

UCH-FC
Biotecnología
R173
C-1



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO**

**Efecto de la Incorporación de Fagosomas en el
Estado de Maduración de las Células Dendríticas.**

Seminario de Título
Entregado a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniera en Biotecnología Molecular.



VALERIE TRINIDAD RAMÍREZ FERNANDEZ

Directores de Seminario de Título: Dra. María Rosa Bono
Dr. Juan Alberto Fierro



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 la Srta.:

VALERIE TRINIDAD RAMÍREZ FERNÁNDEZ

“EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE FAGOSOMAS EN EL ESTADO DE MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS DENTRÍTICAS”

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

Directores Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono Merino

Dr. Juan Alberto Fierro Correa

Comisión de Evaluación

Dr. Christian González-Billault
Presidente

Dr. Flavio Salazar Onfray
Evaluador

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]



Santiago de Chile, noviembre e de 2009

A mis hermanas, Lía y Rocío.



AGRADECIMIENTOS

Hay dos personas en mi vida que se merecen mucho más que un agradecimiento, pues han estado a mi lado incondicionalmente y se han transformado en mi inspiración y mi fuerza, a mis dos hermanas Lía y Rocío les doy las gracias por ser como son, alegres, inteligentes y buenas, son mi familia, todo lo que tengo y ustedes saben que esto es únicamente por ustedes.

Quiero agradecer también a mis abuelos y mis tías Nelly (mi segunda mamá) y Nidia, que sin obligación de ayudarme fueron mis cómplices en este desafío que me propuse hace ya 5 años. Ellos creyeron en mí, sin cuestionarme. Les debo demasiado y espero poder retornarlo.

Mis amigos iquiqueños que han estado siempre conmigo y que forman parte de mi vida y mi familia. Nalli, Pato, Camilo y Cheta, con los cuales he compartido muchos momentos, me han hecho reír, me han consolado y me han escuchado cada vez que los he necesitado. Me han demostrado que la amistad perdura a pesar del tiempo y la distancia. Muchas gracias por todo eso. A las buenas amigas que encontré en Santiago, a Carito, Nancy, Pame, Sandrita, porque me han demostrado que existe gente buena y leal aún, y porque sé que puedo contar con ustedes siempre.

A todo el grupo de inmunología un gran agradecimiento, pues han tenido la disposición de ayudarme, de enseñarme, siempre aportando buenas ideas o corrigiéndome si es necesario. Creo que se transformaron en una segunda familia para mí, donde me sentí realmente acogida. A Jaime, Dani, Jenny, Leo, Paz, Pao, Alejandra, Karla, Pame, Camila, y muy especialmente al team trasplante: Cinthia, Caco y Paulina, que hemos luchado codo a codo por sacar a los fagosomas adelante.

Finalmente debo agradecer a mis directores de tesis, por ser mucho más que mis directores, por guiarme en este desafío, por aconsejarme tanto en lo laboral como en lo personal, por apoyarme para emprender nuevos desafíos y por exigirme para dar lo mejor de mí.



BIOGRAFÍA



Nací en Iquique, una ciudad que deja una marca indeleble en todos sus hijos. Vengo donde el desierto es señor y todos los días son favorables para disfrutar de la vida, donde se duerme siesta después de almuerzo y el comercio abre a las 11. Yo pensaba que no había otra manera de vivir. Hasta que se me metió la loca idea de ser científica, así de simple. Todo gracias a unos profesores medios locos que veían cualidades en mi que ni yo conocía.

Así llegué a Santiago, sólo para estudiar, sin un motivo claro, sólo quería saber más. Pasaron 5 años, muy rápidamente y por supuesto que aprendí. Aprendí muchas formulas, a cuestionármelo todo y a resolver problemas. Aprendí mucho de mi misma, pues soy más fuerte de lo que pensaba, cumplo mis metas, soy fiel a lo que creo y soy capaz de luchar hasta alcanzar lo que quiero. Al terminar mi etapa universitaria, siento que todo va a mi favor, que mágicamente todo conspira para mí, sólo quiero comenzar a vivir, desarrollar mis capacidades y habilidades. Esto es sólo el comienzo.



ÍNDICE DE CONTENIDO



DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE CONTENIDOS	iv
INDICE DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1 Animales.	11
2.2 Anticuerpos y reactivos.	11
2.3 Generación de fagosomas alogénicos.	12
2.4 Cuantificación de proteína total en fagosomas.	13
2.5 Marcaje de fagosomas alogénicos con PKH26.	14
2.6 Generación de células dendríticas.	14
2.7 Purificación de células dendríticas.	15
2.8 Incorporación de fagosomas por células dendríticas generadas en presencia de vitamina D ₃ .	15
2.9 Activación de células dendríticas.	16

2.10	Medición de citoquinas por CBA.	17
2.11	Análisis estadístico.	17
3.	RESULTADOS	18
3.1	Células dendríticas de médula ósea generadas en presencia de vitamina D ₃ presentan un fenotipo inmaduro.	18
3.2	Las células dendríticas generadas con Vitamina D ₃ aumentan la secreción de IL-10.	20
3.3	Vitamina D ₃ favorece la incorporación de fagosomas en células dendríticas.	22
3.4	La incorporación de fagosomas en las BMDC _{VD3} depende del tiempo de incubación y de la cantidad de fagosomas.	24
3.5	La incorporación de fagosomas alogénicos no induce la maduración de BMDC _{VD3} .	27
3.6	La incorporación de fagosomas alogénicos no altera el patrón de secreción de citoquinas de BMDC _{VD3} .	30
4.	DISCUSION	32
5.	CONCLUSIÓN	37
6.	REFERENCIAS	38



ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	La vitamina D ₃ genera un fenotipo inmaduro en BMDCs.	19
FIGURA 2	La Vitamina D ₃ , induce la secreción de IL-10 en BMDC _{VD3} .	21
FIGURA 3	Incorporación de fagosomas por BMDC _{VD3} .	23
FIGURA 4	La incorporación de fagosomas por las BMDC depende del tiempo y de la cantidad de fagosomas	26
FIGURA 5	La incorporación de fagosomas alogénicos no induce la maduración de las BMDC _{VD3} .	29
FIGURA 6	La incorporación de fagosomas alogénicos no altera el patrón de secreción de citoquinas en BMDC _{VD3} .	31



LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH) ₂ D ₃	1 α ,25-Dihidroxitamina D3. Forma activa de VD3.
APC	Alofocociannna.
BSA:	Albúmina sérica de bovina.
BMDC	<i>Bone marrow- derived dendritic cells</i> . Células dendríticas de medula ósea.
DC:	Célula Dendrítica.
EDTA:	Ácido etilendiaminotetra acético.
FBS:	Suero fetal bovino.
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> .
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína.
GM-CSF:	Factor estimulador de colonia granulocito-macrófago.
IL-6:	Interleuquina 6.
IL-12:	Interleuquina 12.
IL-10:	Interleuquina 10.
LB:	Linfocito B.
LT:	Linfocito T.
LT CD4:	Linfocito T cooperador.
LT CD8:	Linfocito T citotóxico.
LTreg:	Linfocito T regulador.
LPS:	Lipopolisacárido bacteriano.
MCP-1	Proteína quimioattractante de monocitos-1.
MHC-I/II:	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II.
NFkB:	Factor nuclear kB.

PBS:	Tampón de fosfato salino.
PE:	Ficoeritrina.
PLGA	<i>Poly Lactic-co-Glycolic Acid.</i>
RPMI:	Medio de cultivo para el crecimiento de linfoblastos.
RXR:	Receptor X de retinoides.
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral alfa.
VDR:	Receptor de Vitamina D.
VDRE	Elementos respuesta del receptor de la vitamina D.
VD3:	Vitamina D ₃ .

RESUMEN

Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos profesionales capaces de iniciar o modular la respuesta inmune. Cuando las células dendríticas se encuentran en un estado inmaduro, caracterizado por una baja expresión de moléculas coestimuladoras y moléculas MHC-II, pueden regular la respuesta inmune produciendo tolerancia. Esto significa que las células dendríticas pueden diferenciar a linfocitos T vírgenes en linfocitos T reguladores, los cuales bloquean la activación y las funciones de los linfocitos T efectores, controlando de esta manera la respuesta inmune.

En el caso de trasplantes, el elevado número de linfocitos T alorreactivos existentes en el receptor conlleva una fuerte respuesta inmune provocando el rechazo de alotrasplantes. Sin embargo, el uso de drogas inmunosupresoras ha permitido superar esta barrera, actuando de manera no específica manteniendo a los pacientes transplantados en un estado de inmunodeficiencia generalizado.

El objetivo de este trabajo es generar células dendríticas inmaduras capaces de incorporar aloantígenos permaneciendo en un estado inmaduro, siendo potenciales reguladoras de la respuesta inmune en un modelo de alotrasplantes.

Para ello, se generaron células dendríticas en presencia de vitamina D₃ las cuales fueron cargadas con antígenos alogénicos en forma de fagosomas. Demostramos que tanto el fenotipo, como el patrón de secreción de citoquinas de las células dendríticas permanecían sin cambios después de la incorporación de fagosomas y además se transformaban en células resistentes a la maduración. Estos

resultados demuestran que las células dendríticas inmaduras podrían ser utilizadas para inducir tolerancia hacia aloantígenos en trasplantes.

ABSTRACT

Dendritic cells are professional antigen presenting cells capable of initiate or modulate the immune response. When dendritic cells are in an immature state, characterized by low expression of MHC-II and costimulatory molecules, they may regulate the immune response by inducing tolerance. This means that naïve T lymphocytes can differentiate into regulatory T cells, which block the activation and function of effector T lymphocytes

In allotransplants, the alloreactive T lymphocytes in the recipient develop a strong immune response leading to rejection of the allograft. However, the use of immunosuppressive drugs has helped overcome this problem acting in a no specific way to keep transplanted patients in a generalized immunodeficiency state. Recently it has been described that regulatory T are able to suppress an allogeneic immune response in an antigen specific manner.

