

UCH-FC  
Biotecnología  
M 828  
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO

**CAPACIDAD MIGRATORIA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS  
HUMANAS GENERADAS *EX VIVO* A PARTIR DE MONOCITOS  
DE SANGRE PERIFÉRICA Y TRATADAS CON DEXAMETASONA  
Y MPLA**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

**Rodrigo Alonso Morales Castro**

Director de Seminario de Título:  
Dr. Juan Carlos Aguillón Gutiérrez

Co-director de Seminario de Título:  
Dr. Diego Catalán Martina

Marzo del 2013  
Santiago – Chile



**INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO**

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Rodrigo Alonso Morales Castro

**“CAPACIDAD MIGRATORIA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS  
GENERADAS EX VIVO A PARTIR DE MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y  
TRATADAS CON DEXAMETASONA Y MPLA”**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

*Dr. Juan Carlos Aguillón Gutiérrez*  
**Director Seminario de Título**

*Dr. Diego Catalán Martina*  
**Co-director Seminario de Título**

*Dra. María Rosa Bono Merino*  
**Patrocinante Seminario de Título**

**Comisión de Evaluación**

*Dr. Miguel Allende Connelly*  
**Presidente Comisión**

*Dra. Daniela Sauma Mahaluf*  
**Evaluadora**

Santiago, Marzo del 2013.



A mis padres, Doris y Juan Luis.

Gracias por todo.

Los amo viejos.



## BIOGRAFÍA

Nacido en una lluviosa tarde de Abril de 1989, hijo primogénito de unos jóvenes e ilusionados padres, comenzó mi historia. De pequeño, en ese tiempo bastante inquieto, mis padres siempre fueron enseñándome nuevas cosas, entregándome así el don de la curiosidad y las ganas de aprender. De una infancia feliz, siempre bajo el cuidado de mis padres y la compañía de mi familia, fui creciendo y cimentando



las bases de la persona que sería a futuro. En el colegio, pronto a ingresar a la enseñanza media, conocí a un grupo de amigos muy importante para mí hasta hoy, con los cuales pasé una linda etapa en la que me fui formando como persona, fuimos viviendo nuevas experiencias y creciendo como hermanos, conociendo también nuevos espacios y realidades. En lo académico, junto con mi afición por la historia, la ciencia me llamó la atención al conocer aspectos básicos de la biología, por lo que tomé la opción de seguir una carrera científica, entrando a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular. Ya en la universidad, conocí a un nuevo y maravilloso grupo de personas, mi interés en la ciencia, especialmente la biología, fue consolidándose, y surgió en mí con mucha fuerza el deseo de enseñar, estando siempre presto a ayudar a quien lo necesitase. Es por eso que, al terminar mi carrera, creo que el camino a seguir está decidido, y sólo espero que el futuro venga con muchas nuevas vivencias para así seguir aprendiendo, que es al final mi gran pasión.

## AGRADECIMIENTOS



Hay tantas personas a las que debo agradecer en estos momentos, que podría escribir una tesis completa en ello. Pero seré breve y trataré de mencionar a todos los posibles.

En primer lugar, le agradezco al profesor Juan Carlos por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, y por darme la confianza y consejo durante el desarrollo del presente trabajo. También le agradezco a Diego, mi co-tutor, y a Karina, por todos los consejos y apoyo que me dieron cuando lo requería, siempre con una completa disposición a ayudar.

Le agradezco al IRTgroup, especialmente a Paulina y Lorena, mis guías en primera instancia y luego mis compañeras, y a Bárbara, por sus enseñanzas y por compartir muchas de las cosas que íbamos aprendiendo en este proceso. A la Sra. Nancy por su cariño, alegría y ayuda. Además a Asunción, Alex, Verónica, Pía, Jaxaira, Javier y Ashley por su buena disposición y su alegría.

Agradecimientos especiales le doy al Programa de Inmunología. A Norberto, Matías, Roberto, Pablo, Leandro y Fabián por su amistad, por todas esas conversaciones post-laboratorio y muchos consejos valiosos que me dieron. A Juanita, Garotinha, Macarena, Caro Hernández, Karina Kramm, Leo, Katherine, Tamara, Caro Behrens, Jimena, Eduardo, Gerardo, Fernando, Ismael, Cristián Falcón e Israel, por hacer del laboratorio no sólo un lugar de trabajo, sino que también un lugar muy grato para compartir.

Mis eternos agradecimientos a mis compañeros de carrera, por todo el tiempo que compartimos, tanto en clases, haciendo trabajos, y principalmente fuera de clases

y de la universidad, junto con tantas conversaciones y aprendizajes de vida. A Talo, Juanjo, Matías, Aliosha, Ariel, Claudia, Nati y Bea, por todas las vivencias y su amistad en cada momento. Además le agradezco a Vale, Cathy, Fran, Romi, Marlene, Maca, Joel, Hernán e Isma, por toda su buena onda y compañerismo, y en verdad, a todos: creo que de cada uno aprendí algo significativo.

A mis amigos Nicolás, Alfredo, Cayu, Juan y Juanjo, por todos los años de amistad que han pasado, desde que éramos unos mocosos, por esas innumerables y eternas conversaciones político-económico-vanales, y por darnos cuenta cómo hemos crecido en la vida y cómo la amistad es cada vez más grande. También a mis amigas Diana e Ivonne, por su tiempo, amistad y por el especial cariño que les tengo.

Y para finalizar, quiero agradecer a toda mi familia, en especial a los más cercanos, mis tíos Mabel y Kiko, a mis primos Eduardo y Natalia, a mi querida hermana Belén, y a los más importantes: a Doris y a Juan Luis, mis padres, por su infinito amor y paciencia, y por su formación. Sin duda que todo lo que soy y lo que he logrado se los debo a mis padres, razón por la cual les dedico este trabajo, como muestra de mi profundo amor y respeto hacia ellos.

## **FINANCIAMIENTO**

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunorregulación y Tolerancia (IRTgroup) del Programa Disciplinario de Inmunología, parte del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El trabajo contó con el financiamiento de los proyectos FONDECYT 1100102 y del Instituto Milenio en Inmunología e Inmunoterapia P09/016-F.

## ÍNDICE

BIOGRAFÍA .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
FINANCIAMIENTO.....	vi
ÍNDICE .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT .....	2
3. INTRODUCCIÓN .....	3
3.1. Células dendríticas .....	3
3.2. Generación y manipulación de DCs <i>in vitro</i> .....	6
3.3. Inducción de tolerancia en DCs <i>in vitro</i> .....	7
3.4. Quimioquinas y migración de DCs.....	8
3.5. Respuesta quimiotáctica de DCs tolerogénicas .....	13
4. HIPÓTESIS.....	15
5. OBJETIVOS .....	15
5.1. Objetivo general .....	15
5.2. Objetivos específicos.....	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
6.1. Generación de tDCs humanas a partir de monocitos de sangre periférica de donantes sanos, mediante el tratamiento con dexametasona y MPLA.....	16

6.2. Citometría de flujo.....	18
6.3. Análisis de secreción de citoquinas de DCs por ELISA.....	18
6.4. Ensayos de migración de DCs.....	19
6.5. Análisis estadístico. ....	21
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
7.1. Generación de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica.....	22
7.2. Caracterización de las DCs generadas <i>in vitro</i> y tratadas con dexametasona y MPLA.....	26
7.3. Expresión de receptores de quimioquinas en DCs ante los tratamientos con dexametasona y MPLA .....	29
7.4. Migración de DCs ante el tratamiento con dexametasona y MPLA.....	32
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
8.1. Diferenciación de monocitos a DCs .....	35
8.2. Perfil tolerogénico de +Dex+MPLA DCs .....	37
8.3. Expresión de receptores de quimioquinas en +Dex+MPLA DCs.....	39
8.4. Respuesta migratoria de +Dex+MPLA DCs .....	42
8.5. Proyecciones .....	45
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>47</b>
<b>10. REFERENCIAS .....</b>	<b>48</b>
<b>11. FIGURAS SUPLEMENTARIAS .....</b>	<b>57</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Migración de DCs mediada por quimioquinas .....	111
<b>Figura 2</b>	Esquema descriptivo del protocolo de generación de DCs.....	17
<b>Figura 3</b>	Ensayo de migración <i>in vitro</i> a través del sistema de membrana "Transwell" .....	21
<b>Figura 4</b>	Morfología de DCs obtenidas con distintos tratamientos a través microscopía óptica. ....	23
<b>Figura 5</b>	Morfología, viabilidad y pureza de los cultivos de DCs analizada por citometría de flujo.....	24
<b>Figura 6</b>	Diferencias en la expresión de CD11c y CD14 entre monocitos (Monoc) y los distintos tratamientos de DCs analizados por citometría de flujo .....	25
<b>Figura 7</b>	Fenotipo de las DCs en estudio analizado por citometría de flujo.....	28
<b>Figura 8</b>	Secreción de citoquinas en DCs ante los tratamientos con dexametasona y/o MPLA medido por ELISA.....	29
<b>Figura 9</b>	Expresión de receptores de quimioquinas en DCs tratadas con dexametasona y MPLA medido por citometría de flujo.....	32
<b>Figura 10</b>	Migración <i>in vitro</i> de DCs tratadas con dexametasona y MPLA evaluada mediante ensayos "Transwell" .....	34
<b>Figura S1</b>	Expresión de CXCR1 y CXCR2 en población granulocítica, medida por citometría de flujo.....	57
<b>Figura S2</b>	Expresión de CD1a en monocitos y los distintos tratamientos de DCs analizados por citometría de flujo .....	58

**Figura S3** Ensayos de alo-proliferación de los distintos tratamientos de DCs con linfocitos T CD4<sup>+</sup> analizados por citometría de flujo ..... 59

### ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1** Receptores de quimioquinas y sus ligandos..... 32

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>7-AAD</b>	7-aminoactinomicina.
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza.
<b>AR</b>	Artritis reumatoide.
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico.
<b>CFSE</b>	Carboxifluoresceina succinimidil éster.
<b>CIA</b>	Artritis inducida por colágeno.
<b>DC</b>	Célula dendrítica.
<b>Dex</b>	Dexametasona.
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima.
<b>FSC</b>	Inglés para "Forward scatter".
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
<b>HLA-DR</b>	Antígeno leucocitario humano DR.
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante.
<b>IDC</b>	Célula dendrítica inmadura.
<b>IFN</b>	Interferón.
<b>IL</b>	Interleuquina.
<b>IPC</b>	Célula productora de interferón.
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido.
<b>mDC</b>	Célula dendrítica madura.
<b>MFI</b>	Intensidad de fluorescencia media geométrica.
<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad.
<b>MIP-3<math>\beta</math></b>	Proteína inflamatoria de macrófago 3 beta.

<b>MPLA</b>	Monofosforil Lípido A
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear kappa B.
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino.
<b>RANTES</b>	Factor normalmente expresado y secretado por células T, y regulado en activación.
<b>rh</b>	Proteína humana recombinante.
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDF-1</b>	Factor derivado de célula estromal 1.
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino.
<b>SSC</b>	Inglés para "Side scatter".
<b>TCR</b>	Receptor de linfocito T.
<b>tDC</b>	Célula dendrítica tolerogénica.
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta.
<b>Th</b>	Linfocito T "helper".
<b>TLR</b>	Receptor de tipo "Toll".
<b>TMB</b>	Tetrametil bencidina.
<b>Tmig</b>	Tasa de migración.
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral.

## 1. RESUMEN

Las células dendríticas son las orquestadoras del sistema inmune, ya que son capaces de captar señales de su entorno y generar una respuesta de inmunidad o de tolerancia. Para llevar a cabo tales respuestas, estas células deben ser capaces de migrar, en primera instancia hacia la periferia o sitios de inflamación para captar antígenos, y luego hacia los órganos linfoides para presentar antígenos a los linfocitos T. La generación de células dendríticas tolerogénicas *in vitro* es una herramienta promisorio para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y rechazo a trasplante. La capacidad de estas células de migrar hacia órganos linfoides secundarios es vital para inducir una respuesta tolerogénica por parte de los linfocitos T, la que puede resultar en la anergia de linfocitos T efectoros o en la generación de linfocitos T reguladores. En el presente trabajo se estudió el perfil tolerogénico y la capacidad migratoria de células dendríticas humanas generadas *in vitro* y tratadas con dexametasona, un agente inmunomodulador, y luego activados con monofosforil lípido A (MPLA). Los resultados muestran que el tratamiento con dexametasona y MPLA le otorga a las células dendríticas humanas características tolerogénicas y la capacidad de expresar receptores de quimioquinas como CXCR4 y CCR7, relacionados con la migración a órganos linfoides secundarios, y de responder quimiotácticamente a los correspondientes ligandos, CXCL12 y CCL19. Estos resultados sugieren, por lo tanto, que estas células dendríticas tolerogénicas humanas, generadas y moduladas *in vitro*, poseen la capacidad de migrar en respuesta a mediadores involucrados en el inicio de la presentación antigénica, lo que constituye un resultado promisorio en el desarrollo de una futura terapia usando estas células.

## 2. ABSTRACT

Dendritic cells are the main orchestrators of the immune system, since they can sense signals from their environment and to generate either an immunogenic or a tolerogenic response. To carry out such responses, these cells must be capable to migrate, first towards peripheral tissues or inflammatory sites to capture antigens, and then to lymphoid organs in order to present these antigens to T lymphocytes. Generation of tolerogenic dendritic cells *in vitro* is a promising tool for the treatment of autoimmune diseases and graft rejection in transplantation. The capacity of these cells to migrate towards secondary lymph nodes is fundamental for eliciting a tolerogenic response in T lymphocytes, which can be manifested as anergy by effector T lymphocytes or the generation of regulatory T cells. In the present work, tolerogenic potential and the migratory ability of dendritic cells, generated *in vitro* and treated with the immunomodulator dexamethasone and then activated with monophosphoryl lipid A, were assessed. The results show that the treatment with both compounds conferred tolerogenic characteristics to human dendritic cells and the capacity to express CXCR4 and CCR7, chemokine receptors involved in the migration to secondary lymph nodes, and to respond chemotactically to CXCL12 and CCL19, their respective ligands. Therefore, these results suggest that these *in vitro*-generated and modulated human dendritic cells have the ability to migrate in response to mediators involved in the earlier stages of antigen presentation, which constitutes a promising step in the development of a future therapy using these cells.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Células dendríticas

Las células dendríticas (DCs) son un grupo de células presentadoras de antígenos profesionales, las cuales se caracterizan por su particular capacidad de activar linfocitos T vírgenes, produciendo una respuesta inmune primaria. Estas células actúan como nexo entre la inmunidad innata y adaptativa, pues detectan señales en la periferia (que pueden provenir de agentes externos o del mismo individuo) a través de receptores altamente conservados que reconocen patrones moleculares relacionados a patógenos o señales de peligro, procesan la información capturada y migran hacia estructuras especializadas presentes en el organismo, denominadas órganos linfoides, en donde entregan la información a linfocitos T, los cuales producen una potente respuesta antígeno-específica y permiten el establecimiento de la memoria inmunológica (Banchereau y col., 2000). El tipo de respuesta gatillada es específica, y dependerá del microambiente en que la DC capturó las señales en la periferia, pudiendo generarse una respuesta de inmunidad o de tolerancia (Banchereau y Steinman, 1998).

Las DCs pueden clasificarse, según su linaje, en células plasmacitoides o mieloides. Las DCs plasmacitoides se caracterizan por secretar altas cantidades de interferón-alfa (IFN- $\alpha$ ) en respuesta a virus, por lo que son conocidas también como células productoras de interferón (IPCs), mientras que las DCs de origen mieloides maduran rápidamente en respuesta a agonistas de receptores tipo Toll (TLRs), expresados en su superficie (Ziegler-Heitbrock y col., 2010). Además, las DCs pueden clasificarse según su localización anatómica, encontrándose las DCs epidérmicas o

células de Langerhans, DCs dermales o intersticiales, DCs marginales de bazo, DCs interdigitantes en linfonodos, DCs tímicas, DCs hepáticas y DCs sanguíneas (Banchereau y col., 2000); estas últimas corresponden al 0,16 - 0,68% de leucocitos circulantes en la sangre (Hasskamp y col., 2005). Las DCs de origen mielóide se caracterizan por una alta expresión de la integrina CD11c, que está involucrada en la adhesión de las DCs al tejido endotelial cercano a una respuesta inflamatoria (Coates y Thomson, 2002). Otro marcador relacionado al linaje mielóide de DCs es CD1a, el cual es miembro de la familia de moléculas similares a las del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I, y que participa en la presentación de moléculas lipídicas, siendo altamente expresado en células de Langerhans (DCs de piel y mucosas) y en DCs derivadas de monocitos (Brigl y Brenner, 2004, Tang y col., 2005); sin embargo existen DCs mieloides CD1a<sup>-</sup>, las cuales difieren de las DCs CD1a<sup>+</sup> en la secreción de citoquinas como interleuquina (IL)-12 (Cernadas y col., 2009).

