales realizamos estudios a nivel transcripcional. Las DCs fueron activadas con LPS o bacterias vivas: *E. coli*, *S. typhimurium* o *B. cereus*, en presencia o ausencia de IL-4, durante 4h. Al final de este proceso se recuperaron las células, se extrajo RNA total y se amplificó el DNAc de IL-2 mediante RT-PCR. Los niveles de RNAm se cuantificaron comparándolos con la amplificación de β -actina, un gen de expresión constitutiva.

En la Fig.16 A y B observamos que IL-4 induce un aumento en la expresión de RNAm de IL-2 en DCs activadas con LPS, contrariamente a lo que ocurre a nivel de secreción de la proteína. Sin embargo, al activar las DCs con bacterias vivas se produce un efecto similar al observado respecto de la secreción de IL-2 (Fig.16 C y D). Esto sugiere que IL-4 podría actuar a nivel post-transcripcional, por ejemplo inhibiendo la exocitosis de vesículas que contienen IL-2, además de a nivel transcripcional aumentando el RNAm de IL-2 en casos en los cuales las DCs son activadas con bacterias vivas.

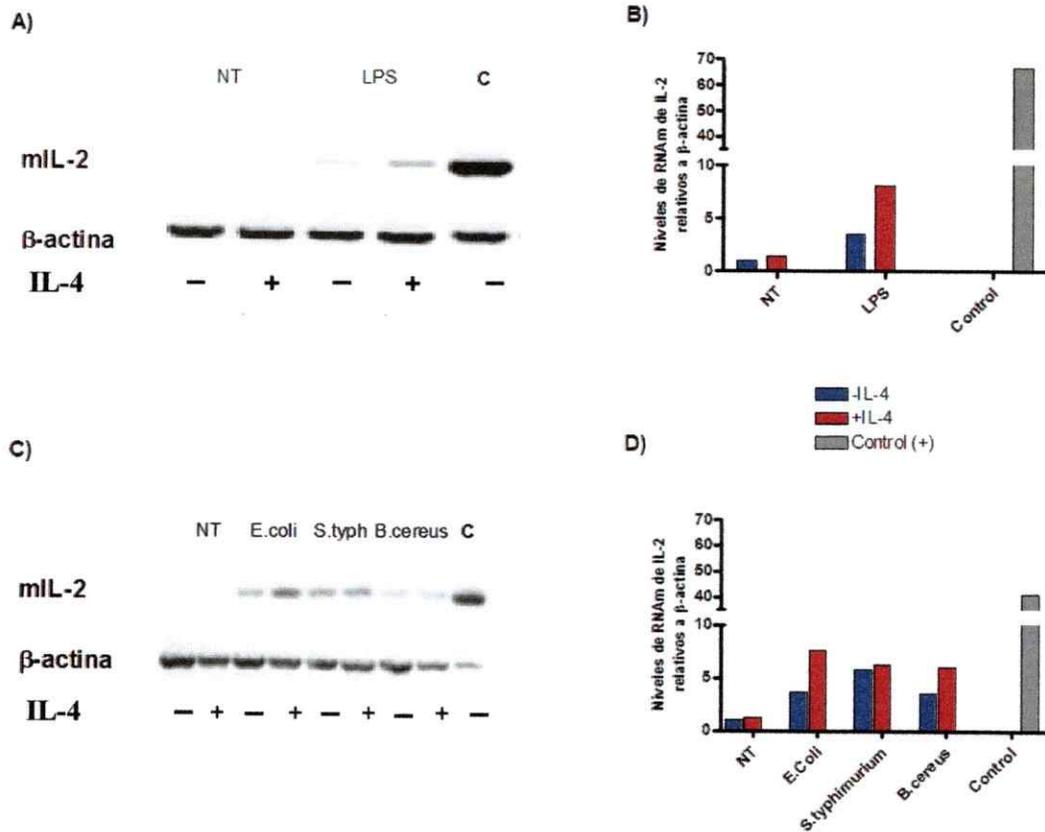


Figura 16. Efecto de IL-4 en la expresión del RNAm de IL-2 en DCs activadas.

DCs provenientes de ratones C57BL/6 fueron diferenciadas y activadas durante 4h en presencia (barras rojas) o ausencia (barras azules) de IL-4. El RNAm de IL-2 expresado por las DCs fue analizado mediante RT-PCR. **A)** Expresión del RNAm de IL-2 y β -actina por DC activadas o no (NT) con LPS. **B)** Cuantificación relativa a β -actina del RNAm de IL-2. **C)** Expresión del RNAm de IL-2 y β -actina por DC activadas o no (NT) con *E. coli*, *S. typhimurium* o *B. cereus*. **D)** Cuantificación relativa a β -actina del RNAm de IL-2. El control (+) corresponde al RNAm de IL-2 expresado por esplenocitos activados por 4h con PMA + Ionomicina. Los resultados son representativos de 2 a 3 experimentos independientes.