The aim of this work was to generate immature dendritics cells capable of incorporate alloantigens remaining in an immature state.

For this purpose, we differentiated dendritics cells in the presence of vitamin D3 which were loaded with allogeneic antigens in the form of phagosomes. We demonstrate that the phenotype and the pattern of cytokine secretion of dendritics cells remained unchanged after the incorporation of phagosomes. These results demonstrate that immature dendritics cells could be used to induce tolerance to allo-antigens in transplantation.

1. INTRODUCCIÓN

Las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígenos profesionales que poseen la capacidad de iniciar y modular la respuesta inmune. Las DCs están localizadas en la mayoría de los tejidos, en donde capturan antígenos microbianos provenientes del medio externo, los fagocitan y los procesan generando una gran cantidad de péptidos que son cargados en las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y clase II (MHC-II) y presentados en la superficie celular. Posteriormente, las DCs aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, y migran hacia los órganos linfáticos donde presentan los antígenos a linfocitos T (LT) vírgenes para iniciar la respuesta inmune (Branchereau & Steinman, 1998). El estado de maduración de la DC determina el tipo de respuesta inmune asociada (Vlad y col, 2005). De esta forma, si las DCs capturan y presentan antígenos en un contexto no inflamatorio mantendrán un fenotipo inmaduro, caracterizado por una alta capacidad fagocítica, una baja expresión de MHC-II y de moléculas coestimuladoras. Se ha descrito además que las DCs inmaduras poseen la capacidad de generar linfocitos T reguladores (LT reg), los cuales favorecen una respuesta tolerogénica a través de la supresión de la respuesta efectora de los linfocitos T (Roncarolo y col, 2001). Los LT reg son generados en el timo (Proietto y col, 2008), y en la periferia (Coombes y col, 2007) gracias a la acción de DCs con fenotipo tolerogénico. La inducción eficiente de tolerancia específica puede ser lograda por las DCs, mediante la presentación de antígenos controlando el estado de maduración de estas células. (Steinman, 2007).

Como ya se mencionó, las DCs inmaduras tienen la propiedad de fagocitar eficientemente partículas o moléculas externas. Estas son internalizadas e ingresadas por la vía endocítica a un compartimiento llamado fagosoma, el cual se fusiona con el lisosoma formando el fagolisosoma. En este compartimiento, los antígenos extracelulares son degradados por diferentes proteasas, principalmente por las catepsinas S y L (Villadangos y col, 1999; Lennon-Duménil y col, 2002). Paralelamente, las moléculas MHC-II recién sintetizadas en el retículo endoplásmico son transportadas al fagolisosoma en donde se forma el complejo péptido/MHC-II que es transportado a la superficie celular y presentado a linfocitos T colaboradores o CD4⁺ (LT CD4+) (Bénaroch y col, 1995). En nuestro laboratorio desarrollamos un protocolo de obtención de fagosomas a partir de DCs capaces de fagocitar partículas de látex. Los fagosomas aislados de las DCs contienen entre otras, moléculas MHC-I y MHC-II, las cuales pueden ser usadas como vehículos que transportan péptidos antigénicos. Se demostró que la fagocitosis de las partículas de látex no madura a las DCs (Ureta, 2007). El PLGA (*poly lactic-co-glycolic acid*), es otro material que puede ser utilizado para la generación y aislamiento de fagosomas, pues es biodegradable, biocompatible y en el cuerpo humano se hidroliza en ácido láctico y ácido glicólico, de manera inocua. (Gad, 2008). Ha sido utilizado en ratones y humanos *in vivo* y fue aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA). El PLGA fue probado en tratamientos terapéuticos, como sistema de entrega de fármacos (Dawes, 2009), por ejemplo en el tratamiento contra la diabetes tipo 1, en donde se encapsula la insulina en micro perlas de PLGA para permitir la liberación continua de la hormona (Kim, 2009).

En la actualidad, las investigaciones apuntan a encontrar péptidos o compuestos químicos con fines terapéuticos que permitan mantener el fenotipo

inmaduro en las DCs (Rutella y col, 2004) y que además produzcan una respuesta inmune tolerogénica antígeno específica. Esto es muy relevante para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y para eliminar el rechazo de trasplantes alogénicos. (Scholz y col, 2008; Fisher y col, 2009).

Uno de los compuestos utilizados como modulador de la respuesta inmune es la 1,25-dihidroxitamina D₃ conocida como vitamina D₃ (VD₃), que corresponde a la forma fisiológica más abundante de la Vitamina D (Xing y col, 2002). Esta molécula lipofílica esteroidea, es sintetizada en la piel desde el 7-dehidrocolesterol en un proceso dependiente de la luz solar, más específicamente de la radiación ultravioleta B (270-300nm de longitud de onda). De manera alternativa puede ser adquirida desde la dieta o por suplementos vitamínicos (Holick y col, 2007). La VD₃ es convertida en el hígado a 25-dihidroxitamina D₃ y luego es metabolizada en el riñón a 1,25-dihidroxitamina D₃. Además de ser procesada en el hígado y el riñón, la VD₃ puede ser metabolizada por las células del sistema inmune, incluyendo macrófagos, DCs, linfocitos B (LB) y LT, ya que estas células poseen las enzimas CYP27A1 y/o CYP27B1 capaces de hidrolizar la 25-dihidroxitamina D₃ a 1,25-dihidroxitamina D₃ (Holick y col, 2007). En las células del sistema inmune la VD₃ ejerce su acción de manera autocrina o paracrina uniéndose a su receptor nuclear VDR (Norman, 2004), formando un heterodímero con el receptor de retinoides (RXR). Finalmente, el complejo se une a los elementos de respuesta a vitamina D₃, (VDREs) presentes en el genoma promoviendo la expresión de los genes blanco de la VD₃. (Mora y col, 2008). Se ha descrito que en macrófagos la VD₃ reduce la actividad del factor de transcripción NFκB, principal regulador de la transcripción de genes relacionados con inmunidad y respuestas inflamatorias (Cohen-

Lahav y col, 2006). En humanos, se ha demostrado que la VD3 reduce la secreción de MCP-1 en células del anillo fibroso lumbar (Gruber y col, 2008).

La VD3 bloquea la maduración de las DCs *in vitro* produciendo la reducción de la expresión de moléculas coestimuladoras y de MHC-II, inhibiendo la secreción de IL-12 y aumentando la producción de IL-10 (van Etten y Mathieu, 2005). Más aún, en DCs la VD3 es capaz de aumentar la secreción de CCL22, el cual es un quimioattractante de LT a la piel (Penna y col, 2007). Por otra parte, se ha demostrado en un modelo murino que la administración de una dosis única de la VD3 puede aumentar la capacidad supresora de LT reg aislados desde los ganglios linfáticos drenantes (Gorman y col, 2007). Estas observaciones indican que la VD3 induce un microambiente regulador tanto *in vitro* como *in vivo*.

Uno de los mayores retos de la medicina del trasplante de órganos es lograr el control de la fuerte respuesta inmune que se produce contra los antígenos del donante responsables del rechazo de injertos. El rechazo de trasplantes alogénicos involucra la participación de muchas poblaciones celulares, en especial de LT CD4+, de LT CD8+ (LTC) alorreactivos y de anticuerpos alorreactivos secretados por los LB. Dentro de las primeras 48 horas después del trasplante, las DCs que residen en el injerto trasplantado migran a los ganglios linfáticos del receptor, donde estimulan a los LT CD4+ y LT CD8+ alorreactivos a producir citoquinas como IL-2 e IFN- γ provocando que tanto la población LT CD4+ como la población LT CD8+ proliferen y se diferencien (Dallman MJ. ,1992). Los LT CD8+ activados causan la destrucción del injerto por lisis directa a través de la granzima B y las perforinas (Lowry, 1996). Las citoquinas producidas promueven la activación y el reclutamiento de macrófagos y eosinófilos, los

cuales secretan enzimas proteolíticas, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno destruyendo al injerto. Finalmente los LT CD4+ activados proveen la ayuda necesaria a los LB para producir aloanticuerpos.

Existen 2 tipos de reconocimiento de aloantígenos, el reconocimiento directo y el indirecto, los cuales son responsables del rechazo agudo y crónico respectivamente. (Murphy y col, 1996). El reconocimiento directo se debe principalmente a los LT CD4+ y LT CD8+ aloreactivos del receptor, que representan alrededor de 10% de los LTs totales. Estos linfocitos aloreactivos al interactuar directamente con las moléculas MHC-II de las células presentadoras de antígenos (APC) del donante residentes en el injerto se activan. Por otro lado, el reconocimiento indirecto se debe a la presentación de péptidos derivados del procesamiento de las moléculas de MHC-II del donante que son reconocidos por LT como antígenos proteicos convencionales. (Lechler, 2005).