En una respuesta inmunogénica gatillada por la detección de señales inflamatorias, que pueden ser foráneas [como lipopolisacárido (LPS), motivos múltiples de citosina-guanina demetiladas (CpG) o doble hebras de ARN] o generadas por células del sistema inmune innato [como IL-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral (TNF), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), entre otras], las DCs endocitan antígenos presentes en el microambiente circundante, y luego sufren un proceso de activación, en el que aumentan la expresión en la superficie celular de moléculas del MHC clase I y II cargadas con los antígenos procesados (Banchereau y col., 2000); además aumentan los niveles de expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, moléculas involucradas en la activación celular como CD40, y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-12, IL-23 e IL-6 (Caux y col., 1994; Jensen y Gad, 2010). La interacción del complejo MHC:péptido con el receptor del linfocito T (TCR), en conjunto

con la unión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) con su respectivo receptor en el linfocito T (CD28) y de CD40 con su ligando CD40L, junto con presencia de citoquinas proinflamatorias en el microambiente, conlleva a la activación de linfocitos T con función inmunogénica, y dependiendo de las citoquinas presentes en la presentación antigénica, los linfocitos T CD4+ pueden ser polarizados ya sea hacia un perfil T "helper" (Th)1, mediado por IL-12; Th2, mediado por IL-4; o bien Th17, mediado por IL-23, IL-6 y por el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Banchereau y Steinman, 1998; Kalinsky y col., 2010).

En contraste, en una respuesta tolerogénica, la ausencia de señales de peligro y/o la presencia de factores anti-inflamatorios al momento del encuentro con el antígeno, condiciona a las DCs a que expresen bajos niveles de moléculas coestimuladoras, además de expresar citoquinas con función anti-inflamatoria, como IL-10 y/o TGF- $\beta$ . Lo anterior conlleva a una presentación del antígeno a los linfocitos T en un contexto de baja señal coestimuladora y/o al entregar una señal inhibitoria, lo que tiene por consecuencia la muerte (delección) o el silenciamiento (anergia) de linfocitos T efectoras, o la generación de linfocitos T reguladores (Morelli y Thomson, 2007). Este modo de acción permite considerar a las DCs como un elemento fundamental en la mantención de la tolerancia periférica, ya que las DCs están constantemente capturando moléculas antigénicas propias del organismo en condiciones no inflamatorias (Förster y col., 2008) y presentando dichos antígenos a linfocitos T en un contexto de tolerancia, suprimiendo de esta forma la respuesta de linfocitos T autorreactivos, es decir, que reaccionan ante antígenos propios del organismo, y que evadieron los mecanismos de selección negativa en la tolerancia central (Worbs y Förster, 2007).

### 3.2. Generación y manipulación de DCs *in vitro*

Si bien las DCs representan un bajo porcentaje de las células del sistema inmune en la sangre, en la década de los 90 se describió un método que permite la diferenciación *in vitro* de monocitos de sangre periférica humana a DCs mediante el tratamiento con las citoquinas IL-4 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Sallusto y Lanzavecchia, 1994). La capacidad de diferenciar monocitos a DCs *in vitro*, sumado al crucial rol de estas últimas en la generación de una respuesta tanto inmunogénica como tolerogénica, las ha llevado a ser un blanco atractivo para el desarrollo de inmunoterapias contra condiciones como cáncer, autoinmunidad y rechazo a trasplantes, entre otras (Nestle, 2000; Figdor y col., 2004; Morelli y Thomson, 2007; Kalinski y col., 2009; Hilkens y col., 2010; Moreau y col., 2012).

En el estudio de DCs generadas *in vitro* a partir de monocitos, se han empleado diversos agentes para provocar la maduración de ellas y la consecuente generación de una respuesta inmunogénica efectora. Dentro de estos agentes se pueden encontrar el cóctel de citoquinas compuesto por el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Jonuleit y col., 1997); CD40L y agonistas de receptores de tipo toll (TLRs) como poly I:C, R848 y principalmente lipopolisacárido (LPS), los que han sido descritos como potentes inductores de IL-12 y de una consiguiente respuesta del tipo Th1 (Cella y col., 1996; Boullart y col., 2008; Dauer y col., 2008). Sin embargo, para el desarrollo de inmunoterapias en humanos, se debe utilizar compuestos que cumplan con condiciones clínicas, minimizando posibles efectos secundarios en los pacientes a tratar. Es por ello que para la maduración de las DCs para uso clínico, la utilización de LPS, no es aceptable, pues presenta una alta toxicidad, considerándose en su reemplazo el uso de otros agentes que cumplan una función equivalente. Tal es

el caso del monofosforil lípido A (MPLA), un derivado de la región lípido A del LPS que conserva la región inmunológicamente activa, pero es de baja toxicidad en comparación al LPS (Evans y col., 2003). Ambas moléculas son agonistas del receptor de inmunidad innata TLR-4, sin embargo la diferencia en toxicidad de ambas moléculas radicaría en el reclutamiento preferencial de la proteína adaptadora TRIF en la activación de TLR-4 mediada por MPLA, en contraste al reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88 en la activación de TLR-4 mediada por LPS (Mata-Haro y col., 2007), y en la consecuente activación de la vía de la MAP quinasa p38 (Cekic y col., 2009). El MPLA ha sido caracterizado como un activador de DCs y linfocitos T (Ismaili y col., 2002) y ha sido utilizado como adyuvante para el desarrollo de vacunas (Drachenberg y col., 2002; Dubensky y Reed, 2010).

### **3.3. Inducción de tolerancia en DCs *in vitro***

Como se mencionó previamente, la manipulación de DCs también se ha enfocado en la generación de células con un perfil tolerogénico. Se describe a las DCs tolerogénicas (tDCs) como células inmaduras o semi-maduras, resistentes a la maduración, o activadas de forma alternativa, que se caracterizan por la expresión baja o intermedia de moléculas coestimuladoras, la baja secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-12, junto con una alta secreción de la citoquina IL-10. Lo anterior conllevaría a que estas células tengan la capacidad de generar linfocitos T reguladores productores de IL-10 (Morelli y Thomson, 2007). Para lograr desarrollar estas DCs *in vitro*, diversos grupos se han enfocado en la utilización de distintos métodos; éstos incluyen la modificación genética de DCs con citoquinas anti-inflamatorias virales o proteínas de fusión (Lu y col., 1999; Garrod y col., 2006), tratamiento en cultivo con citoquinas antiinflamatorias (Torres-Aguilar y col., 2010) o la exposición a agentes

farmacológicos (Hackstein y Thomson, 2004). Respecto a lo último, uno de los agentes farmacológicos descritos para la generación de tDCs es el glucocorticoide dexametasona. Los glucocorticoides han sido utilizados ampliamente en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y en la prevención del rechazo a trasplante, y su mecanismo de acción es regular negativamente los componentes de la vía de señalización del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, involucrada en la maduración de DCs (Matasic y col., 1999; Xiao-Kui y col., 2010). Como consecuencia, el uso de dexametasona provoca en DCs la inducción de un fenotipo tolerogénico, caracterizado por la baja expresión de moléculas coestimuladoras, la elevada secreción de IL-10 y una baja respuesta de linfocitos T alo-reactivos (Matyszak y col., 2000; Xia y col., 2005; Unger y col., 2009). Además, se ha documentado que la dexametasona promueve la generación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> del tipo Th2, en desmedro de una respuesta Th1 (Franchimont, 2004).

La activación alternativa, uno de los métodos de generación de tDCs, consiste en la estimulación de estas células con un agente inmunosupresor en conjunto con un estímulo de maduración, con el objetivo de generar DCs *in vitro* con un fenotipo tolerogénico y estable, el cual no sea afectado *in vivo* ante los estímulos inflamatorios propios del receptor de las células (Rea y col., 2000). Respecto a lo anterior, se ha documentado el uso de MPLA, en conjunto con dexametasona y vitamina D3, como inductor de una activación alternativa en DCs generadas a partir de monocitos de pacientes con artritis reumatoide (AR) (Harry y col., 2010).

#### **3.4. Quimioquinas y migración de DCs**

Importante en la función de las DCs es su capacidad de migración. Como se mencionó previamente, las DCs tienen la capacidad de localizarse en distintos sitios

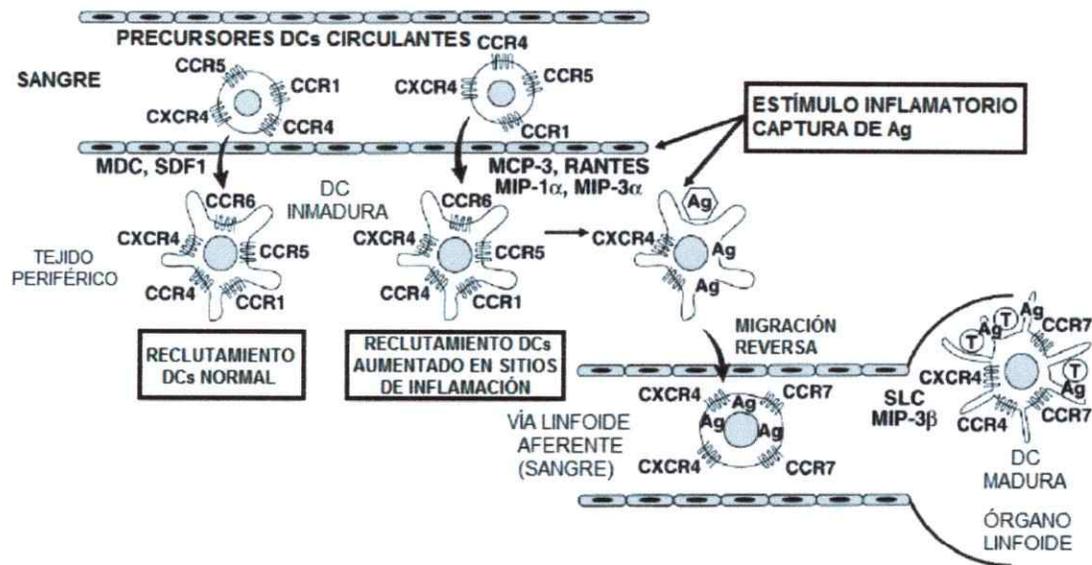
del organismo, lo que les permite vigilar y detectar agentes foráneos en la periferia, siendo capaces luego de salir de los sitios de inflamación y migrar hacia linfonodos, con el fin de presentar los antígenos capturados y activar la respuesta inmune adaptativa (Steinman y col., 2003).

La migración de las DCs es dependiente de quimioquinas (Caux y col., 2000), las cuales son proteínas de bajo peso molecular que tienen como función principal mediar la migración celular a través de la unión a sus receptores expresados diferencialmente en leucocitos (Zlotnik y Yoshie, 2012). Los receptores de quimioquinas son estructuras proteicas de transmembrana pertenecientes a la familia de receptores asociados a proteínas G (Baggiolini y col., 1997). La interacción de la quimioquina con su receptor produce cambios en los niveles de segundos mensajeros en el citoplasma celular, llevando a la activación de proteínas quinasas y al reordenamiento de proteínas del citoesqueleto (Sato y col., 2001). Las quimioquinas pueden ser clasificadas estructuralmente de acuerdo al patrón de cisteína en la zona N-terminal de su cadena peptídica, encontrándose las quimioquinas del tipo CC, CXC, C y CX3C, donde "C" indica un residuo de cisteína y "X" denota un aminoácido distinto (Zlotnik y Yoshie, 2000). También pueden ser catalogadas funcionalmente como inflamatorias u homeostáticas: las primeras son inducibles en eventos inflamatorios y tienen como función la migración de leucocitos hacia dichas zonas de inflamación, mientras que las segundas son expresadas constitutivamente, y permiten la recirculación de leucocitos hacia órganos linfoides secundarios (Gunn, 2003). Sin embargo, la clasificación anterior no es absoluta, pues existen quimioquinas que pueden cumplir una función dual, es decir, pueden ser homeostáticas y ser sobreexpresadas ante un evento inflamatorio, o viceversa (Zlotnik y Yoshie, 2012). La expresión de receptores de quimioquinas es variable en las distintas células

leucocitarias, y está asociada a la función que éstas cumplan. Lo anterior también se aplica en la distintas poblaciones de DCs: por ejemplo, CCR6 es expresado por células de Langerhans, y su ligando, CCL20, es altamente expresado por queratinocitos al producirse lesiones dérmicas, promoviendo la migración de estas células a zonas de inflamación (Cavanagh y Von Adrian, 2002).

Las DCs inmaduras, que tienen una alta capacidad endocítica y expresan bajos niveles de moléculas coestimuladoras, expresan receptores de quimioquinas como CXCR1, CCR1, CCR2 y CCR5 (Sallusto y col., 1998), que responden a quimioquinas proinflamatorias, tales como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 y CCL8, entre otras (Sozzani y col., 1997), y dirigen la migración de las DCs a tejidos periféricos o a zonas de inflamación para la captura de antígenos (Caux y col., 2000, Figura 1). En procesos inflamatorios originados en enfermedades autoinmunes como en AR, se ha descrito un aumento en los niveles de quimioquinas como CCL5 y CCL15 en el tejido sinovial, las cuales están involucradas en la acumulación de leucocitos con alta expresión de CCR1 y CCR5 en esas zonas (Haringman y col., 2006). Por tal motivo se han realizado ensayos clínicos utilizando bloqueadores de receptores de quimioquinas como CCR1, CCR2 y CCR5, con el fin de evitar la acumulación de leucocitos, principalmente monocitos, en esas zonas y disminuir la respuesta inflamatoria local (Szekanecz y col., 2010).

Al detectar señales de peligro y procesar antígenos en un evento inflamatorio, las DCs sufren un proceso de maduración, en el cual disminuyen la expresión de los receptores para quimioquinas proinflamatorias y se induce la expresión del receptor de quimioquina CCR7 (Yanagihara y col., 1998, Figura 1). Este último receptor es el principal responsable de la migración de DCs hacia órganos linfoides secundarios (Saeki y col., 1999), en donde se produce la presentación antigénica a los linfocitos T.



**Figura 1. Migración de DCs mediada por quimioquinas.** Las DCs circulantes o los precursores de DCs expresan receptores de quimioquinas como CXCR4, CCR1 y CCR5, y se localizan en la periferia en respuesta a quimioquinas secretadas en condiciones basales como SDF-1/CXCL12 (reclutamiento homeostático de DCs) o ante quimioquinas generadas como respuesta a un evento inflamatorio, como MIP-1α/CCL3 o RANTES/CCL5. Al capturar un antígeno, las DCs sufren un cambio en la expresión de receptores de quimioquinas, expresando CXCR4 y CCR7, lo que les permite la migración hacia órganos linfoides secundarios para llevar a cabo la presentación antigénica. Imagen modificada de Sozzani y col., 1999.

Existen dos ligandos conocidos para CCR7: CCL19 y CCL21. CCL19 es expresado en las áreas de localización de linfocitos T en órganos linfoides secundarios, mientras que CCL21 es expresado por células endoteliales de las vías linfáticas aferentes (Cravens y Lipsky, 2002). Es importante destacar que CCR7 es expresado también por linfocitos T vírgenes, lo cual permite la co-localización de éstos con DCs en órganos linfoides durante la presentación antigénica, además de linfocitos B vírgenes, timocitos durante algunos estadios del desarrollo, y por células T de memoria central (Förster y col., 2008). Además, la expresión de CCR7 en DCs ha sido también involucrada con la inhibición de la apoptosis (Sánchez-Sánchez y col., 2004) y el control de la velocidad de migración de las DCs mediante el reordenamiento de filamentos de actina (Riol-

Blanco y col., 2005). El rol *in vivo* de CCR7 ha sido estudiado en ratones donde el gen de CCR7 ha sido eliminado (CCR7<sup>-/-</sup>). Estos ratones tienen una arquitectura tímica anormal y son propensos a generar una respuesta autoinmune generalizada, caracterizada por la presencia de linfocitos T y B infiltrando tejidos periféricos y la generación de estructuras linfoides terciarias, además de elevadas cantidades de autoanticuerpos circulantes en dichos tejidos (Davalos-Misslitz y col., 2007). Estas observaciones indican que CCR7 también participa en la generación de la tolerancia central.

En DCs maduras se ha descrito, junto con la expresión de CCR7, el aumento en la expresión del receptor de quimioquina CXCR4 (Sallusto y col., 1998, Figura 1), presente en bajos niveles en DCs inmaduras. Su ligando, CXCL12, es expresado en diversos órganos y tejidos como hígado, riñón, médula ósea, órganos linfoides, músculos, fibroblastos derivados de tejidos epiteliales, y en regiones del sistema nervioso central, permitiendo la migración basal de leucocitos y de células progenitoras, que expresan CXCR4, hacia estos tejidos (Kucia y col., 2004). Las DCs maduras tienen una alta respuesta quimiotáctica ante CXCL12 (Lin y col., 1998; Ricart y col., 2011), sin embargo, el aumento en la expresión de CXCR4 en estas células y la función que tendría este comportamiento no es del todo conocida, aunque se plantea que participaría en el inicio de la migración de DCs a linfonodos secundarios (Kabashima y col., 2007; Torzicky y col., 2012). Estudios realizados en ratones *plt*, que carecen de los ligandos para CCR7, muestran que las DCs son capaces de migrar hacia órganos linfoides secundarios de manera independiente de CCR7, aunque en menor medida que en ratones silvestres (Gunn, 2003; Förster y col., 2008). Otra función asociada a la expresión de CXCR4 en DCs, además de la participación en la migración hacia linfonodos, está relacionada con la supervivencia de estas células a través

de la inhibición del factor de transcripción FOXO3, involucrado en la activación de señales apoptóticas en DCs (Delgado-Martín y col., 2011).