Una droga ampliamente utilizada en el tratamiento contra el rechazo a transplantes es la ciclosporina (CsA) la cual bloquea la actividad fosfatasa de la calcineurina en los LT, inhibiendo directamente la secreción de IL-2. En un estudio anterior de nuestro laboratorio demostramos que CsA es capaz de inhibir la secreción de IL-2 en DCs activadas por LPS (Sauma, Fierro et al. 2003). Nos pareció interesante ampliar estos estudios y determinar si IL-4 podría ejercer su efecto por el mismo mecanismo que CsA. Para esto, las DCs fueron activadas con LPS, *E.coli* o *B. cereus* en presencia o ausencia de CsA, la cual estuvo presente durante la diferenciación y activación de las DCs. Debido a que estos estudios no forman parte de los objetivos de este trabajo, incluimos los resultados en el Anexo 1. Observamos que el efecto inhibitorio de CsA no alcanza a contrarrestar el potente efecto activador de las bacterias, observándose apenas una leve disminución en la secreción de IL-2 por DCs generadas y maduras en presencia de CsA, sin embargo en ningún caso observamos un aumento en la secreción de IL-2. A su vez confirmamos que CsA inhibe la secreción de IL-12 en DCs activadas con LPS pero que no tiene mayor efecto en DCs activadas con bacterias. Por otro lado, CsA no afecta la secreción de IL-10 producida por DCs activadas tanto con LPS como con bacterias vivas (Anexo 1). En conjunto estos datos demuestran que el mecanismo por el cual IL-4 ejerce su función en las DCs, difiere del mecanismo inducido por CsA.

DISCUSION

Los numerosos estudios realizados en DCs han dejado de manifiesto la importancia de estas células en el desarrollo de la respuesta inmune. Las DCs actúan como puente entre la respuesta inmune innata y la adquirida (Pasare and Medzhitov 2004). No solo son responsables de sensar agentes foráneos a través de receptores para patrones moleculares de diferentes patógenos, sino que además son las únicas células capaces de activar eficientemente linfocitos T vírgenes en una respuesta primaria. Por otro lado, las DCs tienen un papel importante en la mantención de la tolerancia periférica al presentar péptidos propios, en un contexto no inflamatorio, a los LT (Steinman, Hawiger et al. 2003). Se cree que el encuentro de la DC con el patógeno es determinante en el tipo de respuesta que generará en el linfocito T, produciendo la diferenciación de los linfocitos T hacia linfocitos de tipo Th1 o Th2 (Kalinski, Hilkens et al. 1999). A pesar de los avances en esta materia, todavía quedan varios aspectos por esclarecer, como por ejemplo determinar el efecto de factores microambientales presentes en los sitios de activación de la DC, entre los cuales podemos citar citoquinas producidas por células que se localizan en ese lugar. Una de estas citoquinas es la IL-4 que puede ser secretada por los mastocitos y otras células situadas en los sitios de entrada de los patógenos, la cual podría afectar la respuesta de las DCs. Por otra parte IL-4 es también un factor de crecimiento para las DCs y como tal es usada en numerosos protocolos de expansión de las DCs. Con el fin de esclarecer en parte estos aspectos, esta tesis presenta nuevos elementos respecto a la influencia de IL-4 en la funcionalidad de las DCs.

A IL-4 se le atribuye una acción directa sobre los linfocitos T llevándolos a una polarización hacia un fenotipo Th2. Una vez activados, estos linfocitos son capaces de producir y secretar esta misma citoquina que actúa como un factor autocrino ayudando a la proliferación de estos linfocitos (O'Garra 1998). Sin embargo existen estudios que demuestran que IL-4 podría tener un papel importante en la respuesta Th1 al ejercer un efecto indirecto sobre las DCs (Hochrein, O'Keeffe et al. 2000). Estudios anteriores de nuestro laboratorio demostraron que la presencia de IL-4 durante la diferenciación de la DC promueve un fenotipo más maduro de estas células, aumentando los niveles expresión de CD86, MHC-II y CD40, pero además afecta el patrón de citoquinas secretadas por la DC, inhibiendo la secreción de IL-2 durante la activación por LPS y promoviendo la secreción de IL-12 bajo estas condiciones.

En esta tesis estudiamos el efecto de IL-4 sobre la DC activada tanto con factores bacterianos purificados como LPS o LTA o bien con bacterias vivas Gram-negativas y Gram-positivas como *E. coli*, *S. typhimurium* o *B. cereus*. Además, estudiamos la influencia de estas DCs durante la activación y polarización de los LT CD4⁺. En este trabajo se puso particular interés a la secreción de IL-2 por la DC, fenómeno relativamente nuevo (Granucci 2001; Sauma D, 2004), el cual podría ser importante en la inducción de tolerancia como fue postulado por nuestro laboratorio recientemente (Fierro, Mora et al. 2003).

Efecto de IL-4 en el estado de maduración de las células dendríticas.