Aunque existen muchas drogas inmunosupresoras que inhiben el rechazo agudo, permitiendo la aceptación del injerto por algún tiempo definido, una proporción importante de pacientes sufren la pérdida del trasplante por el rechazo crónico (Lechler, 2005). Además, las drogas inmunosupresoras aumentan la probabilidad de sufrir infecciones por enfermedades oportunistas y causan efectos secundarios no relacionados con la inmunosupresión como la hipertensión y las enfermedades cardiovasculares (Libby y Pober, 2001). En los últimos años, han aumentado considerablemente las investigaciones centradas en el desarrollo de nuevos métodos para promover la tolerancia específica a órganos trasplantados. Así, la producción de DCs inmaduras con propiedades tolerogénicas, capaces de modular en forma antígeno

específica la fuerte respuesta inmune que se produce en alotrasplantes podría ser una estrategia exitosa para disminuir el rechazo a trasplantes. (Morelli y col, 2007)

El objetivo de este seminario de título fue caracterizar en un modelo murino el fenotipo de DCs generadas en presencia de VD3 después de la incorporación de fagosomas alogénicos de PLGA. El objetivo a largo plazo es producir tolerancia específica hacia el donante, a través de la capacidad de las DCs de capturar y procesar antígenos presentes en la membrana de los fagosomas presentados en un contexto no inflamatorio. Para esto evaluamos el marcador de activación CD86, MHC-II y el patrón de citoquinas, tanto inhibitorias del sistema inmune como lo es la IL-10, como las citoquinas pro inflamatorias IL-12, IL-6, TNF- α y MCP-1.

HIPÓTESIS

Células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea, generadas en presencia de VD3, incorporan fagosomas alogénicos sin alterar su estado de maduración.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la incorporación de fagosomas en la maduración de las células dendríticas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar células dendríticas inmaduras de un ratón C57BL/6 a partir de precursores de médula ósea mediante la diferenciación con GM-CSF recombinante en presencia de vitamina D₃.
- Determinar la expresión del marcador de maduración de DCs, CD86, MHC-II y estudiar el patrón de secreción de las citoquinas IL-6, IL-10, IL-12, MCP-1 y TNF- α .
- Obtener fagosomas alogénicos utilizando perlas de PLGA.
- Analizar la incorporación de fagosomas alogénicos en DCs inmaduras.
- Analizar el estado de maduración y el patrón de secreción de citoquinas en células dendríticas inmaduras cargadas con fagosomas alogénicos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ratones

Se utilizaron ratones C57BL/6 y BALB/c que poseen un fondo genético H-2^b y H-2^d respectivamente. Los ratones utilizados tenían de 2 a 3 meses de edad.

2.2 Anticuerpos y Reactivos.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales comerciales de BD PharMingen:

Conjugados con FITC: anti-IA^b clon 25-9-17, anti- IA^d clon AMS-32.1, anti- CD86 clon GL1, anti-CD80 clon 16-10A1. Conjugados con PE: anti-CD11c clon HL3. Conjugados con APC: anti-CD11c clon HL3.

Además se usaron los siguientes reactivos: 2-mercaptoetanol (Invitrogen), gentamicina (Laboratorio Sanderson), tripsina (Gibco BRL) MACS anti-CD11c clon N418 (Miltenyi Biotec), perlas de PLGA (obtenidas en colaboración con el Dr.S. Little, U. Pittsburgh), Vitamina D₃ (1 α ,25-Dihidroxitamina D₃) (Sigma) diluida en etanol a una concentración de 1,6 μ M y almacenada a -20°C. Se usó también GM-CSF recombinante murino (BD PharMingen).

2.3 Generación de Fagosomas Alogénicos.

Para la generación de fagosomas es necesario producir células dendríticas a partir de precursores de médula ósea, los cuales son cultivados con el sobrenadante de la línea celular J558L transducida con el gen murino de GM-CSF (Pino, 2005). En estas condiciones las DCs generadas poseen una alta capacidad fagocítica.

Los precursores de DCs se extrajeron de las tibias y fémures de un ratón BALB/c, el cual representa las células del donante. Los huesos se lavaron en etanol 70% por 1 minuto y se perfundieron con medio RPMI suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/mL y se lisaron los glóbulos rojos incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente con una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH₄Cl 0.15 M, KHCO₃ 10 mM y Na₂EDTA 0.1 mM, pH 7.2-7.4). Posteriormente se lavaron las células con medio RPMI y se cultivaron en placas de Petri bacteriológicas (140mm, Sterilin, Barloworld Scientific) a una densidad de 10⁷ células totales por placa en 20 ml de medio completo que contiene: RPMI + 10% FCS + 50µM 2-Mercaptoetanol + 50 µg/mL gentamicina + 3% vol/vol del sobrenadante de la línea celular J558L secretora de GM-CSF murino. Las células se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂. A los días 4 y 8 de cultivo se cambió el medio de cultivo, por medio fresco completo. Para ello, las células se tripsinizaron por 6 min, luego se lavaron con RPMI + 10% FCS y se volvieron a sembrar en placas Petri bacteriológicas nuevas a la misma densidad inicial.

Al día 12 del cultivo se recuperaron las células de las placas, tanto la fracción adherente como la no adherente y se verificó el fenotipo de las células dendríticas por

citometría de flujo con los marcadores de superficie CD11c, MHC-II y los marcadores de activación CD80 y CD86.

Para la generación de fagosomas, se colocaron $50 \cdot 10^6$ de DCs en un tubo Falcon de 50 ml con $250 \cdot 10^6$ perlas de PLGA. La incubación se realizó por 20 minutos a 37°C en un volumen final de 1 ml de medio RPMI+ 10% FCS en un baño termostático. Posteriormente se agregaron 4 ml de medio RPMI + 10% FCS y se incubó por 70 minutos más a 37°C en el baño termostático.

Para detener la fagocitosis, las células se lavaron 3 veces con 40 ml PBS frío y se resuspendieron en 1 mL de PBS + 2% FCS. Las células se lisaron mecánicamente con una jeringa de 21G en un tubo Eppendorf, se centrifugaron a $155 \times g$ por 5 min y se recuperó el sobrenadante, el cual se almacenó a 4°C , hasta su utilización.

2.4 Cuantificación de Proteína Total de los Fagosomas Alogénicos.

La determinación de la cantidad de proteína total presente en los fagosomas se realizó a través del método del ácido bicinonínico (Sigma). Este método se basa en la capacidad de las proteínas de reducir Cu^{+2} a Cu^{+1} , en condiciones alcalinas. El ácido bicinonínico al unirse a Cu^{+1} provoca un cambio de color que se mide a una longitud de onda de 562nm.

2.5 Marcaje de Fagosomas con PKH26.

Para evaluar por citometría de flujo la incorporación de los fagosomas por las células dendríticas, los fagosomas se marcaron específicamente con la tinción roja fluorescente PKH26 (Sigma). El protocolo usado fue adaptado del sugerido por los fabricantes para teñir células. El PKH26 se utilizó a una concentración de $6 \cdot 10^{-6}$ M. Los fagosomas se centrifugaron a 4°C por 10 min a $15.450 \times g$, para luego resuspender el precipitado rápidamente en la solución de PKH26 más el diluyente provisto en el kit y se incubaron por 5 minutos con agitación suave a temperatura ambiente. Para detener la reacción se agregó una cantidad equivalente en volumen de una solución de BSA al 1% y se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente los fagosomas se lavaron 3 veces con 1 mL PBS + 2% FCS, centrifugando cada vez a $15.450 \times g$ por 10 min a 4°C. Los fagosomas marcados se almacenaron a 4°C, evitando la exposición a la luz. Después del marcaje se cuantificó la cantidad de proteína total que contenía la solución de fagosomas con el método de cuantificación mencionado en la sección anterior.

2.6 Generación de Células Dendríticas de precursores de médula ósea.

Las células dendríticas que incorporarán fagosomas alogénicos se generaron a partir de ratones C57BL/6. Para esto se extrajeron tibias y fémures y se lavaron con etanol 70% por 1 min. Los huesos se perfundieron con medio RPMI suplementado con L-glutamina 2mM, penicilina 100U/ml y estreptomina 100 μ g/mL. Se lisaron los glóbulos rojos con una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH_4Cl 0.15 M, KHCO_3 10 mM y Na_2EDTA 0.1 mM, pH 7.2-7.4), y luego se lavaron con medio RPMI.

Las células se resuspendieron a una concentración de $1 \cdot 10^6$ cel/ml en medio RPMI + 10% FCS + 10 ng/ml rGM-CSF, se distribuyeron en placas de 24 pozos (1 ml/pozo) y se incubaron por 6 días a 37°C y 5% de CO₂. Al día 2 y 4 de cultivo, se cambió el medio de cultivo por medio fresco suplementado con VD3 a una concentración final de 1nM o de etanol puro que corresponde al solvente en el que se diluyó la VD3.

2.7. Purificación de Células Dendríticas.

Para enriquecer las células dendríticas, al día 6 de cultivo se recolectaron y centrifugaron a $400 \times g$ por 5 min. Luego las células se resuspendieron en 300µl de tampón MACS (PBS + 2mM EDTA + 5% FBS). Las células se incubaron por 20 minutos a 4°C con agitación rotatoria con 30µl de anticuerpo monoclonal anti-CD11c de ratón acoplado a microesferas magnéticas MACS (clon N418, Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach). Las células se lavaron y se resuspendieron en 1ml de tampón MACS y luego fueron sometidas a selección positiva con un imán (VarioMACS) y con la columna magnética (Columnas LS; Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante. Finalmente se recolectó la fracción positiva para CD11c, que contiene células dendríticas con una pureza de alrededor del 90% determinada mediante citometría de flujo (BD, FACS Canto II).

2.8 Incorporación de Fagosomas Alogénicos por Células Dendríticas generadas en presencia de Vitamina D₃.

Una vez purificadas las células dendríticas, se resuspendieron en RPMI + 10% FCS a una concentración de $1 \cdot 10^6$ células/ml y se les agregó 40 µg de proteína total de

fagosomas marcados con PKH26. Las células se cultivaron por 4h a 37°C y 5% de CO₂ y se verificó la incorporación de fagosomas por citometría de flujo. Como control negativo se determinó la incorporación de fagosomas a 4°C.