### **3.5. Respuesta quimiotáctica de DCs tolerogénicas**

Los trabajos iniciales realizados en el área de trasplante en modelos murinos, mostraban que las tDCs ejercían una actividad supresora *in vitro*. Sin embargo, tales resultados no pudieron ser validados al evaluar la respuesta, gatillada por DCs tolerogénicas, en experimentos *in vivo*, por lo que era necesario entender el mecanismo por el cual estas DCs podían tener efecto sobre linfocitos T *in vivo* (Buonocore y col., 2002; Coates y Thomoson, 2002). La respuesta a esta controversia fue entregada en el trabajo de Garrod y col. (2006), en donde se muestra que la expresión, inducida mediante manipulación genética, del receptor CCR7 en tDCs generadas *in vitro* tiene por consecuencia el aumento en la sobrevida de alotrasplantes de corazón, en un modelo murino. Este trabajo se suma a publicaciones previas en donde se demuestra que la migración de DCs hacia linfonodos juega un rol importante en la inducción de una respuesta inmune como también de tolerancia (Bai y col., 2002; Ochando y col., 2005), ya que las DCs inmaduras o en estado estacionario constantemente están capturando antígenos foráneos o propios, incluso sin la presencia de un estímulo inflamatorio, y movilizándose en baja frecuencia hacia vías linfáticas aferentes (Förster y col., 2008). Todo lo anterior apunta a que las tDCs deben ser capaces de migrar a órganos linfoides secundarios para inducir tolerancia, y que la expresión de CCR7 sería importante para este fin. En ese sentido, se ha descrito que la "activación alternativa" de las DCs induce la expresión de CCR7 (Sordi y col., 2006; Anderson y col., 2009; Unger y col., 2009), y que estas células son capaces de provocar la sobrevida de alotrasplantes en ratones (Emmer y col., 2006).

En base a lo mencionado previamente, el presente trabajo tuvo como objetivo el estudio de las propiedades migratorias de DCs humanas generadas *in vitro* a partir de monocitos, las cuales han sido tratadas con dexametasona, con el fin de inducir propiedades tolerogénicas, y con MPLA, un agente inmunoestimulador de uso clínico. Este conocimiento será de utilidad para determinar la funcionalidad de estas DCs, previo a la implementación de una inmunoterapia basada en la utilización de estas células.

#### 4. HIPÓTESIS

Las células dendríticas humanas tratadas con dexametasona y con monofosforil lípido A (MPLA) poseen propiedades tolerogénicas y un patrón de migración asociado al tráfico hacia órganos linfoides secundarios.

#### 5. OBJETIVOS

##### 5.1. Objetivo general

Caracterizar fenotípicamente la expresión de receptores de quimioquinas y la capacidad migratoria de células dendríticas humanas generadas *ex vivo* a partir de monocitos y tratadas con dexametasona y MPLA.

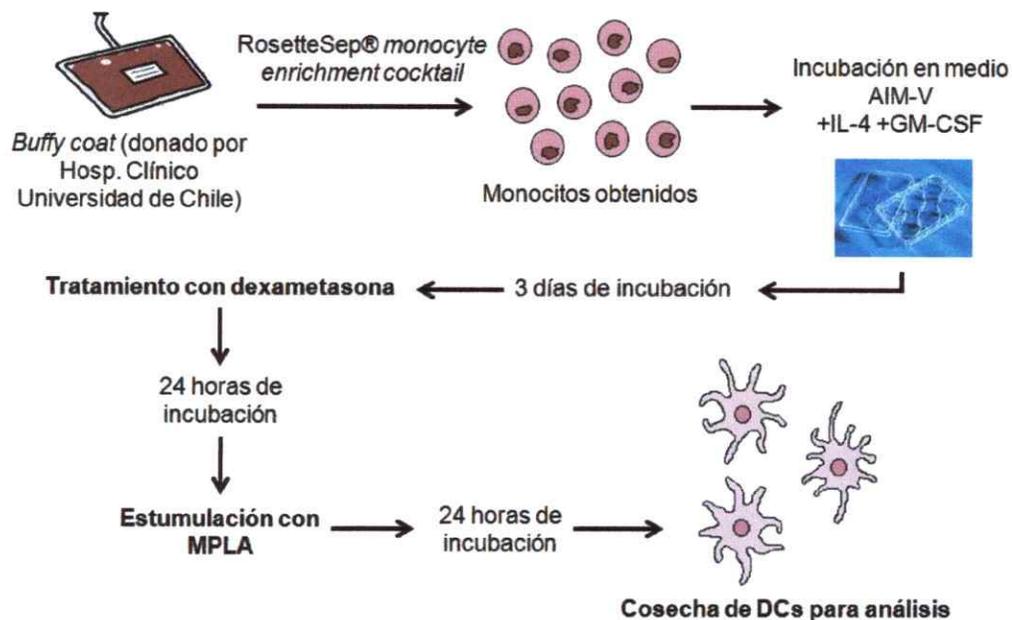
##### 5.2. Objetivos específicos

- 5.2.1. Obtener células dendríticas humanas con características tolerogénicas a partir de monocitos de sangre periférica de donantes sanos, mediante el tratamiento con dexametasona y MPLA.
- 5.2.2. Analizar la expresión de receptores de quimioquinas en células dendríticas tratadas con dexametasona y MPLA.
- 5.2.3. Determinar *in vitro* la respuesta quimiotáctica de células dendríticas tratadas con dexametasona y MPLA frente a quimioquinas proinflamatorias y homeostáticas.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Generación de tDCs humanas a partir de monocitos de sangre periférica de donantes sanos, mediante el tratamiento con dexametasona y MPLA.

El esquema de generación de DCs humanas a partir de monocitos se muestra en la Figura 2. Muestras de concentrados leucocitarios ("buffy coats") de sangre periférica de donantes sanos fueron obtenidas del Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, bajo los protocolos establecidos por dicha institución. Para la obtención de monocitos, las muestras fueron procesadas mediante el uso del cóctel de enriquecimiento por selección negativa RosetteSep (StemCell, Vancouver, Canadá), siguiendo las indicaciones del fabricante. La fracción enriquecida en monocitos fue diluida en tampón PBS ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2,0 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10,0 mM; NaCl 1,55 M) suplementado con 2% v/v de suero fetal bovino (SFB, Hyclone, Logan, UT, EUA) y fue centrifugada por 5 minutos a 1400 rpm. El precipitado celular fue resuspendido en solución de ACK ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,5 M;  $\text{KHCO}_3$  0,1 M;  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  1,0 mM) e incubado durante 8 minutos a temperatura ambiente para lisis remanentes eritrocitarios. Luego, las células fueron centrifugadas por 5 minutos a 1400 rpm, resuspendidas en PBS-SFB 2% v/v, y las células vivas fueron cuantificadas utilizando el método de exclusión de azul tripán en cámara de Neubauer (Hausser Scientific, Horsham, PA, EUA). Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 900 rpm por 10 minutos, para la eliminación de plaquetas. Las células obtenidas fueron resuspendidas en medio AIM-V (Gibco BRT, Grand Island, NY, EUA) a una concentración de  $2\text{-}2,5 \times 10^6$  células por mL, suplementado con las citoquinas recombinantes humanas (rh)IL-4 y rhGM-CSF (ambas de eBioscience, San Diego, CA, EUA), a una



**Figura 2. Esquema descriptivo del protocolo de generación de DCs.** A partir de "buffy coats" se obtuvieron monocitos por selección negativa, y luego fueron cultivados en medio AIM-V en presencia de GM-CSF e IL-4 por un tiempo de 5 días. Al día 3 el medio de cultivo fue renovado y las células fueron tratadas con dexametasona, y 24 horas después fueron tratadas con MPLA. Después de 24 horas, durante el día 5, las células fueron cosechadas para análisis.

concentración de 500 U/mL cada una. El cultivo celular se realizó en placas de 6 pocillos (2,5 mL de cultivo por pocillo; Nunc, Roskilde, Países Bajos) e incubado a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 5 días. Al día 3 de cultivo, el medio fue renovado completamente por 2,5 mL de AIM-V con 500 U/mL de tanto IL-4 y GM-CSF, y luego fue suplementado con dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a una concentración final de 1 µM. Luego de 24 horas de incubación, las células fueron estimuladas con MPLA (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, EUA) a una concentración final de 1 µg/mL, por 24 horas adicionales. Al día siguiente, correspondiente al quinto día de cultivo, se observó la morfología de las DCs en un microscopio óptico (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se tomaron fotografías usando una cámara fotográfica digital Sony Cyber-shot DSC-S2000. Las DCs fueron cosechadas mediante lavados repetitivos de cada

pocillo con tampón PBS, cuantificadas con cámara de Neubauer, y preparadas para posteriores análisis.

## **6.2. Citometría de flujo**

Los anticuerpos utilizados en este trabajo fueron los siguientes: anti( $\alpha$ -) CD11c APC,  $\alpha$ -CD14 FITC,  $\alpha$ -CD40 FITC,  $\alpha$ -CD80 FITC,  $\alpha$ -CD83 FITC,  $\alpha$ -CD86 PE,  $\alpha$ -HLA-DR FITC,  $\alpha$ -CXCR1 FITC,  $\alpha$ -CXCR2 PE, CXCR4 PE, CCR5 PE, CCR7 PE (eBioscience); CCR1 PE (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA); CCR2 PerCP/Cy5.5 (Biolegend, San Diego, CA, EUA).

Posterior a la cosecha,  $2 \times 10^5$  DCs fueron transferidas a placas de 96 pocillos con fondo cónico (Nunc), centrifugadas a 2000 rpm por 2 minutos a 4°C, y resuspendidas en PBS-SFB al 10% v/v. Luego, las células fueron incubadas con los anticuerpos antes mencionados por 45 minutos, a 4°C y en oscuridad. Al término de la incubación dichas DCs fueron lavadas 2 veces con PBS + 3% SFB v/v. Por otro lado, las DCs se incubaron con 7-aminoactinomicina D (7-AAD; eBioscience) y  $\alpha$ -CD11c APC para analizar su viabilidad. Las células fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACSCalibur, usando el programa computacional CellQuest Pro (Beckton Dickinson, Mountain View, CA, EUA), y el análisis posterior de las muestras fue realizado usando el programa WinMDI 2.9 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA).

## **6.3. Análisis de secreción de citoquinas de DCs por ELISA**

Sobrenadantes del día 5 de cultivo de generación de DCs fueron alicuotados y guardados a -80°C. Luego se cuantificaron las citoquinas IL-10 e IL-12 secretadas por las DCs mediante ensayos de ELISA tipo "sándwich". Los anticuerpos  $\alpha$ -IL-10 y  $\alpha$ -IL-

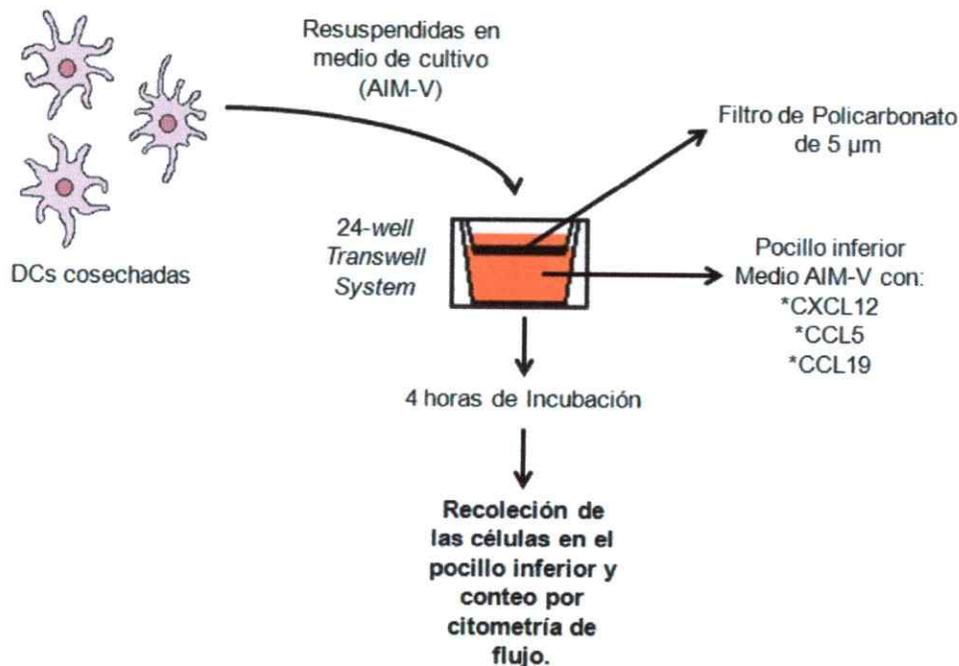
12p70 (captura),  $\alpha$ -IL-10-Biotina y  $\alpha$ -IL-12p40-Biotina (detección), las citoquinas rhIL-10 y rhIL-12, y la enzima HRP conjugada con avidina fueron provistos por eBioscience. En placas de 96 pocillos transparentes y con fondo plano MaxiSorp (Nunc) se incubó 1  $\mu$ g/mL de anticuerpo de captura a 4°C durante una noche, se lavó con PBS suplementado con Tween 20 (US Biologicals, Swampscott, MA, EUA) al 0,05% v/v y se dejó bloqueando la placa con PBS suplementado con albúmina de suero bovino (BSA; Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA, EUA) al 0,5% p/v. Luego de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, la placa fue lavada y cargada con las muestras previamente descongeladas y con su respectiva curva de calibración estándar, dejando en incubación por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la placa fue lavada y cargada con 1  $\mu$ g/mL de anticuerpo de detección y con avidina-HRP y fue dejada en incubación por 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad, lavando exhaustivamente luego de la incubación. A continuación se agregó el sustrato TMB (Biolegend) y se dejó en incubación en oscuridad hasta que los puntos más altos llegaron a una densidad óptica (DO), medida a 620 nm, de 0,9. Para detener la reacción enzimática se agregó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, y la solución cambió de color azul a amarillo. Finalmente se midió la DO a 450 nm, normalizada con la DO a 620 nm, en un lector de absorbancia para placas (Tecan, Männedorf, Suiza).

#### **6.4. Ensayos de migración de DCs**

La capacidad migratoria de las DCs generadas *in vitro* fue evaluada mediante ensayos de "Transwell", utilizando placas de 24 pocillos con insertos de 6,5 mm de diámetro que en su fondo poseían una membrana de policarbonato con poros de 5  $\mu$ m (Corning Costar, Corning, NY, EUA). El protocolo realizado se basó en lo descrito por Putz y col. (2006). En primer lugar, 600  $\mu$ L de medio AIM-V suplementado con las

quimioquinas RANTES/CCL5, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 ó MIP-3 $\beta$ /CCL19 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA), a una concentración de 250 ng/mL, fue adicionado a los pocillos de la placa o pocillos inferiores del sistema. Luego, los insertos fueron colocados sobre cada pocillo, y 100  $\mu$ L de medio AIM-V con  $1,5 \times 10^5$  DCs sometidas a los distintos tratamientos fueron agregados en los insertos o pocillos superiores. El sistema fue dejado en incubación por 4 horas a 37°C y a 5% de CO<sub>2</sub>, y luego de ese tiempo los insertos fueron retirados y la parte inferior de la membrana, en contacto con el medio suplementado con quimioquina, fue enjuagada cuidadosamente con el mismo medio con el que estaba en contacto. La migración de DCs desde el pocillo superior al pocillo inferior del sistema fue medido mediante citometría de flujo: para ello, se adquirió en el equipo FACSCalibur la cantidad de células presentes en el pocillo inferior del sistema manteniendo constantes tanto la velocidad del flujo del equipo (velocidad "MED" de 35  $\mu$ L/min) como el tiempo de adquisición de datos (3 minutos) en todas las mediciones, con el fin de comparar las diferencias entre el total de las células adquiridas por el equipo. Para los análisis se definió la variable "Tasa de migración" (Tmig), que corresponde al cuociente entre células que migran de manera específica a una quimioquina y células que migran hacia medio sin quimioquina.

$$T_{mig} (\text{quimioquina}) = \frac{\# \text{ células que migran hacia quimioquina específica}}{\# \text{ células que migran hacia medio sin quimioquina}}$$



**Figura 3. Ensayo de migración *in vitro* a través del sistema de membrana "Transwell".** Las DCs obtenidas ( $1,5 \times 10^6$ ) fueron plaqueadas en el pocillo superior de sistema, mientras que en el pocillo inferior fue colocado medio suplementado con quimioquinas. Luego de 4 horas de incubación, las células presentes en el pocillo inferior fueron cosechadas y contadas por citometría de flujo.