Nuestros resultados muestran que DCs provenientes de C57BL/6, diferenciadas y activadas en presencia de IL-4 estimuladas con LPS o *E. coli*, presentan un fenotipo más maduro comparado a DCs diferenciadas en ausencia de esta citoquina. Sin embargo, esta diferencia es menos evidente cuando comparamos DCs recién purificadas con DCs activadas o simplemente mantenidas en cultivo por un lapso de 4h (Fig.2 y 4). El aumento en los niveles de expresión de moléculas de presentación antigénica como de moléculas coestimuladoras puede tener efectos importantes en el tipo de respuesta inmune que se desarrolle. Resultados recientes demuestran que moléculas tales como CD80 y CD86 tienen efectos antagónicos siendo CD86 responsable de respuestas estimuladoras y CD80 responsable de respuestas supresoras (Zheng, Manzotti et al. 2004). En este sentido, la disminución en un 10% de la población positiva para CD80, observada en DCs diferenciadas en presencia de IL-4 en comparación con DCs diferenciadas en ausencia de esta citoquina, podría ser relevantes para la inducción de la respuesta inmune. A pesar de que en la literatura se ha reportado un aumento en la maduración de las DCs por efecto de IL-4 (Lutz, Suri et al. 2000), no se ha puesto especial atención en el análisis de estos resultados ya que como se muestra en las Figuras 2 y 10, solo una pequeña población celular aumenta la expresión de MHC-II y CD86, lo que demuestra que existen células en diferentes estados de maduración. El análisis con marcadores de linaje de las DCs muestra que efectivamente, existe heterogeneidad en estas células (Fig.3). Sería interesante aislar las diferentes poblaciones con el fin de determinar si todas las subpoblaciones tienen comportamientos

similares a los encontrados en el curso de este trabajo, pero esto necesitaría la utilización de un *cell sorter*, equipamiento actualmente inexistente, en Chile.

Puesto que se ha demostrado que ratones C57BL/6 promueven respuestas de tipo Th1 y que ratones BALBc promueven respuestas Th2, comparamos DCs generadas de estas 2 cepas de ratones en cuanto a maduración en presencia y ausencia de IL-4. Al igual que lo observado para C57BL/6, DCs recién purificadas provenientes de ratones BALBc diferenciadas en presencia de IL-4 generan poblaciones de DCs más maduras que aquellas diferenciadas en ausencia de esta citoquina, determinado por los niveles de MHC-II y CD86 (Fig.10). Por lo tanto, IL-4 induce un aumento en la población de DCs maduras, independiente de la cepa de origen de estas células. Por otra parte, demostramos que el aumento en la maduración de DCs recién purificadas es gatillado por la unión de IL-4 a su receptor, ya que al utilizar DCs provenientes de ratones KO IL-4R α , no se observan diferencias comparadas a DCs WT (Fig.12). Cabe destacar que el estado de maduración de las DCs activadas con los distintos estímulos bacterianos no cambia ni tampoco depende de la cepa de ratón de la cual provienen las DCs (Fig.4 y datos no mostrados).

Influencia de IL-4 en la secreción de IL-12 e IL-10 por células dendríticas.

La activación de las DCs conlleva la secreción de citoquinas que son los factores responsables de la conversación entre las diferentes células que participan en la respuesta inmune. Las DCs al activarse no solo aumentan las moléculas de coestimulación y de histocompatibilidad en su superficie, sino que también secretan una

variedad de citoquinas capaces de influenciar la polarización de los LT CD4 (Kalinski and Moser 2005). En este contexto, analizamos el efecto que ejerce IL-4 en el patrón de citoquinas secretadas por DCs activadas con los distintos estímulos bacterianos. En primer lugar notamos que las DCs generadas en presencia o ausencia de IL-4 cultivadas por 4h a 37°C muestran un fenotipo de maduración comparable al de células tratadas con diversos estímulos, sin embargo en ningún caso secretan cantidades detectables de IL-2 e IL-12, y solo secretan IL-10 a niveles muy bajos. La secreción de citoquinas se produce rápidamente por efecto de la activación a través de los TLRs sugiriendo que las citoquinas se encontrarían preformadas en vesículas y que el enganchamiento de determinados TLRs provocaría su exocitosis. Además, a tiempos más largos, se induciría una síntesis de novo de citoquinas, ya que al realizar una cinética de activación de las DCs con bacterias, aumenta la producción de IL-2, IL-12 e IL-10 hasta llegar a un máximo entre las 4h y 12h (datos no mostrados). Nuestros resultados muestran que independiente de la naturaleza del estímulo bacteriano utilizado y de la cepa de origen de estas DCs (C57BL/6 vs. BALBc), la presencia de IL-4 induce un drástico aumento en la secreción de IL-12 acompañado de una inhibición en la secreción de IL-10 (**Fig.5 y 11**). Encontramos que DCs provenientes de ratones KO IL-4R α activadas por 4h con diferentes estímulos no secretan IL-12 y que producen cantidades importantes de IL-10, demostrando de esta manera que la producción de IL-12 y la inhibición en la producción de IL-10 dependen directamente de la señalización de IL-4 a través de su receptor (**Fig.13**). Estos resultados concuerdan con un trabajo publicado recientemente donde se demuestra que el aumento en la producción de IL-12 depende de la inhibición de IL-10