También se analizó la fagocitosis en función del tiempo y con distintas concentraciones de fagosomas marcados. En el primer caso, se detuvo la fagocitosis después de 1, 2, 4 ó 6 horas. En el segundo caso se agregaron 10 µg, 20 µg, 40 µg ó 60 µg de proteína total de fagosomas marcados.

2.9 Activación de Células Dendríticas generadas en presencia de Vitamina D₃ que incorporaron Fagosomas.

Las células dendríticas que incorporaron o no fagosomas se centrifugaron a 400 x g a 4°C por 5 minutos y se resuspendieron a una densidad de 4 x10⁶ células/ml en RPMI +10% FBS. Se sembraron 100 µl de la suspensión celular en pozos de una placa de fondo redondo de 96 pocillos y fueron activadas durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂ con LPS purificado de *Salmonella typhosa* a una concentración final de 100 ng/ml. Luego de este tiempo se recuperaron las células, se centrifugaron a 400 x g por 5 minutos y se recolectaron los sobrenadantes para analizar la secreción de las citoquinas IL-10, IL-12p70, IL-6, TNF-α y MCP-1 mediante el método CBA, mientras que las células fueron evaluadas en cuanto a su estado de madurez mediante citometría de flujo.

2.10 Medición de Citoquinas por CBA.

Los sobrenadantes obtenidos después de la activación de las DCs con LPS fueron analizados para medir la concentración de las citoquinas IL-10, IL-12p70, IL-6, TNF- α y MCP-1 a través de la técnica CBA (*Cytometric Bead Array*) usando el *Mouse Inflammation Kit* (BD TM). Se utilizaron 11 μ l de sobrenadante a los cuales se les agregó 2 μ l de cada de tipo perla específica para detectar sólo un tipo de citoquina más 11 μ l de *PE Detection Reagent*. Esta mezcla se incubó por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se lavaron las muestras con la solución de lavado provista en el kit centrifugándolas a 250 \times g por 5 minutos, luego se resuspendieron en 300 μ l de la solución de lavado y se midió la concentración de citoquinas por citometría de flujo. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa BD CBA Software (BD TM).

2.11 Análisis Estadístico.

Los gráficos de barras son presentados como la media \pm el error estándar. Para el análisis estadístico y el diseño de los gráficos se usó el programa GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc.), utilizando el test de ANOVA de una cola con test de comparación múltiple de Bonferroni.

3. RESULTADOS

3.1 Células dendríticas de médula ósea generadas en presencia de Vitamina D₃ presentan un fenotipo inmaduro.

Resultados anteriores de nuestro laboratorio demostraron que las células dendríticas generadas en presencia del sobrenadante de la línea celular J558L en conjunto con VD3, presentan un fenotipo inmaduro, caracterizado por una baja expresión de moléculas coestimuladoras y de MHC-II (Ureta, 2007). En la figura 1 se muestra que células dendríticas de médula ósea generadas en presencia de 10 ng/ml de GM-CSF recombinante y de VD3 1nM (BMDC_{VD3}), presentan un fenotipo inmaduro similar al reportado anteriormente, con una menor expresión de la molécula coestimuladora CD86 y de MHC-II, comparadas con las células dendríticas que son tratadas sólo con el solvente de la VD3 (BMDC_{ETOH}). Cabe destacar que las células dendríticas generadas con VD3 tienen un fenotipo inmaduro resistente a la activación por LPS, que se observa al comparar la expresión de CD86 en células BMDC_{VD3} y BMDC_{VD3}/LPS, donde la expresión aumenta solamente de un 4% a un 7% solamente.

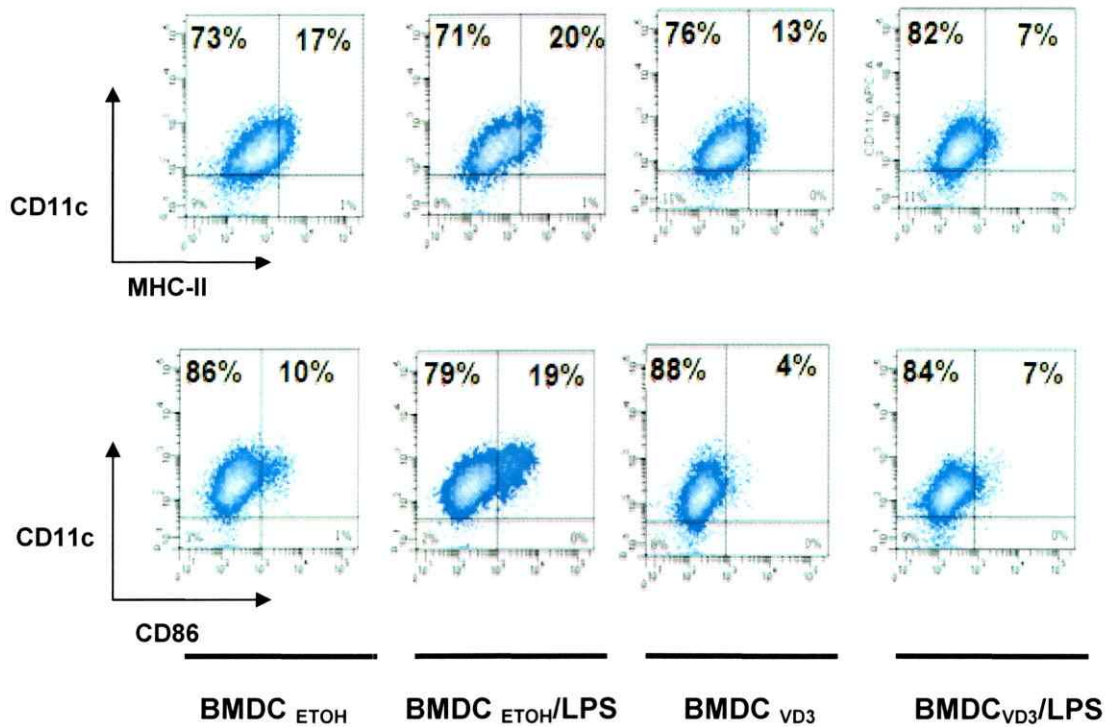


Figura 1. La vitamina D₃ genera un fenotipo inmaduro en BMDCs. Células dendríticas obtenidas a partir de precursores de médula ósea diferenciadas en presencia de rGM-CSF, tratadas con vitamina D₃ (BMDC_{VD3}) o sólo con el solvente (BMDC_{ETOH}) se purificaron y activaron con LPS a 100 ng/ml durante toda la noche. La expresión de CD11c, MHC-II y CD86 se analizó mediante citometría de flujo. Resultados representativos de 3 experimentos independientes.

3.2. Las células dendríticas generadas con vitamina D₃, aumentan la secreción de IL-10.

Se ha demostrado que la VD3 es capaz de inducir un patrón de secreción inhibitorio en células dendríticas mieloides, lo que se traduce en un aumento en la secreción de IL-10 y una disminución de la secreción de la IL-12 (Penna, 2007). Con el fin de confirmar estos resultados se analizaron estas dos citoquinas en los sobrenadantes de las células dendríticas generadas en presencia de VD3 1nM activadas durante toda la noche con LPS 100ng/ml. Se evaluaron además las citoquinas pro inflamatorias: IL-6, IL-10, TNF- α y MCP-1, para saber si existe alguna diferencia en cuanto a su concentración en presencia de VD3. El conjunto de estos resultados son presentados en la figura 2, los cuales corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. En esta figura se muestra claramente que la secreción de IL-10 es significativamente mayor en BMDC_{VD3}, activadas con LPS comparada a todas las otras condiciones, confirmando los datos de la literatura.

Por otra parte, ninguna de las citoquinas pro inflamatorias evaluadas muestran cambios en presencia de VD3, incluyendo la IL-12, de la cual existían evidencias que la VD3 disminuye su concentración.