#### 6.5. Análisis estadístico.

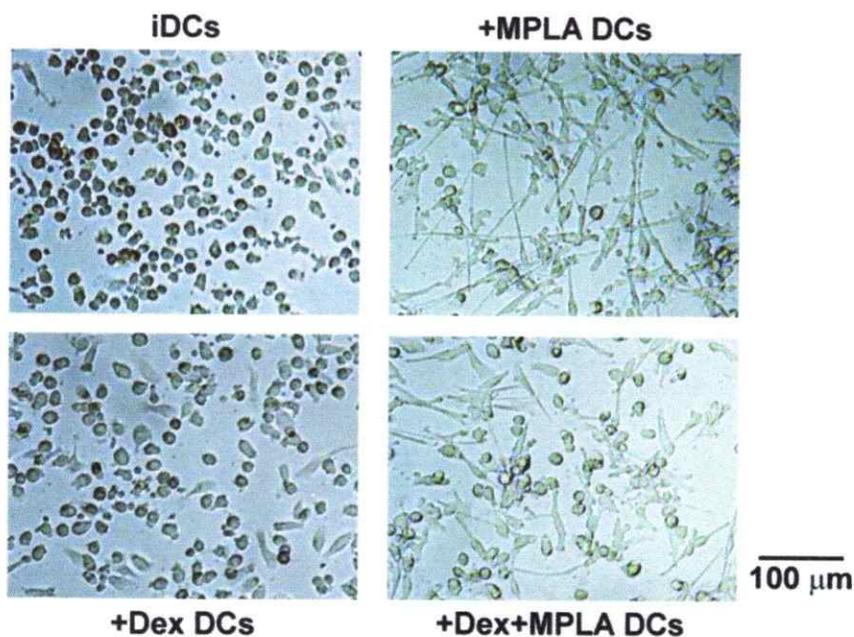
Las diferencias entre los distintos tratamientos de las DCs para todos los ensayos fue realizado mediante análisis de ANOVA de 1 vía para mediciones repetidas. Para los casos en que el análisis de ANOVA dio como resultado  $p < 0,05$ , se realizó una post-prueba de Tukey, a excepción de los ensayos de migración en donde se analizó mediante ensayos de t pareado de 2 colas cuando se cumplía con el criterio de significancia del ANOVA. Los análisis se realizaron utilizando el programa computacional Prism v5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Generación de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica

La diferenciación de monocitos a DCs se llevó a cabo *in vitro* usando las citoquinas IL-4 y GM-CSF, tal como se ha descrito previamente (Sallusto y Lanzavecchia, 1994). La pureza inicial de los monocitos cultivados de acuerdo a la expresión del marcador CD14 fue >75%, acorde a lo descrito por el fabricante del producto de enriquecimiento. Durante el tiempo de diferenciación de monocitos a DCs, las células fueron estimuladas con dexametasona y MPLA, obteniendo al día 5 de cultivo 4 condiciones de DCs: los controles sin tratamiento (iDC), tratadas con MPLA (+MPLA DC) y tratadas con dexametasona (+Dex DC); y las células de interés tratadas tanto con dexametasona y MPLA (+Dex+MPLA DC).

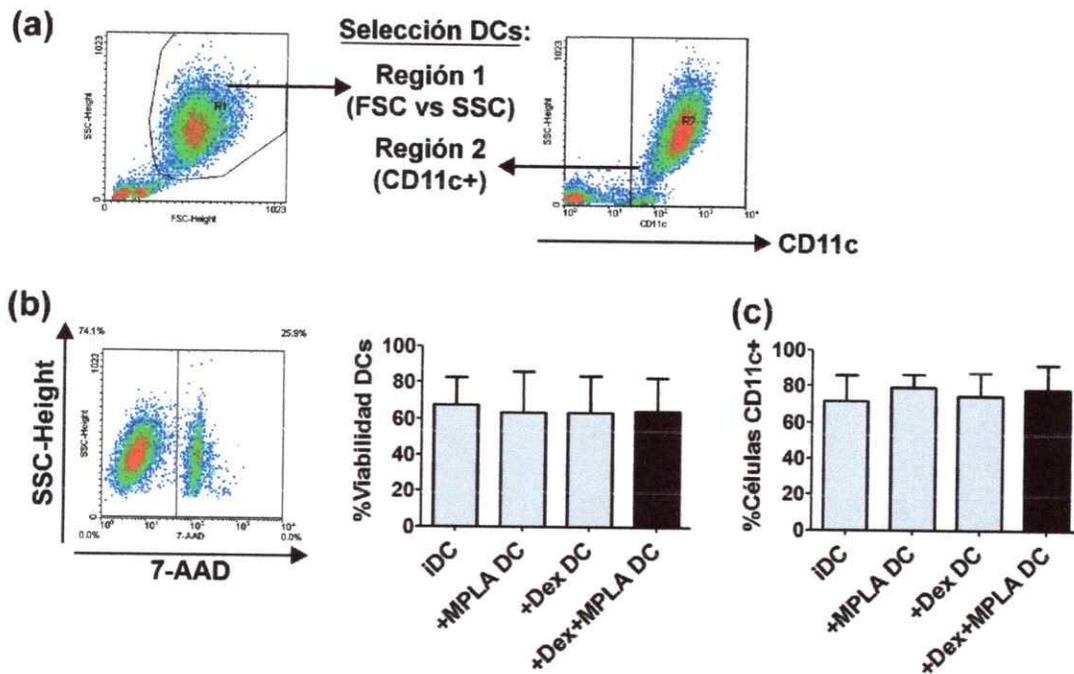
Al día 5 de cultivo, previo a la cosecha de las DCs, se evaluó la morfología de éstas en todas las condiciones evaluadas. Como lo ilustra la Figura 4, tanto iDCs como +Dex DCs muestran una forma redonda, mientras que +MPLA DCs presentan largas prolongaciones cuando se encuentran adheridas a la placa. Las +Dex+MPLA DCs, por otra parte, presentan una morfología alargada, pero visualmente menor en comparación a +MPLA DCs.



**Figura 4. Morfología de DCs obtenidas con distintos tratamientos a través microscopía óptica** . Previo a la cosecha de las DCs, al día 5, se observó la forma de estas células en la placa de cultivo a través de un microscopio óptico, y campos representativos fueron fotografiados. Zoom óptico de 100X. La barra de la esquina inferior derecha (100  $\mu$ M) representa la escala métrica de las fotografías tomadas.

Al momento de cosechar las DCs, se pudo notar que tanto iDCs como +Dex DCs estaban fuertemente adheridas al fondo de la placa, por lo que eran difíciles de cosechar. Las DCs tratadas con MPLA también estaban fuertemente adheridas, pero al momento de cosecharlas eran fáciles de despegar del fondo de la placa; esto mismo fue notado al cosechar +Dex+MPLA DCs. Esta observación es concordante a lo descrito por Raich-Regué y col. (2011).

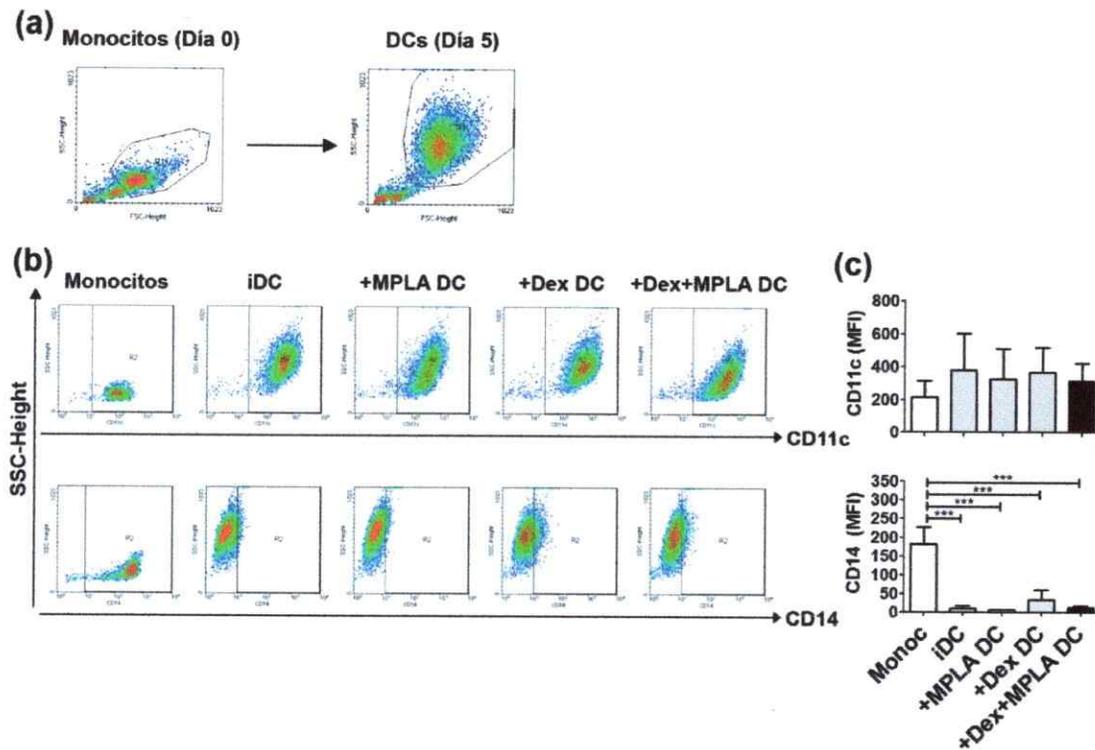
Posterior a la cosecha de las DCs, se analizó la viabilidad y la pureza de estas células por citometría de flujo, mediante marcaje con 7-AAD y CD11c respectivamente (Figura 5). Para ello, se establecieron 2 criterios para seleccionar las DCs en estos análisis (Figura 5.a): el primero fue seleccionar las células a través de parámetros de



**Figura 5. Morfología, viabilidad y pureza de los cultivos de DCs analizada por citometría de flujo. (a)** Criterios de selección de regiones por parámetros de tamaño (FSC) y granularidad (SSC, "density plot" izquierdo) y por selección de los eventos CD11c<sup>+</sup> ("density plot" derecho). **(b)** Viabilidad, medida por 7-AAD, de los eventos seleccionados por los 2 criterios antes mencionados, mostrando un "density plot" representativo para el marcaje y un gráfico del porcentaje de células vivas o negativas para 7-AAD. **(c)** Gráfico del porcentaje de pureza de las DCs obtenidas, considerando las células vivas. Las barras de los gráficos representan la desviación estándar de los datos. n = 5 para ambos gráficos.

tamaño y granularidad (FSC y SSC, respectivamente), mientras que el segundo fue por selección de eventos CD11c<sup>+</sup>. Usando estos criterios en conjunto se logró observar que las células obtenidas tenían similar porcentaje de viabilidad, cercano al 70%, independiente del tratamiento durante el cultivo (Figura 5.b). El porcentaje de DCs obtenidas fue calculado excluyendo los eventos 7-AAD<sup>+</sup> (células muertas) en los eventos CD11c<sup>+</sup>, y resultó ser cercano al 75% para todas las condiciones estudiadas (Figura 5.c).

A pesar de que el primer criterio de selección de DCs (tamaño y granularidad), da como resultado sobre un 97% de células CD11c<sup>+</sup>, en las evaluaciones posteriores



**Figura 6. Diferencias en la expresión de CD11c y CD14 entre monocitos (Monoc) y los distintos tratamientos de DCs analizados por citometría de flujo.** (a) "Density plots" de FSC y SSC representativos para monocitos (izquierda) y DCs (derecha). (b) Imágenes representativas de la expresión de CD11c y CD14 de monocitos y de las DCs generadas bajo los distintos tratamientos. (c) Gráficos de MFI para CD11c (n = 8) y CD14 (n=10). \*\*\* p < 0,001.

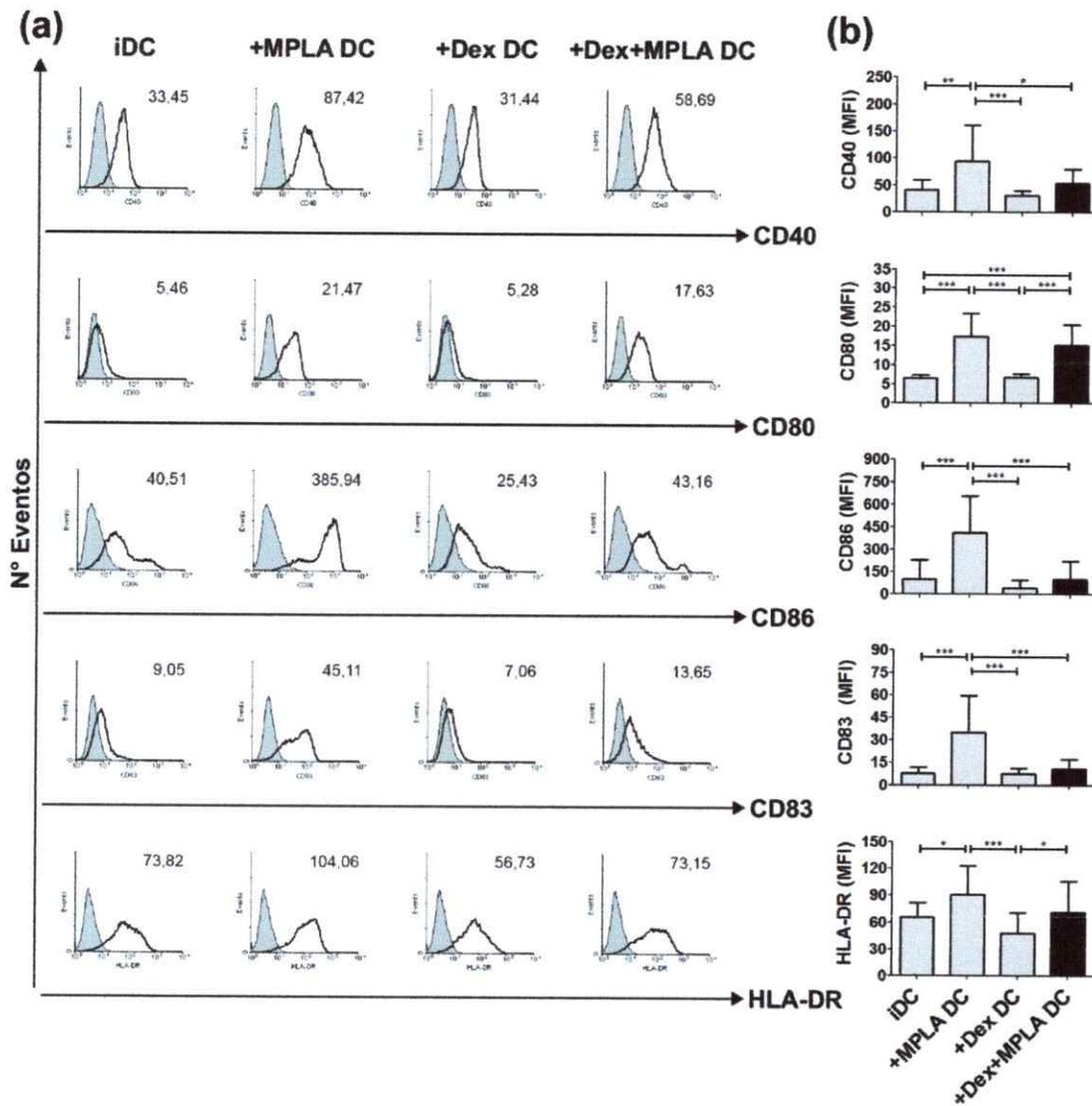
los eventos considerados como DCs son los que cumplen con los dos criterios mencionados, salvo que sea mencionado en el experimento.

La diferenciación de monocitos a DCs fue evaluada a través de la expresión de CD11c y CD14, medida por citometría de flujo (Figura 6). Los resultados muestran que tanto monocitos como las DCs cultivadas bajo las distintas condiciones son CD11c<sup>+</sup>, sin embargo las DCs tienen un nivel de expresión de CD14 muy bajo, en contraste con los monocitos, los cuales expresan altos niveles de CD14. Cabe mencionar que las DCs tratadas con dexametasona presentan una leve expresión de CD14, aunque esta es mucho menor en comparación a monocitos (p<0,001).

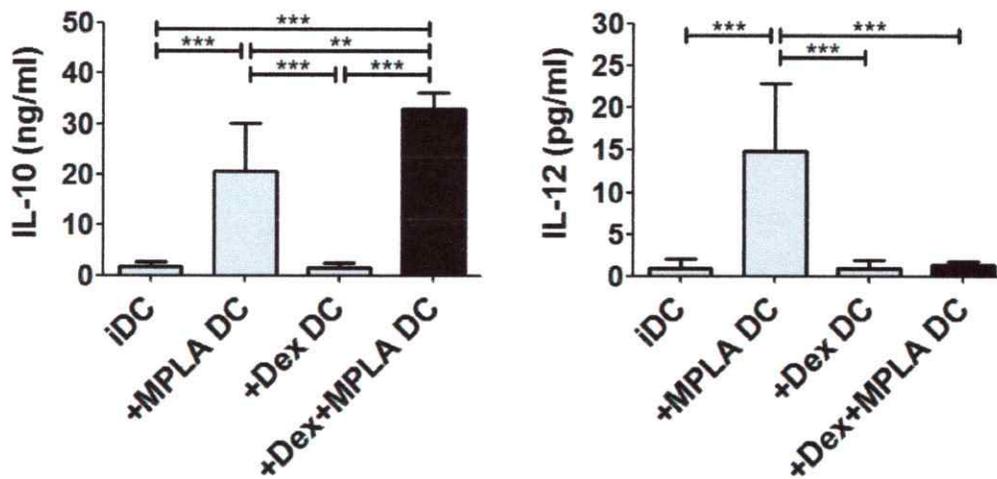
## 7.2. Caracterización de las DCs generadas *in vitro* y tratadas con dexametasona y MPLA

Para determinar si las DCs obtenidas mediante el tratamiento con dexametasona y MPLA cumplían con parámetros asociados a tolerancia, se midió en éstas la expresión del marcador de maduración CD83, de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, de la molécula activadora CD40, y de la molécula del complejo principal de histocompatibilidad clase II humano HLA-DR, usando como parámetro de medición la intensidad media de fluorescencia determinada por citometría de flujo (MFI, Figura 7). Las DCs tratadas con MPLA expresan altos niveles de todas las moléculas antes mencionadas (MFI promedio de 94,39 para CD40; 17,53 para CD80; 410,36 para CD86; 34,90 para CD83 y 90,96 para HLA-DR), y el aumento es significativo en comparación a iDCs ( $p < 0,05$  para HLA-DR;  $p < 0,01$  para CD40;  $p < 0,001$  para CD80, CD83 y CD86). El tratamiento con dexametasona (+Dex DCs) mantuvo bajos los niveles de expresión de estas moléculas, comparables con iDCs ( $p > 0,05$  para todos los casos) y significativamente menor que +MPLA DCs ( $p < 0,001$  para todos los casos). El tratamiento con dexametasona y MPLA indujo en DCs una alta expresión de las moléculas CD80 y HLA-DR, comparable a +MPLA DCs, pero a la vez presentan bajos niveles de CD40, CD86 y CD83, comparable con iDCs, +Dex DCs, y significativamente menor que +MPLA DCs. A pesar de lo anterior, el promedio de los datos de MFI obtenidos sugiere una tendencia de +Dex+MPLA DCs de expresar menores niveles de CD80 y HLA-DR (15,20 para CD80 y 71,78 para HLA-DR), comparado a +MPLA DCs, y de expresar mayores niveles de CD40 (53,80), respecto a iDCs y +Dex DCs (41,09 y 31,15, respectivamente).