por IL-4 (Yao, Li et al. 2005). Puesto que IL-4 puede estar presente tanto en el sitio de diferenciación como de activación de la DC, nos preguntamos si IL-4 presentaba un efecto diferencial sobre las DCs. Por lo tanto realizamos experimentos en los cuales IL-4 estuvo presente solo en una de estas etapas o en ambas. Los resultados muestran que la inhibición de la secreción de IL-10 depende de la presencia de IL-4 durante la diferenciación de la DC y que este efecto es irreversible, mientras que la secreción de IL-12 depende de la presencia de IL-4 durante todo el proceso, alcanzando un máximo cuando IL-4 está presente en ambas etapas (Fig.7 y 8). Estos resultados sugieren que la diferenciación de la DC en ausencia de IL-4 induce la producción de IL-10 la cual probablemente se acumula al interior de la célula, y que la activación de la DC con un factor bacteriano (TLRs) gatilla la secreción de la citoquina acumulada. Por el contrario las DCs diferenciadas en ausencia de IL-4 no producen IL-12 y la presencia de IL-4 induce la producción de IL-12, proceso que aparentemente ocurre tanto durante la diferenciación como durante la activación de las DCs. Estos resultados resaltan la importancia de IL-4 en la secreción de IL-12 por las DCs y sugieren que en estas condiciones las DCs deberían inducir la polarización de la respuesta inmune hacia Th1, contradiciendo el dogma bien establecido que IL-4 induce respuestas de tipo Th2.

Secreción de IL-12 por células dendríticas maduradas con *B. cereus*

Los resultados obtenidos al usar *B. cereus* como estímulo de activación fueron inesperados y merecen una discusión especial. *B. cereus* induce la secreción de niveles notablemente altos de IL-12 en DCs (alrededor de 5 veces más que cualquier otro estímulo bacteriano utilizado) independiente de la magnitud del efecto inhibitorio de IL-

4 sobre IL-10 (**Fig.5**). Este fenómeno se observó tanto en DCs provenientes de cepas C57BL/6 como BALBc, indicando que se trata más bien de un comportamiento generalizado inducido por esta bacteria (**Fig. 5, 11 y 13**). Un fenómeno similar se reportó en monocitos humanos (Hessle, Andersson et al. 2000), donde compararon los monocitos activados con bacterias Gram-positivas vs. bacterias Gram-negativas. Solo bacterias Gram-positivas fueron capaces de inducir altos niveles IL-12 en monocitos. Para determinar si otras bacterias Gram-positivas pueden inducir un patrón similar en DCs de ratón, activamos las DCs con otra bacteria Gram-positiva, *S. epidermidis*. Observamos que la activación con esta bacteria no induce niveles detectables de IL-12 en las DCs (**Fig.6**). Estos resultados demuestran que cada tipo de microorganismo produce un tipo de respuesta particular. Si consideramos que esta bacteria está en contacto con la piel, tiene sentido que no induzca la secreción de IL-12, la cual podría inducir reacciones inflamatorias no deseadas.

Sin embargo, en términos generales, el efecto de IL-4 en los cultivos de DCs maduras con *B. cereus*, provenientes de ratones C57BL/6 o BALBc, es similar a la de otras cepas bacterianas. Por otro lado, al utilizar DCs de ratones KO IL-4R α , se observó que *B. cereus* es el único estímulo capaz de inducir la secreción de IL-12 aun cuando las cantidades no fueron muy importantes (**Fig.6**). El conjunto de los resultados demuestra que la secreción de IL-12 depende directamente de la inhibición de IL-10 por IL-4, sin embargo, los experimentos realizados con *B. cereus* sugieren que existe una vía independiente de IL-4 que permite la secreción de IL-12, la cual sería gatillada por los

TLRs que *B. cereus* activa. La superposición de estas dos vías podría explicar la notable producción de IL-12 inducida en las DCs al ser estimuladas con *B. cereus*.

IL-4 polariza los LT hacia Th1 a través de su acción sobre la célula dendrítica

Como mencionamos anteriormente, la producción de citoquinas por las DCs puede influenciar la polarización del LT durante su activación. Nuestros resultados muestran un aumento de IL-12 y una disminución de IL-10 en DCs diferenciadas y activadas en presencia de IL-4. Por lo tanto en estas condiciones debería producirse una polarización de los LT hacia Th1, secretores de IFN- γ .

La **Fig.14** muestra que efectivamente, LT cocultivados con DCs previamente diferenciadas y activadas con bacterias en presencia de IL-4 producen altas cantidades de IFN- γ en comparación a LT cocultivados con DCs diferenciadas y activadas, con los mismos estímulos bacterianos, en ausencia de IL-4. Estos resultados demuestran que IL-4 induce una polarización hacia Th1 de los LT a través de su acción sobre las DCs. En la **Fig.14** podemos observar que solo DCs estimuladas con bacterias vivas polarizan claramente la respuesta inmune. Por otra parte evaluamos la producción de IL-4 en estos cocultivos y no la detectamos en ninguna condición, lo cual podría deberse a niveles de secreción inferiores al límite de detección de nuestro ensayo. Estos resultados explicarían la necesidad de agregar además de IL-4 un anticuerpo bloqueador contra IL-12 para generar *in vitro* linfocitos Th2. Si se agrega solamente IL-4 se producen tanto linfocitos Th2 como Th1, probablemente debido a la acción diferencial de IL-4 sobre la DC y los LT. (Szabo, Dighe et al. 1997).