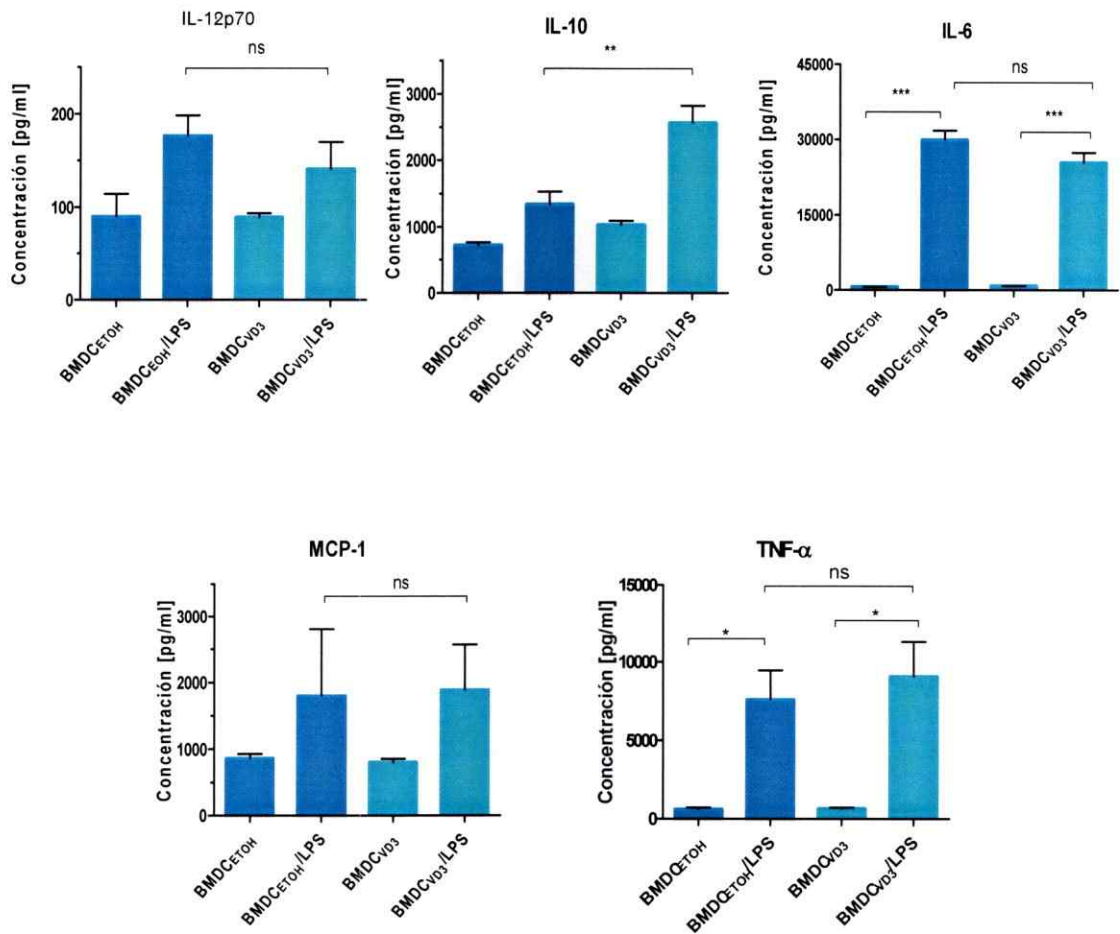


Figura 2. La Vitamina D₃, induce la secreción de IL-10 en BMDC. Células dendríticas generadas de médula ósea de un ratón C57BL/6 en presencia de 1nM de VD3 (BMDc_{VD3}) o del solvente, BMDc_{EtOH}, fueron activadas con 100ng/ml de LPS durante toda la noche a 37°C. En el sobrenadante se cuantificó por citometría de flujo la concentración de IL-12p70, IL-10, IL-6, MCP-1 y TNF-α. Sólo la concentración de IL-10 es significativamente mayor en presencia de VD3. La secreción de otras citoquinas es independiente de VD3. (ns, no significativo, * P<0,05, **P<0,01,***P<0,001). Se muestra el promedio ± error estándar de 3 experimentos independientes.

3.3. Vitamina D₃ favorece la incorporación de fagosomas en células dendríticas.

Las células dendríticas inmaduras se caracterizan por tener una alta capacidad fagocítica y baja respuesta inmunogénica. Una vez que la célula dendrítica fagocita un antígeno, ésta comienza un proceso de maduración cambiando morfológicamente, disminuyendo su capacidad fagocítica y aumentando la función activadora de la respuesta inmune, si es que el proceso ocurre en un microambiente pro inflamatorio. (Vlad y col, 2005).

Para determinar si las BMDC_{VD3} incorporan fagosomas alogénicos, se marcaron los fagosomas con el fluoróforo rojo PKH26 que se une a las cadenas hidrófobas de los fosfolípidos de las membranas celulares. Las BMDC generadas en presencia o ausencia de VD3 se incubaron por 4 horas a 37°C con 40µg de proteína total de fagosomas marcados con PKH26. Como control negativo de la fagocitosis se cuantificó la incorporación de fagosomas a 4°C. Posteriormente se determinó por citometría de flujo en las células CD11c positivas el porcentaje de células que eran positivas para PKH26.

En la figura 3, se compara el marcaje de PKH26 de las DCs control, (BMDC_{ETOH}) con las células dendríticas tratadas con VD3 (BMDC_{VD3}). Un 30% de las BMDC_{ETOH} incorporan los fagosomas alogénicos y esto aumenta hasta un 43% en las BMDC_{VD3}. No se observa una incorporación importante de fagosomas a 4°C.

Puesto que las células dendríticas generadas en presencia de VD3 1nM incorporan en un mayor porcentaje los fagosomas allogénicos marcados, esto sugiere que efectivamente estas células se encuentran en un estado más inmaduro.

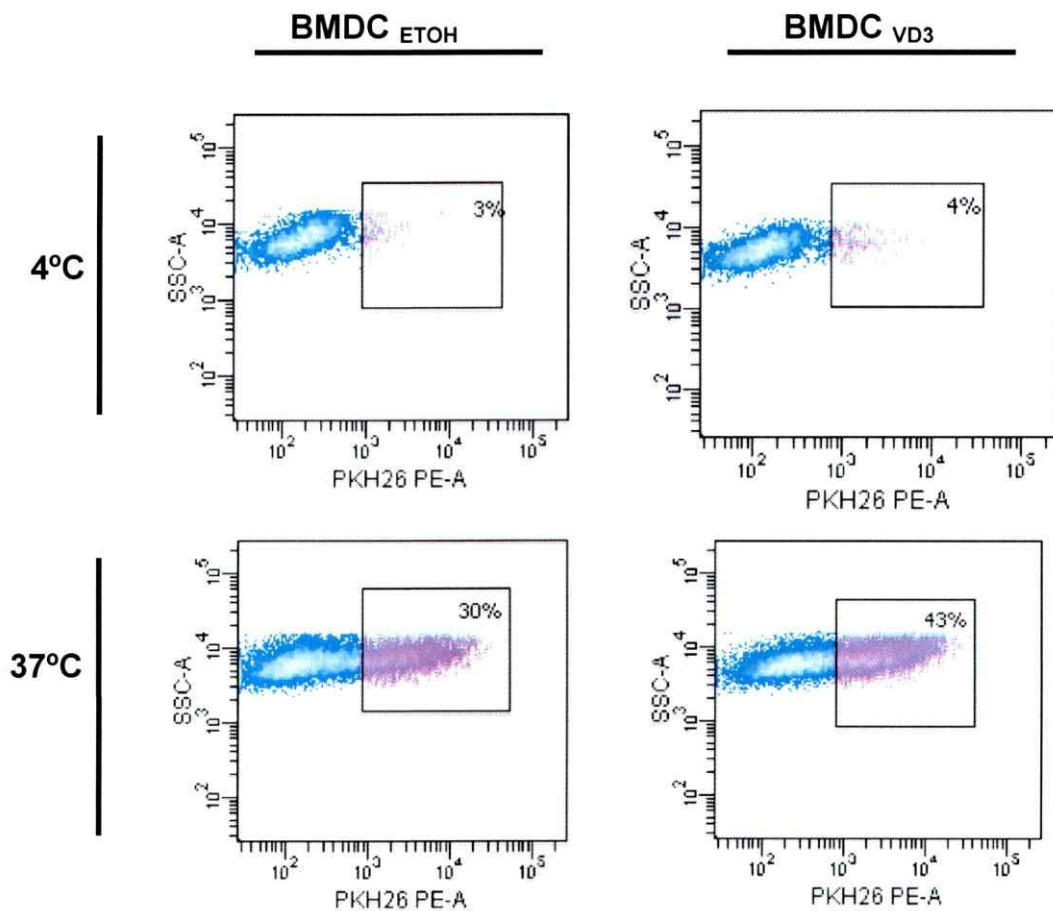


Figura 3. Incorporación de fagosomas por $BMDC_{VD3}$. Células dendríticas generadas de médula ósea de un ratón C57BL/6 tratadas o no con $VD3$ 1nM se cultivaron por 4h a $37^{\circ}C$ ó $4^{\circ}C$ con $40\mu g$ de fagosomas marcados con PKH26. El análisis de citometría de flujo mostrado se realizó en una ventana de análisis para las células CD11c positivas. Las $BMDC_{VD3}$ tienen mayor capacidad fagocítica que las $BMDC_{ETOH}$. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

3.4. La incorporación de fagosomas en las BMDC_{VD3} depende del tiempo y de la cantidad de fagosomas.

Uno de los objetivos importantes en este trabajo es obtener la incorporación óptima de fagosomas, por lo tanto se estudió la cinética de incorporación y la dependencia de la concentración de fagosomas. El estudio se realizó con BMDC_{VD3}, o control, BMDC_{ETOH} obtenidas de ratones C57BL/6.

En primer lugar se incubaron 40µg de fagosomas marcados con PKH26 con las DCs y se detuvo la fagocitosis después de 1h, 2h, 4h ó 6h. Se analizó por citometría de flujo el marcaje PKH26 en las células CD11c positivas. Como control de estos experimentos la fagocitosis se llevó a cabo a 4°C.

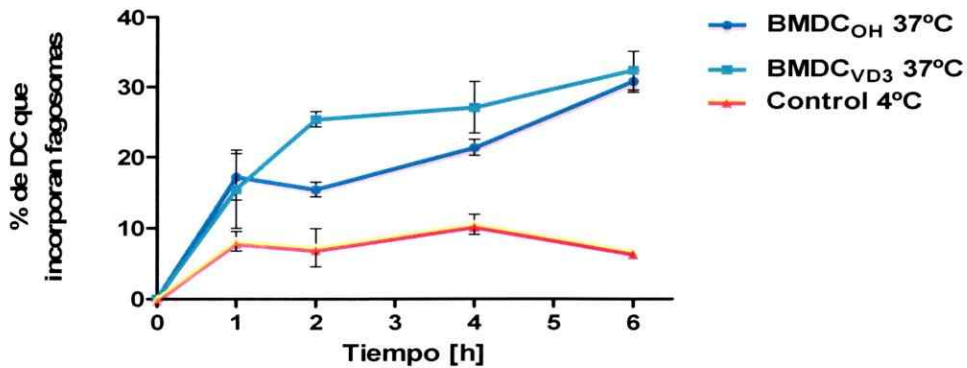
En la figura 4.A se observa que el proceso de fagocitosis de fagosomas alogénicos es dependiente del tiempo, tanto para las células BMDC_{VD3}, como para BMDC_{ETOH}. Se observa que el proceso de incorporación de fagosomas en las BMDC_{VD3} y en las BMDC_{ETOH} es cercano al máximo en las 2 primeras horas, para luego estabilizarse a las 6h. Además se observa la tendencia de las BMDC_{VD3} a tener una mayor capacidad fagocítica, comparadas con las BMDC_{ETOH}, posiblemente por su fenotipo más inmaduro. En base a estos resultados los experimentos de fagocitosis siguientes se realizaron por 4h.