Un aspecto importante en la función de las DCs es el patrón de citoquinas que estas secretan. Es por ese motivo que se analizaron los niveles de IL-10 e IL-12 en el medio de cultivo de DCs mediante ensayos de ELISA (Figura 8). Se puede apreciar que el tratamiento con MPLA genera un aumento en la secreción de IL-10 al día 5 de cultivo, alcanzando un promedio de 20,81 ng/mL en el medio, mientras que el tratamiento con MPLA de aquellas DCs incubadas previamente con dexametasona induce un aumento aún mayor en la secreción de esta citoquina, alcanzando un nivel de secreción promedio en el cultivo de 32,92 ng/mL. Tanto iDCs como +Dex DCs secretan una menor cantidad de esta citoquina (1,74 ng/mL y 1,51 ng/mL, respectivamente), comparado con las condiciones tratadas con MPLA. Para el caso de IL-12, se observa que únicamente el estímulo de maduración con MPLA fue capaz de inducir la secreción de dicha citoquina (14,90 pg/mL), y que el tratamiento con dexametasona previo al tratamiento con MPLA impidió la secreción de IL-12 por parte de las DCs, quedando en niveles comparables a iDCs y +Dex DCs. Cabe mencionar que la cantidad de IL-12 secretada por las DCs, comparada a IL-10, es muy baja, estando en el límite de detección del ensayo de ELISA en los sobrenadantes de iDCs, +Dex DCs y +Dex+MPLA DCs, y siendo más elevada en +MPLA DCs.



**Figura 7. Fenotipo de las DCs en estudio analizado por citometría de flujo.** (a) Histogramas representativos para los marcadores de superficie estudiados, mostrando el marcaje del anticuerpo respectivo (línea negra) junto al valor de MFI, y de su isotipo (curva gris). (b) Gráficos de MFI  $\pm$  desviación estándar para cada marcador de superficie estudiado (n = 10 para CD40, CD80 y CD83; n = 8 para CD86 y HLA-DR). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.



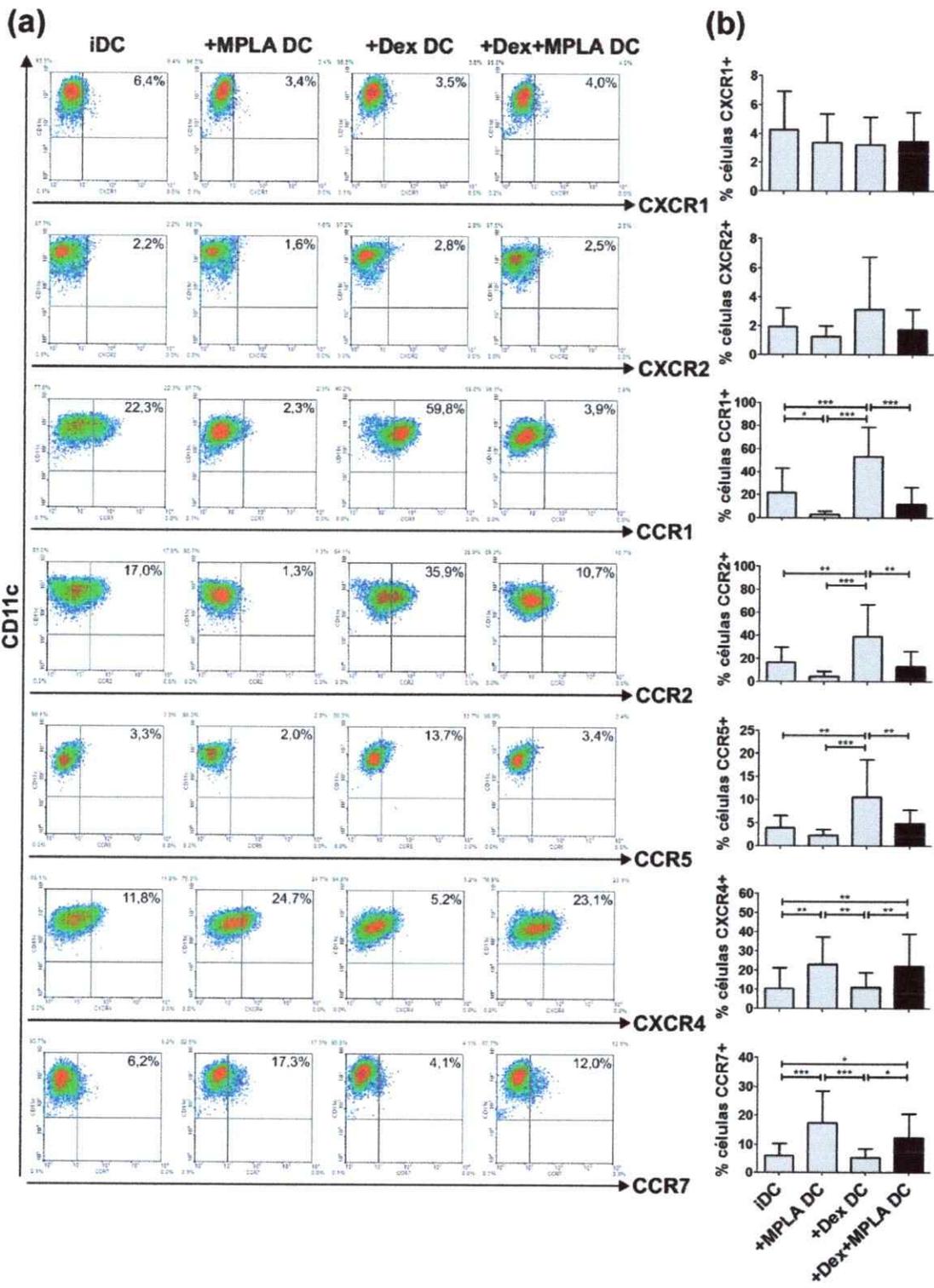
**Figura 8. Secreción de citoquinas en DCs ante los tratamientos con dexametasona y/o MPLA medido por ELISA.** Sobrenadantes del día 5 de cultivo de DCs fueron colectados, y en ellos fue medida la concentración de las citoquinas IL-10 e IL-12p70 mediante un ensayo de ELISA tipo "sandwich". Las barras de los gráficos corresponden a la desviación estándar de los datos analizados. n = 5 para ambas mediciones. \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

### 7.3. Expresión de receptores de quimioquinas en DCs ante los tratamientos con dexametasona y MPLA

Para conocer la potencial capacidad migratoria de las DCs sometidas a distintos tratamientos, se analizó la expresión de receptores de quimioquinas en éstas a través de citometría de flujo (Figura 9). Los receptores analizados han sido previamente descritos en DCs generadas *in vitro* a partir de monocitos y orquestan la migración de estas células dependiendo del estado de maduración que tengan (Caux y col., 2000). Para el análisis se consideró el porcentaje de DCs positivas para cada receptor, generando las regiones positivas y negativas a través de la marca del isotipo respectivo para cada anticuerpo utilizado. En el presente estudio se observó que los receptores de IL-8, CXCR1 y CXCR2, están expresados en bajos niveles en todos los tratamientos de las DCs. Similarmente, se observó una ligera expresión de CXCR1 en

iDCs, aunque tal diferencia no fue significativamente distinta al resto de los tratamientos (Figura 9). Como control positivo de tinción se marcaron células de sangre total con ambos anticuerpos, seleccionando la población granulocítica, la cual presenta alta expresión de ambos receptores (Figura S1).

Respecto a los otros receptores analizados, fue posible notar que la expresión de CCR1, CCR2 y CCR5, receptores para quimioquinas inflamatorias, fue alta en +Dex DCs, en contraste a los otros tratamientos. En detalle, para el caso de iDCs se observó una alta expresión sólo de CCR1 (21,92% promedio) al compararlo con el control de células maduras +MPLA DCs (promedio de 2,95%;  $p < 0,05$ ), mientras que la expresión de CCR2 y CCR5 fue baja en iDCs, con porcentajes promedio de células positivas de 16,43% y 3,97% para respectivo receptor, no encontrándose diferencias con +MPLA DCs, a pesar de que éstas tuvieron en promedio una menor expresión para CCR2 y CCR5 (4,41% y 2,26% respectivamente). El estímulo con MPLA de +Dex DCs provocó la disminución en la expresión de estos 3 receptores ( $p < 0,001$  para CCR1 y  $p < 0,01$  para CCR2 y CCR5 respecto a +Dex DCs) (Figura 9). En contraste a lo anterior, la expresión de los receptores para quimioquinas CXCR4 y CCR7 fue alta en +MPLA DCs, con promedios de células positivas para CXCR4 de 23,13% y para CCR7 de 17,44%, y baja en los controles iDCs (10,55% y 6,12% respectivamente) y +Dex DCs (11,08% y 5,45% respectivamente), mientras +Dex+MPLA DCs presentaron un porcentaje de expresión de 22,07% para CXCR4 y de 12,32% para CCR7, siendo significativamente mayor respecto a los controles iDC y +Dex DC para ambos casos, y comparables a +MPLA DCs, aunque el promedio resultó levemente menor para el caso de CCR7 (Figura 9).



**Figura 9. Expresión de receptores de quimioquinas en DCs tratadas con dexametasona y MPLA medido por citometría de flujo. (a)** "Density plots" representativos para cada receptor en las DCs obtenidas bajo distintos tratamientos, con el correspondiente porcentaje de DCs positivas para cada caso (esquina superior derecha de cada imagen). **(b)** Gráficos de porcentaje de células positivas  $\pm$  desviación estándar para cada receptor de quimioquina estudiado en las DCs (n = 10 para CXCR1, CXCR2, CCR1, CCR2, CCR5 y CCR7; n = 12 para CXCR4). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

#### 7.4. Migración de DCs ante el tratamiento con dexametasona y MPLA

La funcionalidad de los receptores antes analizados fue evaluada a través de ensayos de migración *in vitro* utilizando las DCs obtenidas en las distintas condiciones de cultivo. Para ello se escogieron las quimioquinas RANTES/CCL5, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 y MIP-3 $\beta$ /CCL19, descritas como quimioattractantes de DCs y con respuesta diferencial relativo al estado de maduración de éstas (Sozzani y col., 1998). Los receptores estudiados con los cuales interactúa cada quimioquina se muestran en la Tabla 1.

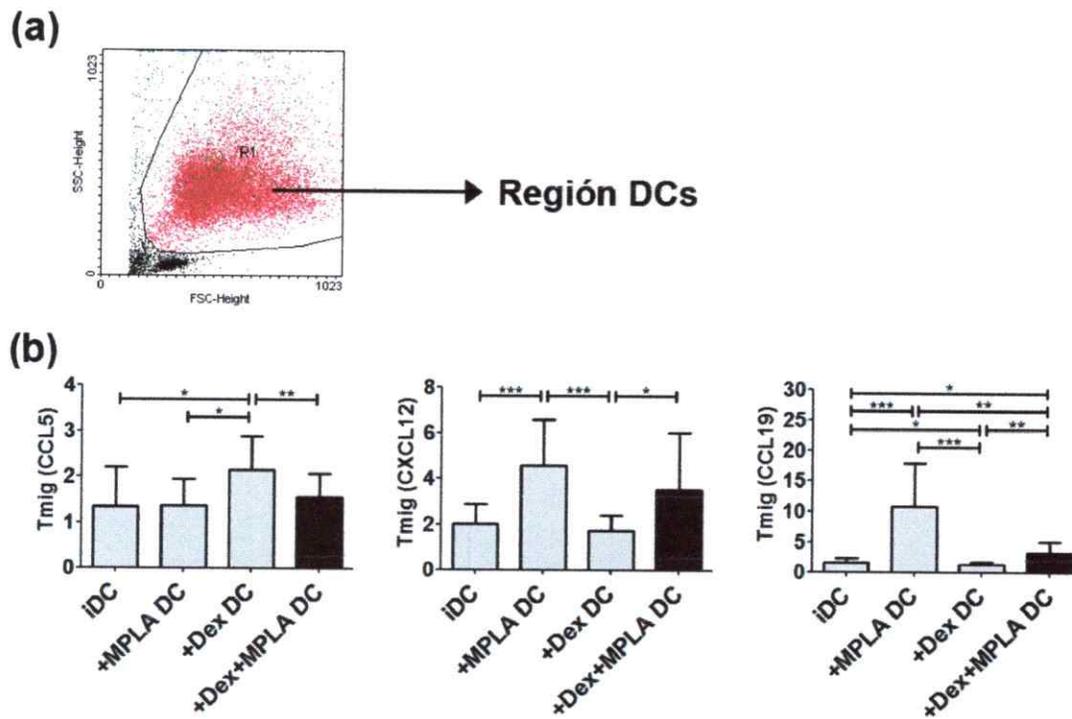
**Tabla 1. Receptores de quimioquinas y sus ligandos.** En la tabla se detallan sólo los receptores estudiados en el trabajo, que han sido descritos en poblaciones de DCs previamente.

Quimioquina	Receptor	Referencias
RANTES/CCL5	CCR1, CCR5	Sozzani y col., 1998
SDF-1 $\alpha$ /CXCL12	CXCR4	Delgado y col., 1998; Sallusto y col., 1998
MIP-3 $\beta$ /CCL19	CCR7	Sozzani y col., 1998

El experimento y la obtención de los datos de migración fueron realizados de la forma descrita por Putz y col. (2006), utilizando cámaras "Transwell" de similares características y analizando los datos a través de citometría de flujo. Para el análisis de

migración de DCs se contó las células de la región que por el criterio de tamaño y granularidad correspondían a DCs (Figura 10.a). Con este criterio, se calculó la Tmig de cada uno de los tratamientos de DCs obtenidos, es decir, el cociente entre la cantidad de células dentro de la región definida que migran de manera específica en respuesta a una quimioquina y las células de la misma región que migran hacia el medio sin quimioquina.

El análisis de migración (Figura 10.b) muestra que +Dex DCs son las únicas que tienen una respuesta elevada hacia CCL5, con un Tmig promedio de 2,16, respecto a los otros tratamientos de DCs (Tmig promedio de 1,34 para iDCs, 1,35 para +Dex DCs y 1,56 para +Dex+MPLA DCs). De la misma forma, +MPLA DCs son capaces de migrar tanto hacia CXCL12 (Tmig de 4,60) como hacia CCL19 (Tmig de 10,79), si se compara con iDCs (Tmig de 2,03 para CXCL12 y de 1,64 para CCL19) y +Dex DCs (Tmig de 1,72 para CXCL12 y de 1,34 para CCL19). El tratamiento con MPLA de +Dex DCs genera un cambio en el patrón de migración, es decir, las DCs dejan de responder hacia CCL5 ( $p < 0,01$ ) y son capaces de migrar hacia CCL19 y a CXCL12 (Tmig promedio de 3,23 y 3,54, respectivamente), aunque esta capacidad fue significativamente menor para el caso de CCL19 ( $p < 0,05$ ) y similar para CXCL12, al compararlas con +MPLA DCs.



**Figura 10. Migración *in vitro* de DCs tratadas con dexametasona y MPLA evaluada mediante ensayos "Transwell".** (a) "Dot plot" en donde se muestra la región seleccionada para el conteo de DCs migratorias, realizado por citometría de flujo. (b) Migración de DCs obtenidas en respuesta a 250 ng/mL de CCL5, CXCL12 y CCL19. Gráficos de Tasa de migración (Tmig)  $\pm$  desviación estándar son mostrados para las DCs en respuesta a cada quimioquina (n = 6 para cada experimento). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

## 8. DISCUSIÓN

El uso de DCs tolerogénicas se ha convertido en una interesante estrategia para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y para evitar rechazo a trasplantes. Lo anterior ha sido probado en modelos animales (Hilkens y col., 2010; Moreau y col., 2012), y ha llevado a la conducción de los primeros ensayos clínicos aplicando estas células (Giannoukakis y col., 2011). Antes de llegar a una etapa clínica, es necesario conocer características funcionales de las tDCs que predigan una acción promisorias en la posible terapia a desarrollar.