IL-2, una citoquina versátil frente a la estimulación de células dendríticas con los distintos factores bacterianos e IL-4

Tal como se ha señalado, las DCs son capaces de producir IL-2, sin embargo, se desconoce completamente el papel funcional de este fenómeno. Como puede ser observado en la **Fig.5**, la cantidad de IL-2 producida por las DCs no sobrepasa los 250 pg/ml, cantidad relativamente pequeña comparada a la secreción de otras citoquinas (ver IL-12 e IL-10 en la misma figura) y muy inferior a la cantidad de IL-2 secretada por LT activados. Por lo tanto, es posible pensar que solo LT que posean un receptor de alta afinidad, como los LT reguladores, podrían ser activados por la IL-2 secretada por las DCs. Se sabe que los LT vírgenes expresan solo un receptor de baja afinidad constituido por las cadenas β y γ del receptor de IL-2. El receptor para IL-2 lo conforman estas 2 subunidades mas una tercera subunidad de alta afinidad, la cadena α también llamada CD25 (de la Rosa, Rutz et al. 2004). Por otra parte, los linfocitos T vírgenes adquieren el receptor de alta afinidad para IL-2 luego de interactuar con las DCs. Por estas razones nos pareció importante evaluar el efecto de IL-4 en la secreción de IL-2 inducida por los diversos estímulos bacterianos en las DCs.

Los resultados obtenidos muestran que IL-4 afecta diferencialmente la secreción de IL-2 por las DCs, dependiendo de la cepa de origen de las DCs y del estímulo de activación considerado. En general podemos decir que las DCs producen cantidades muy pequeñas de IL-2 comparado a IL-12 e IL-10 y que al igual que para las otras citoquinas, bacterias vivas son más eficaces en la inducción de la secreción de IL-2 que productos bacterianos purificados. Es así como observamos que IL-4 inhibe la secreción IL-2 inducida por LPS

y LTA en DCs de ratones C57BL/6. Por el contrario, al utilizar *E. coli* como estímulo de activación, la secreción de IL-2 aumenta al doble cuando las DCs son estimuladas en presencia de IL-4 mientras que en estas mismas condiciones, la estimulación con *B. cereus* no parece tener mayor efecto en la secreción de IL-2. Cuando estos experimentos fueron realizados con DCs de ratones BALBc, observamos que la activación de las DCs con LPS, LTA, o *B. cereus* en presencia de IL-4 inhibe la secreción de IL-2, mientras que al utilizar *E. coli*, no se ven cambios frente a la acción de IL-4. Estos datos sugieren que el efecto preponderante de IL-4 es la inhibición de la secreción de IL-2 en las DCs pero que este efecto puede revertirse frente a una combinación específica de receptores TLR utilizados por una determinada cepa bacteriana. Por otra parte, en la literatura se ha reportado que las DCs de diferentes cepas de ratones presentan diferentes niveles de expresión de los receptores TLR (Liu, Matsuguchi et al. 2002), hecho que podría constituir una posible explicación de los resultados mostrados en esta Tesis. Sería interesante llevar a cabo este mismo tipo de experimento y analizar la población de LT activados para marcadores de LT reguladores.

Por otra parte cuando analizamos la secreción de IL-2 producida por efecto de IL-4 presente tanto en la diferenciación como en la activación de las DCs, observamos que independiente del estímulo activador de la DC, cuando IL-4 esta presente solo durante la etapa de activación se produce una inhibición de la secreción de IL-2 mientras que el efecto de IL-4 en la diferenciación de las DCs solo se manifiesta al producirse la activación de la DC y depende de la naturaleza del patógeno (Fig.7).

Cuando estudiamos la secreción de IL-2 en ratones KO IL-4R α demostramos que la inhibición de IL-2 es producida directamente por IL-4 mediante la señalización a través del IL-4R α . Sin embargo en estos experimentos hemos obtenido en forma reproducible una leve disminución de IL-2 en presencia de IL-4. Evidencias de la literatura (Nelms, Keegan et al. 1999; Lutz, Schnare et al. 2002) muestran que la función de IL-4 puede ser reemplazada en parte por IL-13. Esto es debido a que el IL-4R puede encontrarse en varias formas: como heterodímero IL-4R α unido al receptor γ c (Receptor de tipo I), o acoplado al IL-13R α (similar a IL-4R α de tipo II) Asimismo, existen evidencias que muestran la expresión del receptor de IL-13 α en las DCs (Lutz, Schnare et al. 2002). Por lo tanto, una posible explicación al efecto de IL-4 en DCs KO IL-4R α es que IL-4 sea capaz de señalizar en forma poco eficiente a través del IL-13R α para ejercer la inhibición de IL-2 en estas DCs.