Por otra parte, se estudió la dependencia del proceso de fagocitosis de la cantidad de fagosomas. Para ello, las BMDC_{VD3} y BMDC_{ETOH} se cultivaron por 4h con 10, 20, 40 ó 60 µg de fagosomas alogénicos marcados con PKH26 a 37°C ó 4°C. En

la figura 4.B se muestra el porcentaje células CD11c positivas que presentan la marca de PKH26.

En la figura 4.B se observa que la incorporación de fagosomas alogénicos marcados es dosis dependiente, llegando a un máximo de incorporación con 40-60 μg de proteína. Al igual que con la variable tiempo, la incorporación de los fagosomas es mayor y más rápida en las $\text{BMDC}_{\text{VD}_3}$ que en las $\text{BMDC}_{\text{ETOH}}$, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. En función de estos resultados, los experimentos siguientes se realizaron con 40 μg de proteína total de fagosomas.

A.



B.

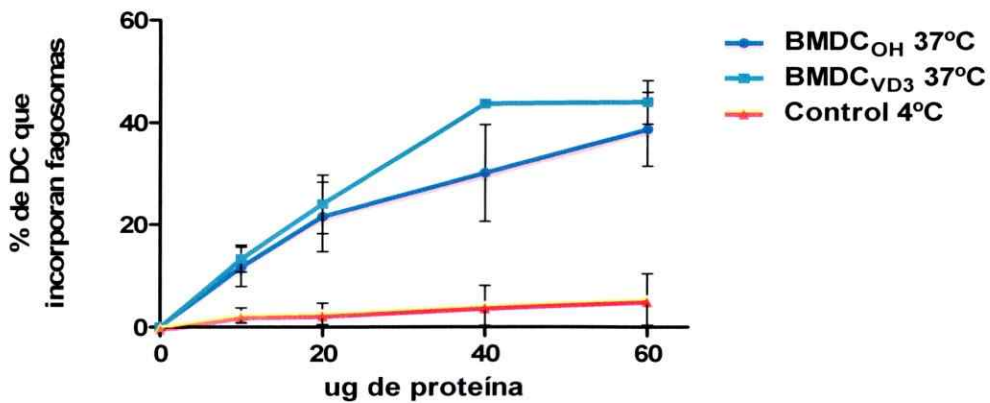


Figura 4. La incorporación de fagosomas por las BMDC depende del tiempo y de la cantidad de fagosomas. **A.** Células dendríticas de médula ósea de un ratón C57BL/6 tratadas o no con VD3, se cultivaron a 37°C ó 4°C con 40µg de fagosomas marcados con PKH26 por 1, 2, 4 ó 6 horas. **B.** Células dendríticas de médula ósea de un ratón C57BL/6 se cultivaron por 4h con 10, 20, 40 ó 60 µg de fagosomas marcados con PKH26 a 4°C ó 37°C. En ambas figuras se presenta el porcentaje de células dendríticas CD11c positivas que incorporaron fagosomas marcados con PKH26. Se muestra el promedio obtenido de 3 experimentos independientes.

3.5. La incorporación de fagosomas alogénicos no induce la maduración de BMDC_{VD3}.

Un punto central en la hipótesis de este trabajo es comprobar que la incorporación de fagosomas alogénicos no induce cambios en el estado de maduración de las BMDCs, manteniéndolas en un estado que favorecería la tolerancia. Por esto, se analizó mediante citometría de flujo la expresión del marcador de maduración CD86, luego de la incorporación de fagosomas. Las células tratadas con 1nM de VD3, BMDC_{VD3}, y las BMDC tratadas sólo con el solvente, BMDC_{ETOH} se purificaron y se cultivaron durante 4 horas a 37°C con 40µg de fagosomas marcados previamente con PKH26. Luego de la incorporación de fagosomas, las células se lavaron y se activaron con 100 ng/ml de LPS durante toda la noche a 37°C y 5% de CO₂.

En la figura 5 se muestra la expresión de CD86 analizado por citometría de flujo, en las células BMDC_{ETOH} y BMDC_{VD3} que incorporaron los fagosomas marcados con PKH26 después de la activación con LPS. En color rosado, se señala a las células dendríticas que presentan la tinción PKH26, indicando que han incorporado fagosomas alogénicos y en color azul se muestran las células dendríticas que no incorporaron fagosomas. Estos gráficos de 3 variables demuestran que las BMDC_{VD3} que incorporaron fagosomas alogénicos, presentan una baja expresión de la molécula coestimuladora CD86, y que después de la activación con LPS, las células dendríticas que incorporaron fagosomas previamente no maduran, manteniendo la expresión de CD86. Notablemente este fenómeno se observa tanto para BMDC_{ETOH} y BMDC_{VD3}, lo cual indica que la sola incorporación de fagosomas mantiene a las BMDCs en un estado resistente a la maduración.

El resultado de este experimento permite predecir que los antígenos presentes en los fagosomas deberían ser presentados en las moléculas MHC-II en ausencia de moléculas coestimuladoras, lo cual generaría tolerancia específica hacia el antígeno.

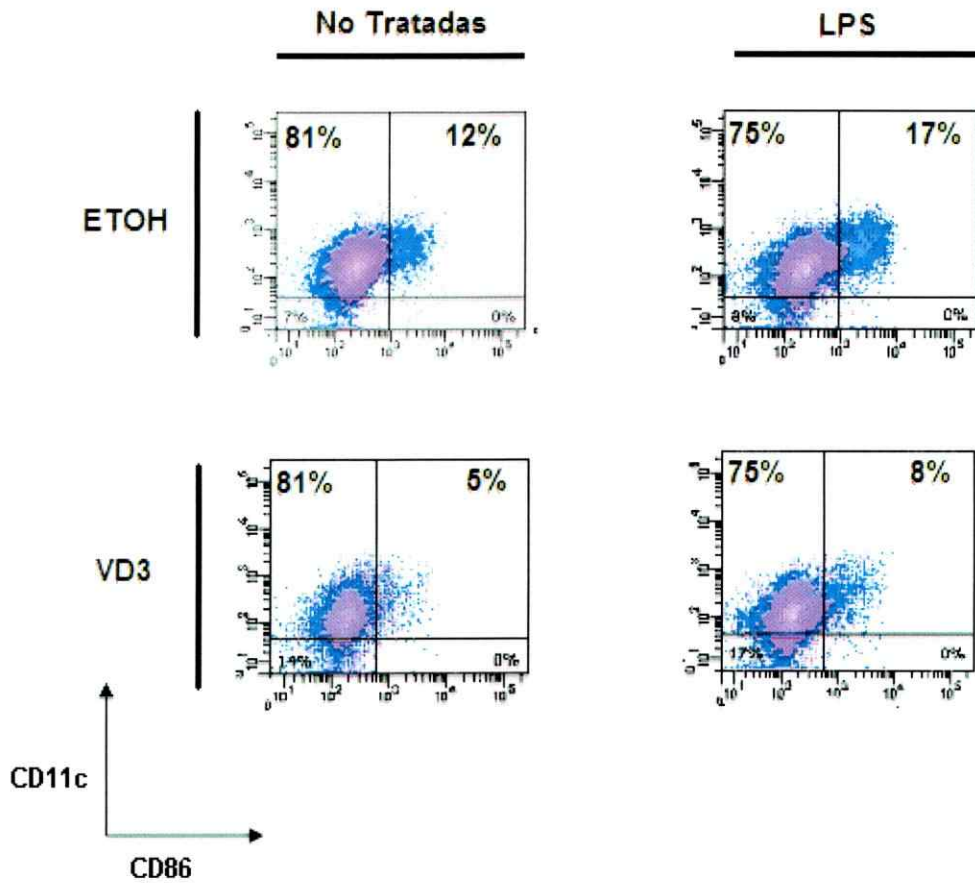


Figura 5. La incorporación de fagosomas alogénicos mantiene a las BMDC resistentes a la maduración. Células dendríticas generadas de médula ósea de un ratón C57BL/6 diferenciadas en presencia o no de VD3 1nM, se cultivaron por 4h con 40µg de fagosomas marcados con PKH26 y se activaron durante toda la noche con LPS. En rosado se muestran las células dendríticas positivas para PKH26. Se observa que los fagosomas alogénicos no provocan una mayor expresión de CD86 en las células dendríticas, incluso después de la activación con LPS. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

3.6 La incorporación de fagosomas alogénicos no altera el patrón de secreción de citoquinas de BMDC_{VD3}.

Las células dendríticas producen citoquinas en respuesta a diferentes estímulos y en nuestro trabajo nos pareció interesante evaluar el patrón de secreción de citoquinas en el sobrenadante de BMDC_{VD3} luego de haber incorporado fagosomas. Se evaluó la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-12, IL-6, MCP-1 y TNF- α y de la citoquina IL-10 a través de la técnica del CBA. Las BMDC_{VD3} fueron incubadas con 40 μ g de proteína total de fagosomas alogénicos durante 4 horas a 37°C, para luego ser activadas con 100 ng/ml de LPS.