La presente memoria de título tuvo como objetivo analizar la capacidad migratoria de DCs generadas *ex vivo* a partir de monocitos de sangre periférica y que cumplen con un perfil tolerogénico, el cual fue inducido por medio del tratamiento con el glucocorticoide dexametasona y con el agente de maduración MPLA. Antes de analizar dichas características, se estudió el perfil que poseían las DCs generadas, ya sea en la expresión de moléculas coestimuladoras y del complejo principal de histocompatibilidad clase II, como en la secreción de citoquinas como IL-10 e IL-12, y con ello evaluar la adquisición de propiedades tolerogénicas por parte de las DCs generadas.

### 8.1. Diferenciación de monocitos a DCs

Se observó que al día 5 y final del cultivo, las DCs obtenidas difieren de los monocitos en la expresión de CD14, disminuyendo ésta en todas las condiciones evaluadas. Sólo las +Dex DCs mostraron una leve expresión de dicho receptor. Durante la realización del presente trabajo, se detectó que las DCs obtenidas no sólo

presentan niveles bajos de CD14, sino que además expresan CD1a en su gran mayoría, el cual es un marcador de DCs de origen mieloide (Coates y Thomson, 2002; Tang y col., 2005), a diferencia de monocitos que no lo presentan (Figura S2). Estos resultados indican que la diferenciación de monocitos a DCs fue lograda bajo las condiciones aquí establecidas, incluso para el caso de las +Dex DCs, en donde estaba descrito previamente un efecto inhibitorio de la dexametasona en la diferenciación de las DCs (Matasic y col., 1999).

Respecto a las características morfológicas (Figura 3), se observó una diferencia entre las DCs obtenidas, la cual estaría gatillada por el estímulo con MPLA, pudiéndose notar que estas células aumentan la superficie celular y presentan largas prolongaciones, en concordancia a trabajos donde usan este agente (Raïch-Regué y col., 2011), y concordante a un fenotipo de DC madura (Banchereau y Steinmann, 1998). Visualmente fue posible apreciar que las +MPLA DCs presentaban prolongaciones más largas en comparación a las +Dex+MPLA DCs, encontrándose una primera diferencia entre ambas condiciones de DCs mencionadas antes de realizar otros tipos de análisis. Respecto a la viabilidad de estas células (Figura 4.c), tanto el tratamiento con dexametasona como con MPLA no afectó la viabilidad de ellas, siendo ésta similar a la de iDCs, las cuales no recibieron ninguno de estos compuestos, por lo que el porcentaje de células muertas obtenidas fueron consecuencia de las condiciones generales de cultivo y del experimento, y no de la presencia de estos agentes en el medio. Esto fue reafirmado al determinar los porcentajes de células CD11c<sup>+</sup> encontrados para cada condición, los cuales fueron similares para todos los casos estudiados, y cercanos al 75%. Respecto a lo anterior, puede apreciarse en los análisis de citometría de flujo de DCs una pequeña población (entre un 15-20%) de células CD11c<sup>-</sup>, que según parámetros de tamaño y granularidad corresponderían a

linfocitos, que aparecen por causa de las características del producto de aislamiento de monocitos utilizado y que persistieron durante el tiempo de cultivo de las DCs, pero no fueron considerados en los análisis de citometría de flujo (Figura 4.a). Esta población linfocitaria podría tener un efecto sobre las DCs generadas *in vitro* principalmente por la activación de DCs por tales remanentes, como ha sido descrito en DCs modificadas genéticamente (Chinnasamy y col., 2005), por lo que para una eventual terapia debieran usarse productos que garanticen una alta pureza de monocitos y/o DCs en cultivo. No obstante, se han realizado ensayos clínicos en cáncer con DCs cuyas purezas eran similares al presente trabajo, obteniendo resultados positivos en la supervivencia de pacientes (Escobar y col., 2005; López y col., 2009). Además, para efectos del estudio realizado, los remanentes linfocitarios del cultivo no generaron un efecto de maduración en las DCs generadas, discutido a continuación.

## **8.2. Perfil tolerogénico de +Dex+MPLA DCs**

La primera aproximación del perfil de las DCs obtenidas se obtuvo al estudiar la expresión, por citometría de flujo, de moléculas coestimuladoras y del complejo principal de histocompatibilidad clase II. Dichos análisis se realizaron en base a la MFI, ya que para algunas moléculas se observó que en los distintos tratamientos de DCs estudiados había un alto porcentaje de células que las expresaban, y lo que variaba principalmente era la densidad en la superficie celular de cada una de ellas. De ese modo, pudo apreciarse que el tratamiento con MPLA provocó en DCs un aumento en la expresión de todas estas moléculas, utilizándose este tratamiento como control positivo de maduración de DCs. Trabajos previos han mostrado que MPLA tiene un efecto similar al LPS, un potente agente inmunoestimulador, en las DCs (Harry y col., 2010; García-González y col., manuscrito en preparación), lo que ha motivado el uso

de MPLA en la generación de DCs con aplicabilidad clínica. Tanto las iDCs como las +Dex DCs mostraron bajos niveles de estas moléculas respecto a las +MPLA DCs, en concordancia a un perfil inmaduro, y por tal razón fueron usadas como control negativo para los análisis. El tratamiento con MPLA de las DCs previamente tratadas con dexametasona dio como resultado DCs que presentaron expresión de CD40, CD86 y CD83 comparable a las iDCs y las +Dex DCs, y niveles de CD80 y HLA-DR comparables a las +MPLA DCs. Lo anterior sugiere que las DCs con estas características presentarían una coestimulación ineficiente durante la presentación antigénica. Se ha descrito a CD86 como la molécula más importante en la amplificación de la señal antigénica entregada por las DCs a las células T, y además la interacción de CD40, expresado por las DCs, con su ligando en linfocitos T (CD40L), provoca un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras y citoquinas pro-inflamatorias por parte de las DCs (Banchereau y col., 2000). Por otro lado, CD83 es un marcador bien caracterizado en las DCs maduras, además de ser importante en la activación de los linfocitos T y en el control de la respuesta inmune mediada por las DCs (Lechmann y col., 2002; Fujimoto y Tedder, 2006), por lo que su menor expresión en +Dex+MPLA DCs es un fuerte indicio de que el tratamiento con dexametasona impide la maduración de las DCs, y que el estímulo posterior con MPLA da como resultado células con características distintas a las DCs inmaduras y maduras, que serían capaces de presentar antígenos a los linfocitos T, pero no tendrían la capacidad adecuada para polarizar a estos linfocitos hacia un perfil inmunogénico.

Otro factor importante para catalogar a una DC como tolerogénica es la secreción de citoquinas que ésta presenta. Con ese fin se evaluaron los niveles de IL-10 e IL-12 en sobrenadantes del cultivo de las DCs, mediante ELISA, y así determinar el perfil que podrían inducir estas células sobre los linfocitos T, ya sea en la

polarización de un perfil inmunogénico (como por ejemplo Th1, mediado por la secreción de IL-12) o un perfil regulador mediado por IL-10 (Morelli y Thomson, 2007; Stoop y col., 2011). Los resultados mostraron que las +Dex+MPLA DCs son capaces de secretar altos niveles de IL-10, y no son capaces de secretar IL-12, en concordancia a una función reguladora por parte de estas células, previamente descrita en células tratadas con dexametasona (Xia y col., 2005, Boks y col., 2012). En el mismo ensayo pudo apreciarse que las +MPLA DCs fueron las únicas capaces de producir niveles significativos de IL-12; lo anterior supone que estas células tendrían la capacidad de polarizar una respuesta T hacia un perfil inmunogénico, a pesar de los altos niveles de IL-10 secretados en comparación a iDCs y +Dex DCs, aunque en menor medida comparado a las +Dex+MPLA DCs.

Una aproximación funcional sobre el efecto tolerogénico de las +Dex+MPLA DCs sobre poblaciones linfocitarias fue obtenida mediante co-cultivos alogénicos entre las distintas DCs generadas y linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Figura S3, trabajo de tesis de Lorena Hoyos), en donde se obtuvo que las +MPLA DCs fueron las únicas capaces de provocar una alta expansión de estos linfocitos (47,78% de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CFSE<sup>low</sup>), a diferencia de los niveles de alo-proliferación provocados por las +Dex+MPLA DCs (10,58% de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CFSE<sup>low</sup>), los cuales son comparables a los obtenidos con iDCs y +Dex DCs (10,33% y 6,51%, respectivamente). Este resultado concuerda con el perfil tolerogénico de las +Dex+MPLA DCs, sugiriendo la capacidad de generar anergia en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales.

### **8.3. Expresión de receptores de quimioquinas en +Dex+MPLA DCs**

La capacidad migratoria de las DCs es una característica inherente a la función que estas cumplen, estando el lugar hacia donde éstas se dirijan relacionado al estado

de maduración que ellas tengan, y por lo tanto a la acción que estas células llevarán a cabo, ya sea en el sitio de inflamación o en los órganos linfoides. La migración de las DCs hacia distintas zonas en el organismo es consecuencia de la expresión diferencial de receptores de quimioquinas, la que depende del estado de maduración en el cual se encuentren estas células (Caux y col., 2000). Debido a que las +Dex+MPLA DCs poseen un fenotipo semi-maduro, secretan altos niveles de IL-10 y además suprimen la aloproliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se hizo necesario evaluar la expresión de receptores de quimioquinas y la capacidad migratoria *in vitro* de estas células para predecir su capacidad de migrar hacia linfonodos ante una eventual aplicación *in vivo*.

Para los receptores de IL-8, CXCR1 y CXCR2, se observó que su expresión de superficie es baja en todas las condiciones de las DCs, a diferencia de trabajos previos en donde se observa, por citometría de flujo, que las DCs inmaduras expresan niveles detectables de CXCR1 en particular (Sallusto y col., 1998). Como control de los anticuerpos utilizados se midieron dichos receptores en poblaciones granulocíticas (Figura S1), en las cuales su expresión ha sido descrita (Baggiolini y col., 1997). Estos controles indicaron que los anticuerpos utilizados funcionaron de manera adecuada. Diferentes trabajos publicados utilizan variaciones de la técnica que fue utilizada para esta memoria (citometría de flujo) u otras técnicas, como Western blot y la medición de ARN mensajero (ARNm), para detectar diferencias en la expresión de dichos receptores (Sallusto y col., 1998; Alvarez y col., 2008); sin embargo, se ha descrito que las DCs derivadas de monocitos no son capaces de migrar *in vitro* en respuesta a IL-8/CXCL8 (Zhu y col., 2000), lo cual indicaría que estos receptores no cumplen un rol importante en la migración de estas DCs.

Por su parte, se encontró una alta expresión de los receptores CCR1, CCR2 y CCR5 en las +Dex DCs, en comparación a los otros tratamientos estudiados. Es

interesante notar que las iDCs expresan niveles bajos de estos receptores, a excepción de CCR1, el cual disminuye ante el estímulo con MPLA. Lo anterior sugiere que las +Dex DCs podrían tener un fenotipo incluso más inmaduro que las iDCs, ya que estas últimas podrían tener un grado, aunque menor, de activación. Un efecto similar provocado por dexametasona en DCs humanas ya había sido descrito previamente para el caso de CCR2 (Roca y col., 2007). El estímulo con MPLA de las +Dex DCs llevó a una disminución del número de células que expresan estos receptores, acorde a la pérdida del fenotipo inmaduro por parte de estas células. Lo anterior es complementado al analizar los niveles de CXCR4 y CCR7, los cuales fueron significativamente mayores en las +MPLA DCs, comparado a los encontrados en iDCs y +Dex DCs. Una expresión comparable a la encontrada en +MPLA DCs de estos receptores se detectó en las +Dex+MPLA DCs, aunque se observó una expresión ligeramente menor para el caso particular de CCR7. Lo anterior es coherente con lo descrito en trabajos recientes (Sordi y col., 2006; Boks y col., 2012), en los cuales las DCs tratadas con dexametasona y posteriormente sometidas a un estímulo inflamatorio expresan niveles menores de CCR7, en comparación a DCs maduras; sin embargo, en este trabajo dicha diferencia no fue significativa. Este hallazgo denota que el estímulo con MPLA provocó un cambio en el perfil de receptores de quimioquinas, desde uno inmaduro hacia uno activado, independiente de la modulación con dexametasona. Esto es similar a lo descrito en el trabajo realizado por Anderson y col. (2009), en donde hallan que el estímulo con un agente inflamatorio sobre las DCs tolerogénicas induce la expresión de CCR7.

Los resultados discutidos previamente muestran que las +Dex+MPLA DCs poseen un perfil tolerogénico, dado por la baja expresión de moléculas coestimuladoras, el amplio predominio de secreción de IL-10 por sobre la de IL-12

durante el tiempo de cultivo, y una disminuida respuesta alo-proliferativa generada en linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales. Sin embargo, estas células expresan bajos niveles de receptores de quimioquinas pro-inflamatorias, a la vez que son capaces de expresar receptores de quimioquinas homeostáticas, característicos de DCs maduras, que tienen la capacidad de migrar a zonas de presentación antigénica en órganos linfoides secundarios. Asimismo, la elevada expresión de moléculas MHC de clase II por parte de las +Dex+MPLA DCs sugiere que estas células poseen un perfil presentador de antígenos, característico de las DCs maduras, en lugar de un perfil procesador de antígenos como lo tienen las DCs inmaduras, sin embargo, la realización de ensayos de endocitosis de las DCs generadas podrían esclarecer si estas células sufrieron un cambio desde un perfil procesador hacia un perfil presentador de antígenos.

#### **8.4. Respuesta migratoria de +Dex+MPLA DCs**

Para determinar la funcionalidad de los receptores expresados por las DCs generadas se realizaron ensayos de migración *in vitro* a través de un sistema "Transwell". Para estos análisis se consideraron las quimioquinas CCL5, CXCL12 y CCL19: la primera ha sido descrita como un quimioattractante de DCs inmaduras, mientras que las otras dos gatillan una respuesta migratoria en las DCs maduras (Sozzani y col., 1998; Dieu y col., 1998; Foti y col., 1999; Sato y col., 2001; Villablanca y col., 2008). CCL5 es una quimioquina involucrada en el reclutamiento de leucocitos hacia zonas de inflamación y mucosas a través de los receptores CCR1 y CCR5, mientras que CCL19, ligando de CCR7, se encuentra presente en órganos linfoides secundarios, promoviendo en estas estructuras la interacción de DCs con linfocitos T (Sallusto y Lanzavecchia, 1999; Stumbles y col., 2001). Para el caso particular de CXCL12 y la interacción con CXCR4, aún no está del todo definido su rol en DCs

maduras, pero se ha descrito que el bloqueo de dicha interacción en DCs murinas impide la migración de DCs maduras hacia órganos linfoides periféricos (Delgado-Martín y col., 2011).

El análisis de los ensayos de migración fue realizado usando una variable denominada Tasa de migración (Tmig), con el fin de normalizar distintos experimentos, y se realizaron dichos análisis en los eventos que estuvieran dentro de la región característica de las DCs (como se muestra en la Figura 10.a), para evitar considerar eventos que no fuesen DCs en los resultados.

Los ensayos de migración mostraron un correlato con respecto a la expresión de receptores de quimioquinas en las DCs. Así, las +Dex DCs, que expresan altos niveles de CCR1 y CCR5 fueron las que generaron una mayor respuesta migratoria hacia CCL5, mientras que las +MPLA DCs, que presentan elevada expresión de CCR7 y CXCR4, respondieron hacia CXCL12 y en mayor medida hacia CCL19, lo cual concuerda con un fenotipo maduro de DCs, como ya ha sido descrito en DCs maduras (Humrich y col., 2006; Ricart y col., 2011). La respuesta hacia CCL5 de las +Dex DCs fue baja, si se comparan las condiciones que más respondieron a las otras quimioquinas estudiadas (Tmig de 10,79 para CCL19 y 4,60 para CXCL12 por parte de +MPLA DCs, y Tmig de 2,16 para CCL5 por +Dex DCs). Los receptores para CCL5 expresados por las DCs son CCR1 y CCR5, ambos significativamente expresados en las +Dex DCs aquí obtenidas, sin embargo la expresión de CCR1 es mayor que CCR5 en las +Dex DCs (promedio de 53,6% de DCs CCR1+ y 10,67% de DCs CCR5+). Para determinar si la expresión diferencial de estos receptores incide en la migración dependiente de CCL5 de las DCs aquí generadas, ensayos de bloqueo específico de los receptores CCR1 o CCR5 previo a la realización de ensayos de migración serían cruciales para responder tal interrogante.

Paralelo al desarrollo de este trabajo, Boks y col. (2012) mostraron que el estímulo con MPLA en DCs humanas derivadas de monocitos no indujo una alta expresión de CCR7, y en consecuencia no encontraron una respuesta migratoria significativa hacia CCL21, uno de los ligandos de este receptor, a diferencia del presente estudio, en donde se observa una alta tasa migratoria hacia CCL19, como consecuencia de la expresión de CCR7 en las +MPLA DCs. Si bien ambas quimioquinas son ligandos de CCR7, esta diferencia puede ser la causa de los distintos resultados obtenidos, o bien dicha disparidad podría radicar en los protocolos de generación y activación de las DCs con MPLA.