IL-4 inhibe la secreción de IL-2 a nivel post-transcripcional

Al momento de evaluar el efecto de IL-4 en la expresión del RNAm de IL-2, se observó que tanto en DCs maduras con LPS como con bacterias vivas aumenta la expresión del RNAm de IL-2 en presencia de IL-4, contrariamente a lo que ocurre con la secreción de IL-2. Estos resultados indicarían que la inhibición en la secreción de IL-2 por DCs activadas con factores bacterianos purificados ocurre a nivel post-transcripcional (**Fig.10**). Existen varios mecanismos por los cuales IL-4 podría estar inhibiendo la secreción de IL-2 en las DCs. Una posibilidad es que IL-4 regule la producción de IL-2 a nivel de la traducción. Otra opción es que IL-2 se encuentre preformada en vesículas

dentro de las DCs y que la presencia de IL-4 durante el proceso de activación inhiba la liberación de estas vesículas. La existencia de vesículas preformadas al interior de las DCs se ha reportado anteriormente para IL-12 (Quinones, Ahuja et al. 2000), y el hecho de que IL-4 inhiba la secreción de IL-2 durante la activación de la DCs, independiente del estímulo utilizado abogan por esta última explicación.

Los resultados obtenidos en esta tesis confirman el doble papel que tiene IL-4 en el desarrollo de la respuesta inmune. Por una parte esta citoquina puede actuar directamente sobre las DCs induciendo principalmente la secreción de IL-12 e inhibiendo la secreción de IL-10, provocando por lo tanto una polarización de la respuesta inmune a Th1, mientras que IL-4 directamente sobre el LT CD4 induciría una respuesta de tipo Th2 (O'Garra 1998; Kalinski and Moser 2005). Hemos demostrado que IL-4 afecta en forma diferencial la producción de IL-2 por DCs estimuladas con diversos estímulos bacterianos, lo cual más que afectar el tipo de respuesta inmune que se produce, podría estar afectando el desarrollo de la respuesta inmune en sí a través de la activación de LT reguladores (de la Rosa, Rutz et al. 2004).

IL-4 es una citoquina producida por varios tipos de células las cuales se localizan en diferentes sitios anatómicos (Seder 1996; Nelms, Keegan et al. 1999). IL-4 puede afectar la respuesta inmune en diferentes etapas. Nuestros resultados muestran que una localización de células productoras de IL-4 en tejidos periféricos, al momento del inicio de la respuesta inmune, es decir durante el encuentro con el patógeno, podría afectar la activación de la DC dependiendo de la naturaleza del patógeno involucrado lo cual se manifestaría por el patrón de citoquinas secretado por la DC. Luego al encontrarse la DC

con el linfocito T virgen en el órgano linfoide secundario, las citoquinas producidas por las DCs afectarán el tipo de respuesta de los linfocitos T, pudiendo desarrollarse una respuesta de tipo Th1 o Th2, así como el desarrollo de tolerancia al antígeno (Banchereau and Steinman 1998). Por otra parte, la generación de una respuesta de tipo Th2 provoca en sí un aumento en la producción de IL-4 en el lugar de la infección. Sería interesante llegar a determinar el efecto de IL-4 en este microambiente. Es posible especular que IL-4 podría estar relacionada con la inactivación de la respuesta inmune a través de la producción de citoquinas que activen respuestas citotóxicas en contra de los linfocitos T efectores una vez producidas señales, que muestren que la infección producida por el patógeno ha sido controlada. Por lo tanto, estaríamos en presencia de una regulación negativa de la respuesta inmune, a través de la intervención de IL-4 (Kalinski and Moser 2005). Este estudio contribuye principalmente a demostrar que se necesitan estudios mucho más profundos para llegar a entender la función de IL-4 en la respuesta inmune y que la utilización de esta citoquina en protocolos de producción de DCs necesita de estos conocimientos. Resultados controversiales obtenidos por diferentes grupos trabajando en un elemento tan esencial de la respuesta inmune como son las células dendríticas podrían ser explicados en función de los resultados obtenidos en el curso de este trabajo.

CONCLUSIONES

En esta tesis se esclarecieron varios puntos respecto al efecto que ejerce IL-4 sobre la función de las DCs, y las condiciones en que estos efectos ocurren. Por otro lado, se abren nuevas interrogantes respecto al mecanismo de acción de IL-4 en la inducción de estos efectos, los cuales tendrán que ser determinados en estudios futuros. En resumen, las conclusiones más importantes de esta tesis son:

- IL-4 madura las DCs durante su diferenciación independiente de la cepa de origen de estas células
- La inducción de IL-12 a través de la inhibición de IL-10 en DCs depende directamente de IL-4 no importando la cepa de origen de estas células.
- La inhibición de IL-10 depende de la presencia de IL-4 durante la diferenciación de las DCs.
- La inducción de IL-12 depende de la presencia de IL-4 tanto durante la diferenciación como en la activación de las DCs.
- Existe otro mecanismo para la producción de IL-12 independiente de la inhibición de IL-10 por IL-4.
- IL-4 a través de su acción sobre las DCs induce un fenotipo Th1 en los LT
- La inhibición de IL-2 por IL-4 observada en DCs activadas ocurre a nivel post-transcripcional