La figura 6 muestra que el patrón de secreción de citoquinas de las BMDC_{VD3} que incorporaron fagosomas alogénicos es similar al obtenido con BMDC_{VD3} que no han incorporado fagosomas, pues ninguna de las diferencias observadas presentó variaciones significativas, $p < 0,05$. La activación de las BMDC_{VD3} con LPS aumenta significativamente la secreción de todas las citoquinas evaluadas, pero este aumento se observa tanto en las células dendríticas que no incorporaron fagosomas alogénicos como en las células que incorporaron fagosomas alogénicos.

Estos resultados indican que la administración de aloantígenos en forma de fagosomas no sólo no induce la maduración de las células dendríticas, sino que también no produce cambios en el patrón de secreción de citoquinas.

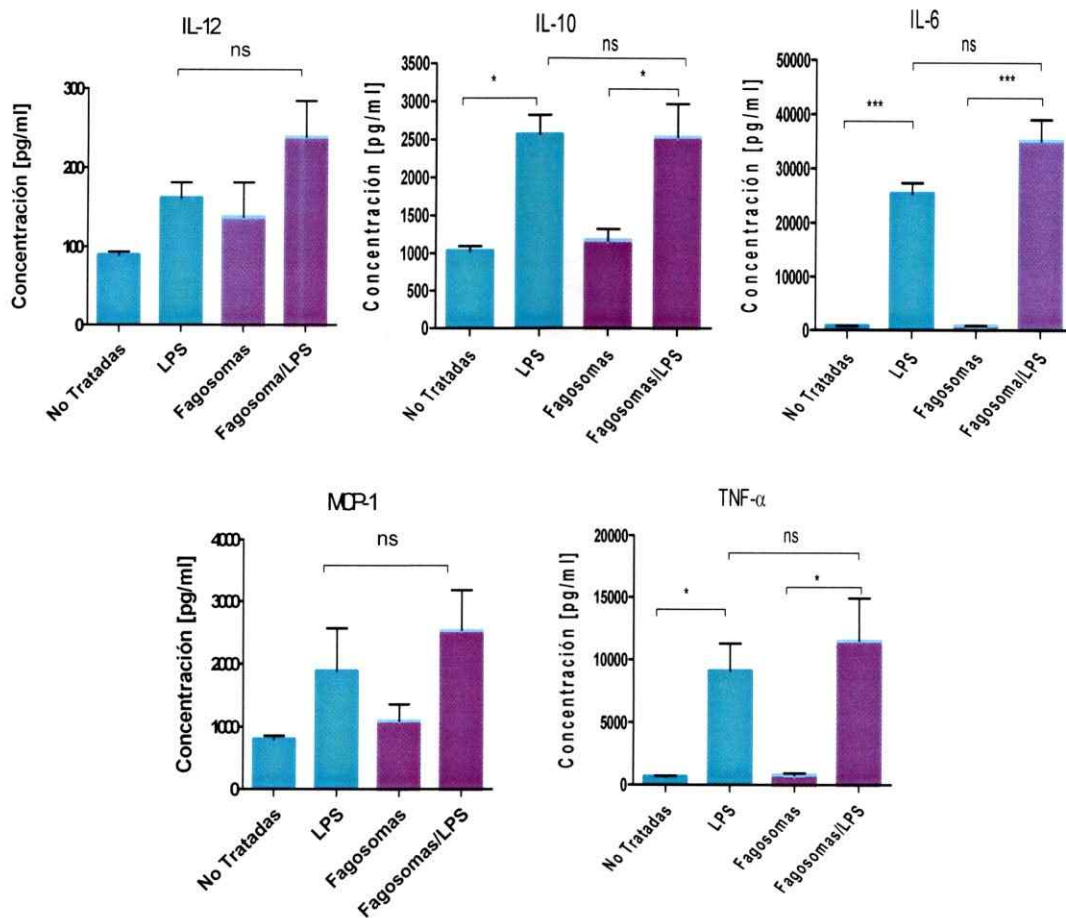


Figura 6. La incorporación de fagosomas alogénicos no altera el patrón de secreción de citoquinas en BMDC_{VD3}. Células dendríticas de médula ósea de un ratón C57BL/6 generadas en presencia de VD3 1 nM se cultivaron por 4h con 40 ug fagosomas alogénicos y se activaron con 100 ng/ml de LPS durante toda la noche a 37°C. En el sobrenadante de las células se midió la concentración de IL-12p70, IL-10, IL-6, MCP-1 y TNF-α. No se observan diferencias en el patrón de secreción de citoquinas luego de la incorporación de fagosomas alogénicos. (ns, no significativo, * P<0,05, ***P<0,001). Este resultado muestra el promedio ± el error estándar de 3 experimentos independientes.

DISCUSION

En el rechazo de trasplantes alogénicos, el sistema inmune del receptor reconoce el tejido del donante como un componente extraño, y produce una respuesta inmune que termina por dañar al tejido trasplantado. En ausencia de inmunosupresión, el rechazo se caracteriza por la infiltración de leucocitos en el tejido del donante, causando la necrosis y/o trombosis en los vasos sanguíneos. Esta reacción, llamada rechazo agudo, ocurre típicamente a las primeras semanas post trasplante. Las drogas inmunosupresoras pueden prevenir o revertir la mayor parte del rechazo agudo, pero los inmunosupresores sucumben a un tipo de rechazo mucho más insidioso, el rechazo crónico, que se desarrolla lentamente a través de los años. Por otra parte, el uso de drogas inmunosupresoras debilita la respuesta inmune contra agentes infecciosos en estos pacientes. (Libby y Pober, 2001)

Es por esto, que numerosos investigadores se encuentran desarrollando nuevos protocolos inmunosupresores para eliminar o atenuar la incidencia de rechazo crónico evitando el uso de drogas inmunosupresoras.

Las células dendríticas tienen la capacidad de presentar antígenos a linfocitos T para iniciar una respuesta inmune efectora o para inducir tolerancia contra el antígeno, hecho que las ha convertido un blanco de estudio para inducir tolerancia a trasplantes o a aloantígenos propios responsables de enfermedades autoinmunes (Horibe y col, 2008).

Se ha demostrado que sólo las células dendríticas en un estado inmaduro son capaces de inducir tolerancia y es por esto que numerosos científicos se han abocado a la tarea de controlar la maduración de las células dendríticas utilizando distintos compuestos químicos o péptidos (Ikeguchi y col, 2008). Es así como el uso de la vitamina D₃ en cultivos de células dendríticas humanas es capaz de inhibir la maduración y la activación de estas células *in vitro*. (Pena y col, 2000)

Uno de los objetivos fundamentales en el área de trasplantes es lograr tolerancia contra aloantígenos derivados de moléculas de histocompatibilidad del donante, que son la principal causa del rechazo a alotrasplantes.

En este seminario se desarrolló un protocolo de generación de células dendríticas inmaduras capaces de incorporar de fagosomas alogénicos, sin inducir la maduración de estas células. Para este fin, se utilizó la vitamina D₃ a una concentración final de 1 nM durante la diferenciación de los precursores de médula ósea hacia células dendríticas. Para demostrar que las células dendríticas son capaces de fagocitar los fagosomas alogénicos, estos se marcaron con un colorante rojo fluorescente (PKH26), de esta manera se pudo determinar que alrededor de un 40% de las células dendríticas generadas por este protocolo tienen la capacidad de incorporar fagosomas (figura 3). También se demostró que al cabo de 4h se producía el máximo de incorporación (figura 4.A) y que el proceso de incorporación depende de la cantidad de fagosomas utilizados (figura 4.B).

La inclusión de la VD3 permitió generar células dendríticas que expresan bajos niveles de MHC-II y CD86 (Figura1), corroborando los resultados obtenidos por Penna

(2000) y Griffin (2001). Además, se demostró que al activar las $BMDC_{VD3}$ con un estímulo bacteriano como lo es LPS se induce una mayor secreción de IL-10 en comparación a células dendríticas cultivadas en ausencia de VD3 (Figura 2). Por otra parte, en un trabajo anterior de nuestro laboratorio se demostró que la VD3 inhibe la producción de IL-12 (Ureta, 2007), pero esto no fue corroborado en este estudio (figura 6). La variación de estos resultados podría deberse a la diferencia en el protocolo de generación de las células dendríticas, pues en el caso de Ureta, 2007, éstas se generaron con la citoquina GM-CSF que se encuentra en el sobrenadante de la línea celular J558L, mientras que en este trabajo se utilizó GM-CSF recombinante murino para la generación de las células dendríticas de precursores de médula ósea. Cabe destacar que para la producción de fagosomas se utilizaron células dendríticas producidas con el sobrenadante de la línea celular J558L. Estas células dendríticas son muy inmaduras e incapaces de madurar frente a diferentes estímulos. Una explicación a estas observaciones podría ser el hecho de que la línea celular J558L produce entre 2000 a 2500 pg/ml de IL-10, dato que fue corroborado en nuestro laboratorio, lo cual ayudaría a mantener las células dendríticas en un estado inmaduro (Qin y col, 1997).

Se sabe que la secreción de IL-10 inhibe la expresión de moléculas coestimuladoras y de moléculas MHC-II en células dendríticas y macrófagos, resultado corroborado en nuestros experimentos con $BMDC$ diferenciadas con 1nM de VD3, pues este tratamiento aumentaba la secreción de esta IL-10 y disminuye la expresión de MHC-II y CD86. Como hemos mencionado anteriormente, las células dendríticas en un estado inmaduro pueden diferenciar $LT\ CD4^+$ en $LT\ reg$, hecho que transforma a las células dendríticas en un elemento clave en la inducción de tolerancia. Aunque no fue demostrado en este trabajo, estos resultados permiten predecir que existiría un

aumento en el potencial de las DCs para inducir LT reg, al incorporar fagosomas alogénicos, lo que podría traducirse en un estado tolerogénico antígeno específico.