En los resultados presentados, se observó una disminución en la respuesta migratoria de las +Dex+MPLA DCs hacia CCL5, junto con un aumento en la respuesta hacia CCL19, comparado a las +Dex DCs, pero menor en comparación a las +MPLA DCs. Para el caso de CXCL12, las +Dex+MPLA DCs mostraron también un aumento en la respuesta hacia CXCL12, en comparación a las +Dex DCs, y esta respuesta no arrojó significancia al compararla con las +MPLA DCs. Esto significa que las +Dex+MPLA DCs adquieren la capacidad de migrar en respuesta a la interacción CCL19-CCR7, aunque en menor medida respecto a las DCs maduras, y adquieren una capacidad migratoria hacia CXCL12 similar a la que poseen las DCs maduras. En patologías como cáncer se ha descrito una elevada expresión de CXCL12 por las células tumorales, que contribuiría a la acumulación de linfocitos T y DCs con función supresora, con efecto local en la sobrevida tumoral (Gunn, 2003; Kalinsky y col, 2010). Además, en AR se ha descrito un aumento en la expresión de CXCL12 en el tejido sinovial de pacientes (Nanki y col., 2000). Estos antecedentes nos sugieren que la migración en respuesta a CXCL12 por parte de +Dex+MPLA DCs podría no sólo tener un efecto en el reclutamiento hacia órganos linfoides secundarios, sino que también

hacia al sitio mismo donde ocurre la inflamación que provoca el daño autoinmune. Esta hipótesis sería clarificada analizando la migración de las DCs *in vivo* hacia zonas de inflamación, por ejemplo en un modelo murino autoinmune como artritis inducida por colágeno (CIA), enfocándose en el bloqueo de la interacción CXCL12-CXCR4 en las DCs mediante un agente farmacológico como AMD3100 (Delgado-Martín y col., 2011), y correlacionarlo con un posible efecto en la enfermedad.

En base a lo anterior, es posible concluir la existencia de un efecto mediado por MPLA en la migración de las DCs, mediante la inducción en la capacidad de responder a quimioattractantes involucrados en la migración hacia órganos linfoides secundarios, como CCR7 y CXCR4, y la disminución de la respuesta migratoria ante una quimioquina proinflamatoria. Lo anterior le confiere a las +Dex+MPLA DCs propiedades distintas a las DCs maduras o inmaduras, ya que estas células tendrían la capacidad de migrar hacia órganos linfoides, o eventualmente hacia el mismo sitio de inflamación, para provocar una respuesta de tolerancia. Estos resultados son promisorios para una posible aplicación futura de las +Dex+MPLA DCs en una inmunoterapia orientada a restablecer la tolerancia en enfermedades autoinmunes o a prevenir el desarrollo de rechazos a transplantes.

### **8.5. Proyecciones**

El paso siguiente a dar en el estudio de las +Dex+MPLA DCs sería determinar si estas células son capaces de migrar a órganos linfoides y generar una respuesta tolerogénica en un modelo *in vivo*. El modelo NOD-SCID, que consiste en un ratón inmunosuprimido con carente actividad linfocitaria, niveles bajos o nulos de inmunoglobulinas en la sangre, con baja actividad inmune innata, y en el que se pueden transferir células de sangre periférica humana para realizar estudios preclínicos

(Pearson y col., 2008), sería de gran utilidad ya que permitiría una aproximación muy cercana a lo que pudiese ocurrir en humanos sin poner en riesgo a personas, ya que son las células humanas las que generan las respuestas inmunes en tales ratones. Otro modelo, como por ejemplo de alguna enfermedad autoinmune en ratón como CIA, podría ser útil a la hora de relacionar la migración de las DCs generadas y el efecto sobre la enfermedad estudiada. Además, a través de estos modelos podría evaluarse el rol de la migración de las DCs tolerogénicas hacia órganos linfoides en enfermedades autoinmunes, de la misma forma que ya ha sido descrito en estudios de trasplante (Garrod y col, 2006).

En relación a la línea de investigación del presente trabajo, se está aplicando el protocolo de generación de las tDCs, descrito en esta tesis, a partir de monocitos de pacientes con AR, con el objetivo de evaluar la factibilidad de generar estas células desde precursores obtenidos en un contexto inflamatorio, donde la respuesta autoinmune en curso en estos individuos pudiese modificar el fenotipo final de las +Dex+MPLA DCs, previamente caracterizada en individuos sanos. Nuevamente, la caracterización del perfil de receptores de quimioquinas y de migración en las DCs tolerogénicas de estos pacientes podría ser usada como un indicio previo para predecir el comportamiento de estas células al ser inyectadas en un paciente.

## 9. CONCLUSIONES

- 9.1. El tratamiento con dexametasona le otorga a las DCs derivadas de monocitos características tolerogénicas, en base a la baja expresión de moléculas coestimuladoras, perfil que es mantenido ante el estímulo con MPLA, molécula que induce en éstas un aumento en la secreción de IL-10 y no de IL-12.
- 9.2. El estímulo de las DCs con MPLA de forma posterior al tratamiento con dexametasona, provoca un cambio en el perfil de receptores de quimioquinas, siendo similar a un perfil de DCs maduras.
- 9.3. El estímulo con MPLA le confiere a las DCs tratadas con dexametasona la capacidad de migrar *in vitro* en respuesta a CCL19 y hacia CXCL12, quimioquinas claves en el reclutamiento hacia linfonodos, junto con una baja en respuesta migratoria hacia CCL5, quimioquina proinflamatoria involucrada en el tráfico hacia la periferia.

## 10. REFERENCIAS

**Alvarez D., Vollmann E.H., Von Adrian U.H. (2008).** Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* **29** (3): 325-342.

**Anderson A.E., Swan D.J., Sayers B.L., Harry R.A., Patterson A.M., Von Delwig A., Robinson J.H., Isaacs J.D., Hilkens C.M.U. (2009).** LPS activation is required for migratory activity and antigen presentation by tolerogenic dendritic cells. *J Leukoc Biol* **85** (2): 243-250.

**Baggiolini M., Dewald B., Moser B. (1997).** Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* **15**: 675-705.

**Bai Y., Liu Y., Wang Y., Honig S., Qin L., Boros P., Bromberg J.S. (2002).** L-selectin dependent lymphoid occupancy is required to induce alloantigen-specific tolerance. *J Immunol* **168** (4): 1579-1589.

**Banchereau J., Steinman R.M. (1998).** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392** (6673): 245-252.

**Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B., Palucka K. (2000).** Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.

**Boks A.M., Kager-Groenland J.R., Haasjes M.S.P., Zwaginga J.J., Van Ham S.M., Ten Brinke A. (2012).** IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction – a comparative study of human clinical-applicable DC. *Clin Immunol* **142** (3): 332-342.

**Boullart A.C.I., Aarntzen E.H.J.G., Verdijk P., Jacobs J.F.M., Schuurhuis D.H., Benitez-Ribas D., Schreibelt G., Van de Rakt M.W.M.M., Scharenborg N.M., De Boer A., Kramer M., Figdor C.G., Punt C.J.A., Adema G.J., de Vries I.J.M. (2008).** Maturation of monocyte-derived dendritic cells with Toll-like receptor 3 and 7/8 ligands combined with prostaglandin E2 results in high interleukin-12 production and cell migration. *Cancer Immunol Immunother* **57** (11): 1589-1597.

**Brigl M., Brenner M.B. (2004).** CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* **22**: 817-890.

**Buonocore S., Van Meirvenne S., Demoor F.X., Paulart F., Thielemans K., Goldman M., Flamand V. (2002).** Dendritic cells transduced with viral interleukin 10 or Fas ligand: no evidence for induction of allotolerance in vivo. *Transplantation* **73** (1 Suppl): S27-30

**Caux C.**, Ait-Yahia S., Chemin K., De Bouteiller O., Dieu-Nosjean M.C., Homey B., Massacrier C., Vanbervliet B., Zlotnik A., Vicari A (2000). Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin Immunopathol* **22** (4): 345-369.

**Caux C.**, Massacrier C., Vanbervliet B., Dubois B., Van Kooten C., Durand I., Banchereau J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* **180** (4): 1263-1272.

**Cavanagh L.L.**, Von Andrian U.H. (2002). Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. *Immunol Cell Biol* **80** (5): 448-462.

**Cekic C.**, Casella C.R., Eaves C.A., Matsuzawa A., Ichijo H., Mitchell T.C. (2009). Selective activation of the p38 MAPK pathway by synthetic monophosphoryl lipid A. *J Biol Chem* **248** (46): 31982-31991.

**Cella M.**, Scheidegger D., Palmer-Lehmann K., Lane P., Lanzavecchia A., Alber G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* **184** (2): 747-752.

**Cernadas M.**, Lu J., Watts G., Brenner M.B. (2009). CD1a expression defines an interleukin-12 producing population of human dendritic cells. *Clin Exp Immunol* **155** (3): 523-533.

**Chabot V.**, Reverdiau P., Lochmann S., Rico A., Sénécal D., Goupille C., Sizaret P.Y., Sensebé L. (2006). CCL5-enhanced human immature dendritic cell migration through the basement membrane in vitro depends on matrix metalloprotease-9. *J Leukoc Biol* **79** (4): 767-778.

**Chinnasamy N.**, Treisman J.S., Oaks M.K., Hanson J.P., Chinnasamy D. (2005). Ex vivo generation of genetically modified dendritic cells for immunotherapy: implications of lymphocyte contamination. *Gene Ther* **12** (3): 259-271.

**Coates P.T.H.**, Thomson A.W. (2002). Dendritic cells, tolerance induction and transplant outcome. *Am J Transplant* **2** (4): 299-307.

**Cravens P.D.**, Lipsky P.E. (2002). Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunol Cell Biol* **80** (5): 497-505.

**Dauer M.**, Lam V., Arnold H., Junkmann J., Kiefl R., Bauer C., Schnurr M., Endres S., Eigler A. (2008). Combined use of toll-like receptor agonists and prostaglandin E(2) in the FastDC model: rapid generation of human monocyte-derived dendritic cells capable of migration and IL-12p70 production. *J Immunol Methods* **337** (2): 97-105.

**Davalos-Misslitz A.C.M.,** Rieckenberg J., Willenzon S., Worbs T., Kremmer E., Bernhardt G., Förster R. (2007). Generalized multi-organ autoimmunity in CCR7-deficient mice. *Eur J Immunol* **37** (3): 613-622.

**Delgado-Martín C.,** Escribano C., Pablos J.L., Riol-Blanco L., Rodríguez-Fernández J.L. (2011). Chemokine CXCL12 uses CXCR4 and a signaling core formed by bifunctional Akt, extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2, and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) proteins to control chemotaxis and survival simultaneously in mature dendritic cells. *J Biol Chem* **286** (43): 37222-37236.

**Dieu M.C.,** Vanbervliet B., Vicari A., Bridon J.M., Oldham E., Ait-Yahia S., Brière F., Zlotnik A., Lebecque S., Caux C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* **188** (2): 373-386.

**Drachenberg K.J.,** Wheeler A.W., Woroniecki S.R., Horak F. (2002). A Th1 inducing adjuvant, MPL®, safely assists in reducing the length of a pollen allergy vaccination course. *Allergol Immunol Clin* **17**: 39-43.

**Dubensky T.W. Jr.,** Reed S.G. (2010). Adjuvants for cancer vaccines. *Semin Immunol* **22** (3): 155-161.

**Emmer P.M.,** Van der Vlag J., Adema G.J., Hilbrands L.B. (2006). Dendritic cells activated by lipopolysaccharide after dexamethasone treatment induce donor-specific allograft hyporesponsiveness. *Transplantation* **81** (10): 1451-1459.

**Escobar A.,** López M., Serrano A., Ramirez M., Pérez C., Aguirre A., González R., Alfaro J., Larrondo M., Fodor M., Ferrada C., Salazar-Onfray F. (2005). Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. *Clin Exp Immunol* **142** (3): 555-568.

**Evans J.T.,** Cluff C.W., Johnson D.A., Lacy M.J., Persing D.H., Baldrige J.R. (2003). Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. *Expert Rev Vaccines* **2** (2): 219-229.

**Figdor C.G.,** De Vries I.J., Lesterhuis W.J., Melief C.J.M. (2004). Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* **10** (5): 475-480.

**Franchimont D. (2004).** Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci* **1024**: 124-137.

**Förster R.,** Davalos-Misslitz A.C., Rot A. (2008). CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* **8** (5): 362-371.

**Foti M., Granucci F., Aggujaro D., Liboi E., Luini W., Minardi S., Mantovani A., Sozzani S., Ricciardi-Castagnoli P. (1999).** Upon dendritic cell (DC) activation chemokines and chemokine receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of DC at the inflammatory site. *Int Immunol* **11** (6): 979-986.

**Fujimoto Y., Tedder T.F. (2006).** CD83: a regulatory molecule of the immune system with great potential for therapeutic application. *J Med Dent Sci* **53** (2): 85-91.

**Garrod K.R., Chang C.K., Liu F.C., Brennan T.V., Foster R.D., Kang S.M. (2006).** Targeted lymphoid homing of dendritic cells is required for prolongation of allograft survival. *J Immunol* **177** (2): 863-868.

**Giannoukakis N., Phillips B., Finegold D., Harnaha J., Trucco M. (2011).** Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* **34** (9): 2026-2032.

**Gunn M.D. (2003).** Chemokine mediated control of dendritic cells migration and function. *Semin Immunol* **15** (5): 271-276.

**Hasskamp J.H., Zapas J.L., Elias E.G. (2005).** Dendritic cell counts in the peripheral blood of healthy adults. *Am J Hematol* **78** (4): 314-315.

**Hackstein H., Thomson A.W. (2004).** Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* **4** (1): 24-34.

**Haringman J.J., Smeets T.J.M., Reinders-Blankert P., Tak P.P. (2006).** Chemokine and chemokine receptor expression in paired peripheral blood mononuclear cells and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and reactive arthritis. *Ann Rheum Dis* **65** (3): 294-300.

**Harry R.A., Anderson A.E., Isaacs J.D., Hilkens C.M.U. (2010).** Generation and characterisation of therapeutic tolerogenic dendritic cells for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **69** (11): 2042-2050.

**Hilkens C.M.U., Isaacs J.D., Thomson A.W. (2010).** Development of dendritic cells-based immunotherapy for autoimmunity. *Int Rev Immunol* **29** (2): 156-183.

**Humrich J.Y., Humrich J.H., Averbek M., Thumann P., Termeer C., Kämpgen E., Schuler G., Jenne L. (2006).** Mature monocyte-derived dendritic cells respond more strongly to CCL19 than to CXCL12: consequences for directional migration. *Immunology* **117** (2): 238-247.

**Ismaili J., Rennesson J., Aksoy E., Vekemans J., Vincart B., Amraoui Z., Van Laethem F., Goldman M., Dubois P.M. (2002).** Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *J Immunol* **168** (2): 926-932.

**Jonuleit H., Kühn U., Müller G., Steinbrink K., Paragnik L., Schmitt E., Knop J., Enk A.H. (1997).** Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* **27** (12): 3135-3142.

**Kabashima K., Shiraishi N., Sugita K., Mori T., Onoue A., Kobayashi M., Sakabe J., Yoshiki R., Tamamura H., Fuji N., Inaba K., Tokura Y. (2007).** CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells. *Am J Pathol* **171** (4): 1249-1257.

**Kalinski P. (2009).** Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need. *Future Oncol* **5** (3): 379-390.

**Kalinski P., Wieckowski E., Muthuswamy R., de Jong E. (2010).** Generation of stable Th1/CTL-, Th2-, and Th17-inducing human dendritic cells. *Methods Mol Biol* **595**: 117-133.

**Kucia M., Jankowski K., Reza R., Wysoczynski M., Bandura L., Allendorf D.J., Zhang J., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. (2004).** CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol* **35** (3): 233-245.

**Lechmann M., Berchtold S., Hauber J., Steinkasserer A., (2002).** CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol* **23** (6): 273-275.

**Lin C.L., Suri R.M., Rahdon R.A., Austyn J.M., Roake J.A. (1998).** Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *Eur J Immunol* **28** (12): 4114-4122.

**López M.N., Pereda C., Segal G., Muñoz L., Aguilera R., González F.E., Escobar A., Ginesta A., Reyes D., González R., Mendoza-Naranjo A., Larrondo M., Compán A., Ferrada C., Salazar-Onfray F. (2009).** Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor beta-expressing T cells. *J Clin Oncol* **27** (6): 945-952.

**Lu L., Lee W.C., Takayama T., Qian S., Gambotto A., Robbins P.D., Thomson A.W. (1999).** Genetic engineering of dendritic cells to express immunosuppressive molecules (viral IL-10, TGF-beta, and CTLA4lg). *J Leukoc Biol* **66** (2): 293-296.

**Matasic R., Dietz A.B., Vuk-Pavlovic S. (1999).** Dexamethasone inhibits dendritic cell maturation by redirecting differentiation of a subset of cells. *J Leukoc Biol* **66** (6): 909-914.

**Mata-Haro V., Cekic C., Martin M., Chilton P.M., Casella C.R., Mitchell T.C. (2007).** The vaccine adjuvant Monophosphoryl lipid A as a TRIF-based agonist of TLR4. *Science* **316** (5831): 1628-1632.