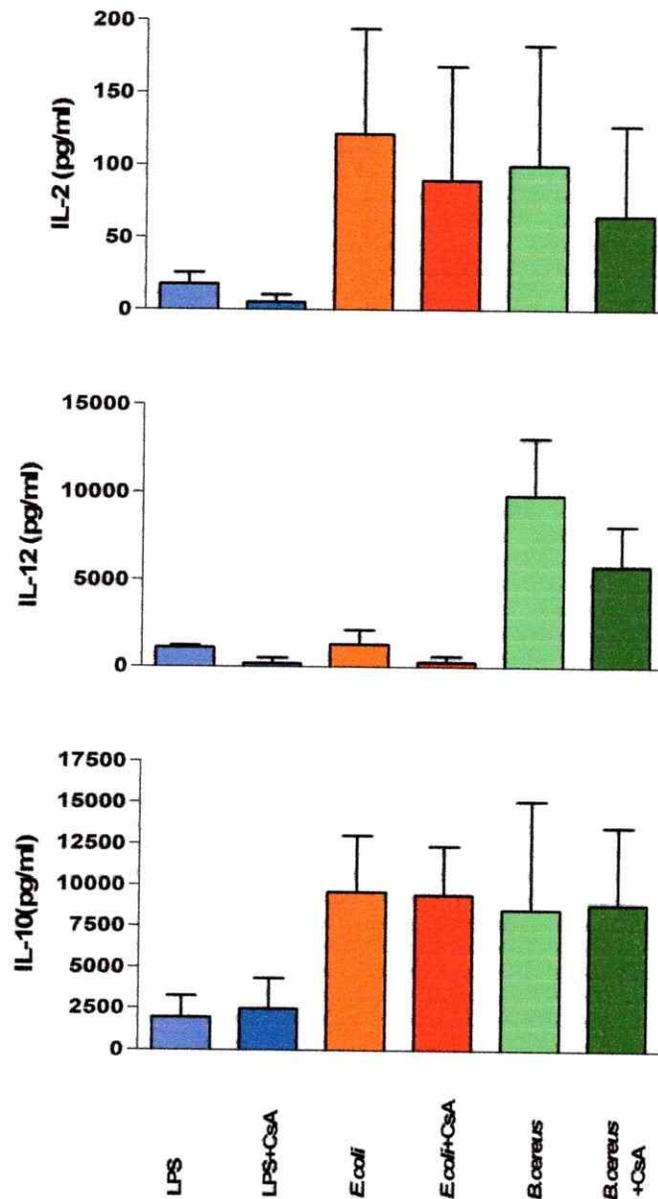
- La inhibición de IL-2 por IL-4 se mantiene en menor grado en KO IL-4R α , indicando que existe una señalización de IL-4 independiente del IL-4R α en estos ratones.
- CsA inhibe la secreción de IL-2 en DCs activadas con LPS pero no en DCs activadas con bacterias vivas.

REFERENCIAS

- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol 4(7): 499-511.
- Alexander, J. and K. Bryson (2005). "T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm." Immunol Lett 99(1): 17-23.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature 392(6673): 245-52.
- Caux, C., C. Massacrier, et al. (1994). "Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells." Int Immunol 6(8): 1177-85.
- de la Rosa, M., S. Rutz, et al. (2004). "Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function." Eur J Immunol 34(9): 2480-8.
- Fierro, A., J. R. Mora, et al. (2003). "Dendritic cells and the mode of action of anticalcineurinic drugs: an integrating hypothesis." Nephrol Dial Transplant 18(3): 467-8; discussion 469-70.
- Filippi, C., S. Hugues, et al. (2003). "CD4+ T cell polarization in mice is modulated by strain-specific major histocompatibility complex-independent differences within dendritic cells." J Exp Med 198(2): 201-9.
- Granucci, F., C. Vizzardelli, et al. (2001). "Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis." Nat Immunol 2(9): 882-8.
- Guler, M. L., N. G. Jacobson, et al. (1997). "T cell genetic background determines maintenance of IL-12 signaling: effects on BALB/c and B10.D2 T helper cell type 1 phenotype development." J Immunol 159(4): 1767-74.
- Hacker, H., H. Mischak, et al. (1998). "CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation." Embo J 17(21): 6230-40.
- Hessle, C., B. Andersson, et al. (2000). "Gram-positive bacteria are potent inducers of monocyte interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production." Infect Immun 68(6): 3581-6.
- Hochrein, H., M. O'Keeffe, et al. (2000). "Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells." J Exp Med 192(6): 823-33.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, et al. (1999). "Phylogenetic perspectives in innate immunity." Science 284(5418): 1313-8.
- Huang, Q., D. Liu, et al. (2001). "The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components." Science 294(5543): 870-5.
- Inaba, K., M. Inaba, et al. (1992). "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." J Exp Med 176(6): 1693-702.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 54 Pt 1: 1-13.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol 20: 197-216.
- Kalinski, P., C. M. Hilkens, et al. (1999). "T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal." Immunol Today 20(12): 561-7.