Un resultado importante de este seminario, se observa en las figuras 5 y 6, donde se demuestra que la incorporación de fagosomas alogénicos no provoca la maduración de las células dendríticas y que mantienen un fenotipo inmaduro, incluso después de la activación con LPS. Tampoco se encontró una alteración en el patrón de citoquinas. El conjunto de estos resultados permiten predecir que estas células dendríticas podrían ser usadas como moduladores de la respuesta inmune en el caso de un trasplante alogénico, sin embargo es necesario demostrar que las BMDC_{VD3} son capaces de inducir la diferenciación de LT vírgenes a LT reg. Es más, esta inducción de LT reg debiera ser específica para antígenos del donante, ya que las BMDC_{VD3} estarían cargadas con péptidos provenientes de las moléculas de histocompatibilidad alogénicas presentes en los fagosomas. Por lo tanto, nos proponemos utilizar estas células cargadas con péptidos alogénicos como preconditionamiento del receptor al trasplante en futuros experimentos, ya que en la preparación de fagosomas utilizamos un material que es aceptado por la FDA (PLGA), lo que nos permite dar un paso más rápido a la experimentación in vivo.

Aunque estas células dendríticas son capaces de producir una alta concentración de citoquinas pro inflamatorias como TNF- α , MCP-1 e IL-6, después de la activación con LPS (figura 6), pensamos que el balance fino entre IL-6 e IL-10 en presencia de TGF- β puede permitir contrarrestar la producción de LT Th17, que son conocidos por ser linfocitos altamente proinflamatorios, a favor de la producción de LT

reg. Aunque no estaba en los objetivos del proyecto, hubiese sido interesante evaluar la producción de TFG- β en las BMDC_{VD3} después de la incorporación de fagosomas.

Actualmente nos encontramos probando la capacidad de las BMDC_{VD3} de generar efectivamente LT reg *in vitro*. Si estos resultados son positivos, entonces deberíamos probar que la administración de fagosomas alogénicos a ratones produce tolerancia específica a aloantígenos *in vivo*.

Finalmente, se puede concluir que la incorporación de antígenos alogénicos en forma de fagosomas producidos con perlas de PLGA en células dendríticas inmaduras, mantiene una baja expresión de moléculas coestimuladoras y moléculas MHC-II y con una elevada secreción de IL-10.

CONCLUSIÓN

- La Vitamina D₃ inhibe la maduración de células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea.
- La Vitamina D₃ aumenta la secreción de IL-10 en células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea, sin alterar el patrón de secreción basal de citoquinas de estas células.
- La incorporación de fagosomas es un proceso dependiente del tiempo y de la cantidad de fagosomas alogénicos utilizados.
- Células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea generadas en presencia de vitamina D₃ poseen mayor capacidad fagocítica de fagosomas.
- Los fagosomas alogénicos no alteran el patrón de secreción de citoquinas de las células dendríticas.
- Las células dendríticas que incorporan fagosomas alogénicos son resistentes a la maduración, incluso después de la activación con LPS.

REFERENCIAS

Branchereau J, Steinman R. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*.**392**: 245-262.

Cohen-Lahav, M Shany, S Tobvin, D, Chaimovitz, C, Douvdevani. 2006. Vitamin D decreases NFκB activity by increasing . *Nephrol. Dial. transplant*. **21**:889-897.

Coombes J, Siddiqui K, Arancibi, Cárcamo, Hall J, Sun C, Belkaid Y, and Powrie F. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103 +DCs induces Foxp3 + regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid – dependent mechanism *JEM*. **204**: 1757-1764

Dallman MJ. 1992. The cytokine network and regulation of the immuneresponse to organ transplants. *Transplant Rev*. **6**: 209.

Dawes GJ, Fratila-Apachitei LE, Mulia K, Apachitei I, Witkamp GJ, Duszczuk J. 2009 Size effect of PLGA spheres on drug loading efficiency and release profiles. *J Mater Sci Mater Med*. **22**:87-92.

Fischer R, Turnquist HR, Taner T, Thomson AW, 2009. Use of rapamycin in the induction of tolerogenic dendritic cells. *Handbook of Experimental Pharmacology*.**188**:215-132.

Gad HA, El-Nabarawi MA, Abd El-Hady SS. 2008. Formulation and Evaluation of PLA and PLGA In Situ Implants Containing Secnidazole and/or Doxycycline for Treatment of Periodontitis. AAPS PharmSciTech.

Gorman S, Kuritzky L, Judge M, Dixon K, McGlade J, Mason R, Finlay-Jones J, and Hart P. 2007. Topically Applied 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Enhances the Suppressive Activity of CD4⁺CD25⁺ Cells in the Draining Lymph Nodes. *The Journal of Immunology*. **179**: 6273–6283

Griffin, M., Iutz, W., Phan, V., Bachman, L., McKean, D., Kumar, R. 2001. Dendritic cell modulation by 1, 25 dihydroxyvitamin D₃ and its analogs: A vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *PNAS*. **98**: (12), 6800-6805.

Gruber HE, Hoelscher G, Ingram JA, Chow Y, Loeffler B, Hanley EN Jr. 2008 1,25(OH)₂-vitamin D₃ inhibits proliferation and decreases production of monocyte chemoattractant protein-1, thrombopoietin, VEGF, and angiogenin by human annulus cells in vitro. *Spine*. **33**:755-65.

Holick, M. F., 2007. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* **357**: 266–281

Horibe Elaine K, Sacks Justin , Unadkat Jignesh , Raimondi Giorgio, Wang Zhiliang, Ikeguchi Ryosuke , Douglas Marsteller, Ferreira Lydia M, Thomson Angus W, Andrew Lee W.P, Feili-Hariri Maryam 2008. Rapamycin-conditioned, alloantigen-pulsed

dendritic cells promote indefinite survival of vascularized skin allografts in association with T regulatory cell expansion. *Transplant Immunology* **18**:307–318.

Ikeguchi Ryosuke , Sacks Justin M. , Unadkat Jignesh, Solari Mario, Horibe Elaine K, Thomson Angus W, Lee Andrew W. P and Feili-Hariri Maryam 2008. Long-Term Survival of Limb Allografts Induced by Pharmacologically Conditioned, Donor Alloantigen-Pulsed Dendritic Cells Without Maintenance Immunosuppression. *Transplantation*. **85**: 237–246.

Kim BS, Oh JM, Hyun H, Kim KS, Lee SH, Kim YH, Park K, Lee HB, Kim MS. 2009 Insulin-Loaded Microcapsules for In Vivo Delivery *Mol Pharm.*.

Lechler R, Sykes M, Thomson A, Tka L. 2005. Organ transplantation – how much of the promise has been realized?. *Nature Medicine* **11**: 605-613.

Lennon-Duménil, AM., Bakker, A., Maehr, R., Fiebiger, E., Overkleef, H., Roseblatt, M., Ploegh, H., Lagaudrière-Gesbert, C. 2002. Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. *J. Exp. Med.* **196**: 529-540.

Libby P y Pober, J.S. 2001. Chronic rejection. *Immunity* **14**:387-397.

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

Mora, J.R, Iwata M, von Andrian U. 2008. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature Reviews Immunology*. **8**:685-698

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

Murphy B, Sayegh MH 1996. Why do we reject a graft? Mechanisms of recognition of transplantation antigens. *Transpl Rev* **10**: 150-160.

Penna, G., S. Amuchastegui, N. Giarratana, K. C. Daniel, M. Vulcano, S. Sozzani, and L. Adorini. 2007. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.***178**: 145–153.

Penna G., Adorini L. 2000. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J. Immunol.* **164**: 2405-2411.

Pino, K. 2005. Caracterización fenotípica y funcional de células dendríticas de médula ósea. Memoria de título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requerimientos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Proietto A, van Dommelen, Zhou P, Rizzitelli A, D'Amico A, Steptoe R, Naika S, Lahouda M, Liuc Y, Zhengc P, Shortmana K, and Wua L. 2008 Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *PNAS*. **105**:19869–19874

Qin Z, Noffz G, Mohaupt M, Blankenstein T. 1997. Interleukin-10 prevents dendritic cell accumulation and vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified tumor cells. *J Immunology*. **159**: 770-6.

Roncarolo M-G, Levings MK, Traversari C. 2001. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med* **193**:F5.

Rutella S., Lemoli R. 2004. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunology letters*. **94**:11-26

Scholz C, Toth B, Brunnhuber R, Rampf E, Weissenbacher T, Santoso L, Friese K, Jeschke U, 2008. Glycodelin A induces a tolerogenic phenotype in monocyte-derived dendritic cells in vitro. *American journal of reproductive immunology*.

Steinman 2007. Dendritic cells: Understanding immunogenicity. *Eur. J. Immunol*. **37**:53-60.

Taher YA, van Esch BC, Hofman GA, Henricks PA, van Oosterhout AJ. 2008. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ potentiates the beneficial effects of allergen immunotherapy in a mouse model of allergic asthma: role for IL-10 and TGF- β . *J Immunol*. **180**:5211-21.

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

Van Etten, E., Mathieu, C. 2005. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: Basic concepts. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **97**: 93-101.

Villadangos, J., Bryant, R., Deussing, J., Driessen, C., Lennon-Duménil, AM., Riese, R., Roth, W., Saftig, P., Shi, GP., Chapman, H., Peters, C., Ploegh, H. 1999. Proteases involved in MHC class II antigen presenting. *Immunol. Rev.* **172**: 109-120.

Vlad GR, Cortessini N, Suciu-Foca N.2005. Bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC. *J Immunol* **174**:5907.