- Matyszak M.K.**, Citterio S., Rescigno M., Ricciardi-Castagnoli P. (2000). Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* **30** (4): 1233-1242.
- Moreau A.**, Valey E., Bériou G., Hill M., Bouchet-Delbos L., Segovia M., Cuturi MC. (2012). Tolerogenic dendritic cells and negative vaccination in transplantation: from rodents to clinical trials. *Front Immunol* **3**: 218. Epub 2012 Aug 9.
- Morelli A.E.**, Thomson A.W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* **7** (8): 610-621.
- Nanki T.**, Hayashida K., El-Gabalawy H.S., Suson S., Shi K., Girschick H.J., Yavuz S., Lipsky P.E. (2000). Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* **165** (11): 6590-6598.
- Nestle F.O.** (2000). Dendritic cell vaccination for cancer therapy. *Oncogene* **19** (56): 6673-6679.
- Ochando J.C.**, Yopp A.C., Yang Y., Garin A., Li Y., Boros P., Llodra J., Ding Y., Lira S.A., Krieger N.R., Bromberg J.S. (2005). Lymph node occupancy is required for the peripheral development of alloantigen-specific Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* **174** (11): 6993-7005.
- Pearson T.**, Greiner D.L., Shultz L.D. (2008). Humanized SCID models for biomedical research. *Curr Top Microbiol Immunol* **324**: 25-51.
- Putz T.**, Gander H., Ramoner R., Zelle-Rieser C., Rahm A., Nussbaumer W., Bartsch G., Höltl L., Thurner M. (2005). Generation of clinical-grade monocyte-derived dendritic cells using the CliniMACS system. *Methods Mol Med* **109**: 71-82.
- Raïch-Regué D.**, Naranjo-Gómez M., Grau-López L., Ramo C., Pujol-Borrell R., Martínez-Cáceres E., Borràs F.E. (2011). Differential effects of monophosphoryl lipid A and cytokine cocktail as maturation stimuli of immunogenic and tolerogenic dendritic cells for immunotherapy. *Vaccine* **30** (2): 378-387.
- Rea D.**, Van Kooten C., Van Meijgaarden K.E., Ottenhoff T.H.M., Melief C.J.M., Offringa R. (2000). Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood* **95** (10): 3162-3167.
- Ricart B.G.**, John B., Lee D., Hunter C.A., Hammer D.A. (2011). Dendritic cells distinguish individual chemokine signals through CCR7 and CXCR4. *J Immunol* **186** (1): 53-61.

**Riol-Blanco L.,** Sánchez-Sánchez L., Torres A., Tejedor A., Narumiya S., Corbí A.L., Sánchez-Mateos P., Rodríguez-Fernández J.L. (2005). The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *J Immunol* **174** (7): 4070-4080.

**Roca L.,** Di Paolo S., Petruzelli V., Grandalino V., Rainieri E., Shena F.P., Gesualdo L. (2007). Dexamethasone modulates interleukin-12 production by inducing monocyte chemoattractant protein 1 in human dendritic cells. *Immunol Cell Biol* **85** (8): 610-616.

**Saeki H.,** Moore A.M., Brown M.J., Hwang S.T. (1999) Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* **162** (5): 2472-2475.

**Sallusto F.,** Lanzavecchia A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179** (4): 1109-1118.

**Sallusto F.,** Lanzavecchia A. (1999). Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming and chronic inflammation. *J Exp Med* **184** (9): 611-614.

**Sallusto F.,** Schaerli P., Loetscher P., Scharniel C., Lening D., Mackay C.R., Qin S., Lanzavecchia A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* **28** (9): 2760-2769.

**Sánchez-Sánchez N.,** Riol-Blanco L., De la Rosa G., Puig-Kröger A., García-Bordas J., Martín D., Longo N., Cuadrado A., Cabañas C., Corbí A.L., Sánchez-Mateos P., Rodríguez-Fernández J.L. (2004). Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells. *Blood* **104** (3): 619-625.

**Sato K.,** Kawasaki H., Nagayama H., Enomoto M., Morimoto C., Tadokoro K., Juji T., Takahashi T.A. (2001). Signaling events following chemokine receptor ligation in human dendritic cells at different developmental stages. *Int Immunol* **13** (2): 167-179.

**Sordi V.,** Bianchi G., Buracchi C., Mercalli A., Marchesi F., D'Amico G., Yang C.H., Luini W., Vecchi A., Mantovani A., Allavena P., Piemonti A. (2006). Differential effects of immunosuppressive drugs on chemokine receptor CCR7 in human dendritic cells: selective upregulation by Rapamycin. *Transplantation* **82** (6): 826-834.

**Sozzani S.,** Luini W., Borsatti A., Polentarutti N., Zhou D., Piemonti L., D'Amico G., Power C.A., Wells T.N.C., Gobbi M., Allavena P., Mantovani A. (1997). Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol* **159** (4): 1993-2000.

**Sozzani S**, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A. (1998). Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* **161** (3): 1083-1086.

**Sozzani S**, Allavena P., Vecchi A., Mantovani A. (1999). The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *J Leukoc Biol* **66** (1): 1-9.

**Steinman R.M.**, Hawiger D., Nussenzweig M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **21**: 685-711.

**Stoop J.N.**, Robinson J.H., Hilkens C.M.U. (2011). Developing tolerogenic dendritic cells for rheumatoid arthritis: what can we learn from mouse models?. *Ann Rheum Dis* **70** (9): 1526-1533.

**Stumbles P.A.**, Strickland D.H., Pimm C.L., Proksch S.F., Marsh A.M., McWilliam A.S., Bosco A., Tobagus I., Thomas J.A., Napoli S., Proudfoot A.E.I., Wells T.N.C., Holt P.G. (2001). Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus. *J Immunol* **167** (1): 228-234.

**Szekanecz Z.**, Vegvari A., Szabo Z., Koch A.E. (2010). Chemokine and chemokine receptors in arthritis. *Front Biosci* **2**: 153-167.

**Tang L.L.**, Zhang Z., Zheng J.S., Sheng J.F., Liu K.Z. (2005). Phenotypic and functional characteristics of dendritic cells derived from human peripheral blood monocytes. *J Zhejiang Univ Sci B* **6** (12): 1176-1181.

**Torres-Aguilar H.**, Aguilar-Ruiz S.R., González-Pérez G., Munguía R., Bajaña S., Meraz-Ríos M.A., Sánchez-Torres C. (2010). Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **184** (4): 1765-1775.

**Torzicky M.**, Viznerova P., Richter S., Strobl H., Scheinecker C., Foedinger D., Riedl E. (2012). Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) and CD99 are critical in lymphatic transmigration of human dendritic cells. *J Invest Dermatol* **132** (4): 1149-1157.

**Unger W.W.J.**, Laban S., Kleijwegt F.S., Van der Slik A.R., Roep B.O. (2009). Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D<sub>3</sub> or dexamethasone: differential role for PD-L1. *Eur J Immunol* **39** (11): 3147-3159.

**Villablanca E.J.**, Zhou D., Valentinis B., Negro A., Raccosta L., Mauri L., Prinetti A., Sonnino S., Bordignon C., Traversari C., Russo V. (2008). Selected natural and synthetic retinoids impair CCR7- and CXCR4-dependent cell migration in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* **84** (3): 871-879.

**Xia C.Q.**, Peng R., Beato F., Clare-Salzler M.J. (2005). Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scand J Immunol* **62** (1): 45-54.

**Xiao-Kui HE**, Xiang-ling WU, Xiu-juan HE, Yong-xiu HU (2010). Dexamethasone impairs the differentiation and maturation of murine dendritic cells by Toll-like receptor 4-nuclear factor-B pathway. *Chin Med J* **123** (3): 344-350.

**Yanagihara S.**, Komura E., Nagafune J., Watarai H., Yamaguchi Y. (1998). EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cells chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol* **161** (6): 3096-3102.

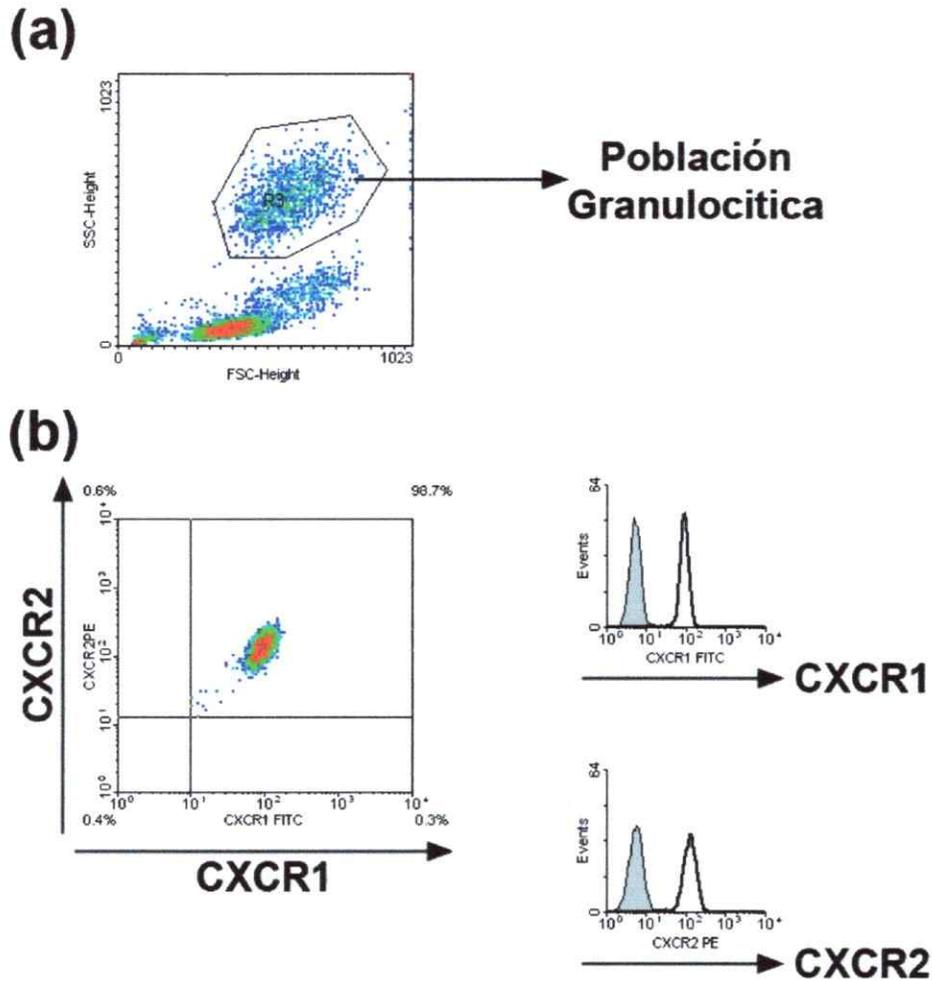
**Zhu K.**, Shen Q., Ulrich M., Zheng M. (2000). Human monocyte-derived dendritic cells expressing both chemotactic cytokines IL-8, MCP-1, RANTES and their receptors, and their selective migration to these chemokines. *Chin Med J* **113** (12): 1124-1128.

**Ziegler-Heitbrock L.**, Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116** (6): e74-80.

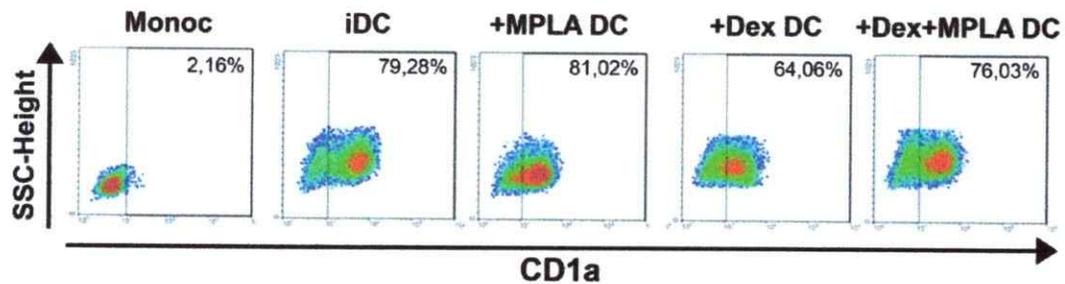
**Zlotnik A.**, Yoshie O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12** (2): 121-127.

**Zlotnik A.**, Yoshie O. (2012). The chemokine superfamily revisited. *Immunity* **36** (5): 705-716.

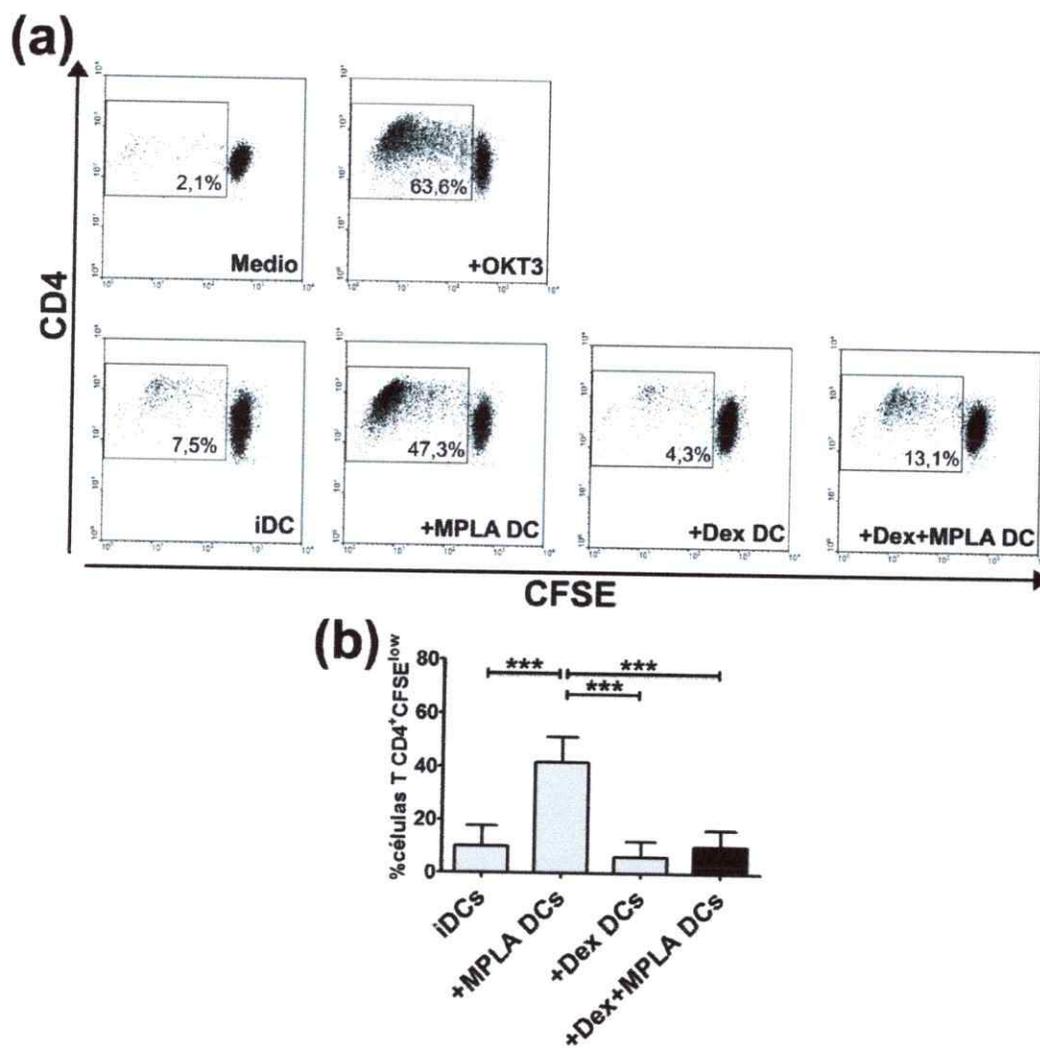
## 11. FIGURAS SUPLEMENTARIAS



**Figura S1. Expresión de CXCR1 y CXCR2 en población granulocítica, medida por citometría de flujo. (a)** Selección de población granulocítica por criterios de FSC y SSC. **(b)** "Density plot" (izquierda) e histogramas (derecha) con la expresión de dichos receptores. El marcaje con CXCR1 FITC, CXCR2 PE (líneas negras de histogramas) y sus respectivos controles de isotipo (curvas grises) fue realizado según lo establecido en Materiales y Métodos. Un experimento representativo es mostrado.



**Figura S2. Expresión de CD1a en monocitos y los distintos tratamientos de DCs analizados por citometría de flujo.** Monocitos al día 0 de cultivo, y las DCs distintas tratadas al día 5 de cultivo fueron marcadas con  $\alpha$ -CD1a FITC (eBioscience) bajo el mismo protocolo mencionado en Materiales y Métodos. Las células mostradas en cada "density plot" fueron seleccionadas previamente por la expresión de CD11c. Un experimento representativo es mostrado. Trabajo realizado por Paulina García en el marco de su tesis de pregrado.



**Figura S3. Ensayos de alo-proliferación de los distintos tratamientos de DCs con linfocitos T CD4<sup>+</sup> analizados por citometría de flujo.** Las DCs generadas ante los distintos tratamientos con dexametasona y MPLA fueron co-cultivadas con linfocitos T CD4<sup>+</sup> previamente purificados y marcados con carboxifluorescein succinimidil ester (CFSE) en una razón DC:LT de 1:2, dejando en incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Como controles se dejaron linfocitos T CD4<sup>+</sup> sin DCs (control negativo) y cultivados en presencia de OKT3 (eBioscience, control positivo de proliferación). Al día 6 del co-cultivo, los linfocitos fueron cosechados y marcados con α-CD4 PE-Cy7 (eBioscience) bajo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. La población CD4<sup>+</sup> fue seleccionada para el análisis. **(a)** "Dot Plots" representativos para cada condición son mostrados. **(b)** Gráfico del porcentaje de células CD4<sup>+</sup> proliferantes (CFSE<sup>low</sup>), del total de células CD4<sup>+</sup>, co-cultivadas ante los distintos tratamientos de DCs (n = 7). \*\*\* p < 0,001. Trabajo realizado por Lorena Hoyos en el marco de su tesis de pregrado.