- Kalinski, P. and M. Moser (2005). "Consensual immunity: success-driven development of T-helper-1 and T-helper-2 responses." Nat Rev Immunol 5(3): 251-60.
- Kapsenberg, M. L. (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." Nat Rev Immunol 3(12): 984-93.
- Lennon-Dumenil, A. M., A. H. Bakker, et al. (2002). "Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation." J Exp Med 196(4): 529-40.
- Liu, T., T. Matsuguchi, et al. (2002). "Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice." Infect Immun 70(12): 6638-45.
- Lutz, M. B., N. Kukutsch, et al. (1999). "An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow." J Immunol Methods 223(1): 77-92.
- Lutz, M. B., M. Schnare, et al. (2002). "Differential functions of IL-4 receptor types I and II for dendritic cell maturation and IL-12 production and their dependency on GM-CSF." J Immunol 169(7): 3574-80.
- Lutz, M. B., R. M. Suri, et al. (2000). "Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo." Eur J Immunol 30(7): 1813-22.
- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol 1(2): 135-45.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature 388(6640): 394-7.
- Moser, M. and K. M. Murphy (2000). "Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development." Nat Immunol 1(3): 199-205.
- Nelms, K., A. D. Keegan, et al. (1999). "The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions." Annu Rev Immunol 17: 701-38.
- O'Garra, A. (1998). "Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets." Immunity 8(3): 275-83.
- Palucka, K. and J. Banchereau (2002). "How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses." Curr Opin Immunol 14(4): 420-31.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2004). "Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation." Immunity 21(5): 733-41.
- Pulendran, B., P. Kumar, et al. (2001). "Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo." J Immunol 167(9): 5067-76.
- Pulendran, B., J. L. Smith, et al. (1999). "Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 96(3): 1036-41.
- Qi, H., T. L. Denning, et al. (2003). "Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles." Infect Immun 71(6): 3337-42.
- Quinones, M., S. K. Ahuja, et al. (2000). "Preformed membrane-associated stores of interleukin (IL)-12 are a previously unrecognized source of bioactive IL-12 that is mobilized within minutes of contact with an intracellular parasite." J Exp Med 192(4): 507-16.
- Re, F. and J. L. Strominger (2004). "IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells." J Immunol 173(12): 7548-55.
- Reis e Sousa, C. (2001). "Dendritic cells as sensors of infection." Immunity 14(5): 495-8.
- Rogers, P. R. and M. Croft (1999). "Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance." J Immunol 163(3): 1205-13.

- Sallusto, F., P. Schaerli, et al. (1998). "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." Eur J Immunol **28**(9): 2760-9.
- Sauma, D., A. Fierro, et al. (2003). "Cyclosporine preconditions dendritic cells during differentiation and reduces IL-2 and IL-12 production following activation: a potential tolerogenic effect." Transplant Proc **35**(7): 2515-7.
- Sauma, D., P. Michea, et al. (2004). "Interleukin-4 selectively inhibits interleukin-2 secretion by lipopolysaccharide-activated dendritic cells." Scand J Immunol **59**(2): 183-9.
- Seder, R. A. (1996). "High-dose IL-2 and IL-15 enhance the in vitro priming of naive CD4+ T cells for IFN-gamma but have differential effects on priming for IL-4." J Immunol **156**(7): 2413-22.
- Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-61.
- Steinman, R. M., D. Hawiger, et al. (2003). "Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance." Ann N Y Acad Sci **987**: 15-25.
- Sugamura, K., H. Asao, et al. (1996). "The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID." Annu Rev Immunol **14**: 179-205.
- Szabo, S. J., A. S. Dighe, et al. (1997). "Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells." J Exp Med **185**(5): 817-24.
- Takeda, K., T. Kaisho, et al. (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-76.
- Trinchieri, G. (2003). "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **3**(2): 133-46.
- Winzler, C., P. Rovere, et al. (1997). "Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures." J Exp Med **185**(2): 317-28.
- Yao, Y., W. Li, et al. (2005). "Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells." J Exp Med **201**(12): 1899-903.
- Zheng, Y., C. N. Manzotti, et al. (2004). "CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells." J Immunol **172**(5): 2778-84.



Anexo 1. Efecto CsA en el patrón de citoquinas secretadas por DCs activadas con diversos estímulos bacterianos.

DCs provenientes de ratones C57BL/6 fueron diferenciadas y activadas en presencia (barras claras) o ausencia (barras oscuras) de CsA. La activación se llevo a cabo con LPS, *E. coli* o *B. cereus* durante 4h. Los niveles de IL-2, IL-12 e IL-10 presentes en los sobrenadantes se cuantificaron mediante ELISA de captura. Los gráficos muestran el promedio \pm DE de 3 experimentos independiente.