

UCH-FC
Biotecnología
5684
C.I.



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias

“Papel de la IL-4 en la polarización de los linfocitos T y en el desarrollo de la respuesta inmune gastrointestinal”

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

Paola Andrea Solanes Vega

Director Seminario de Título: Dr. Mario Roseblatt Silver
Co-Directora: Dr. María Rosa Bono Merino

Santiago de Chile, Julio, 2009



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. Paola Andrea Solanes Vega**.

“Papel de la IL-4 en la polarización de los linfocitos T y en el desarrollo de la respuesta inmune gastrointestinal”

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

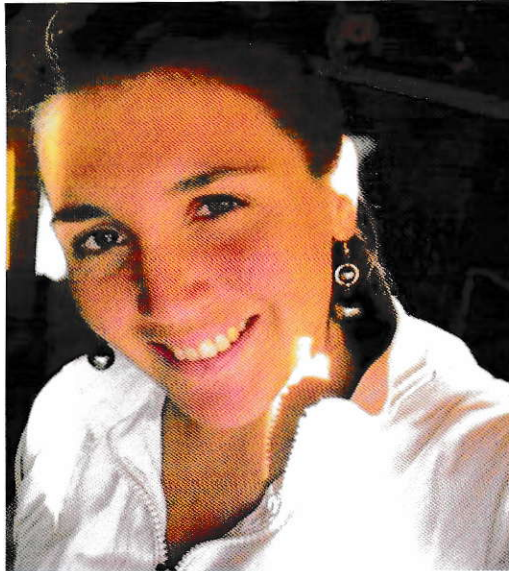
Dr. Mario Rosemblatt Silver
Director Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono Merino
Co-Directora

Comisión de Evaluación

Dr. Miguel Allende Conelly

Dra. Marcela Hermoso Ramello



Tratando de llenar este espacio me doy cuenta de que lo más difícil de escribir una tesis es analizarse uno mismo para escribir una autobiografía...pero bueno. Mi nombre es Paola, nací un 15 de Mayo y aunque puede que esté mal que lo diga una científica, creo que mi signo me define completamente.

Me asustan mucho las situaciones nuevas, pero nunca he dejado de hacerlas, paradójicamente gracias a un miedo aún mayor que es el verme a mi misma en una vida estática y sin grandes cambios. Además sufro de una increíble obsesión por hacer todo a la vez gracias a una loca percepción de que el tiempo pasa mucho más rápido de lo que debiera. Es por todo esto que me he visto en situaciones increíbles y envuelta en una vida loca que no para ni un segundo, positivamente me adapto rápido.

Analizando mi vida, me doy cuenta de que, por más que uno sea precavido, no hay forma de aprender si no es a porrazos y que la única forma de darse cuenta de los errores es pararse y verlos desde arriba.

Cuando chica fui bien insegura de mi misma, lo que superé con una filosofía para momentos difíciles de "no lo analices tanto y camina rápido". Así me di cuenta de que era bastante capaz de hacer cosas que no muchos pueden y que me sorprenden a mi misma.

Hoy en día sigo asustándome con las situaciones nuevas pero estoy segura de que haciendo mi mejor esfuerzo puedo hacer un gran trabajo. Soy una agradecida de la vida y estoy convencida de que esta tiene un equilibrio, por lo que después de los malos momentos no pueden venir peores. Murphy, tienes que estar equivocado.

*“A mi familia, especialmente
mom y tata,
sin ellos imposible”*

AGRADECIMIENTOS

Parto esta sección agradeciéndolo a mi tutor de tesis Mario Roseblatt por sorprenderme con sus ideas en las innumerables reuniones de laboratorio que, aunque muchas veces estresantes, lograrón que mi cabeza se abriera y se cuestionara todo.

De manera especial quiero agradecer a María Rosa Bono, por ayudarme tanto. Por enseñarme a madurar e influenciar fuertemente mi carácter como científica. Pocas personas quedan en la memoria de uno para siempre, gracias por ser una de ellas.

También quiero darles las gracias a mis compañeros de laboratorio. Primero al Leito, por tenerme tanta paciencia y solucionarme innumerables problemas tanto "laboratorísticos" como personales. A las chiquillas revoltosas del mesón del fondo, Valerie y Cynthia, por hacerme reír tanto y hacer de esos días maratónicos de experimentos más cortos. A Daniela Sauma, por estar disponible para cualquier duda que tuviera, por la disposición incondicional además de hacerme reír mucho. A Paulina, Andrés, Camila, Pame y Evita por reírnos tanto en los almuerzos y provocar tan buena convivencia en el lab.

Quiero agradecer también al team Lupus, Ale y Paz, por alegrarme los últimos meses antes de irme con innumerables discusiones científicas y experimentos tan motivantes. A James, por salir con esa talla "clever" cuando menos se sospecha y por hacerme reír con su insuperable doble sentido. A mi amiga, Jenny, por escucharme tanto tiempo y por ser una de las pocas personas que me conoce en verdad y me comprende. A mi "new roommate" Paula Michea, por ayudarme tanto en todo lo que es el viaje y por ser tan buena "partner" en el meson, see u later"!

También quiero agradecer a mis "amigos de la U", especialmente Quarry, por hacerme reír tanto, las chiquillas (Carola, Romi y Susi) por ayudarme en esos momentos que ustedes saben... A la Pame y la Garri, por darse el tiempo para escuchar mis locuras.

Quiero agradecer especialmente a mi familia especialmente a mi mamá, por la incondicional ayuda y apoyo, miles de horas dedicadas en los momentos difíciles, por la tolerancia, paciencia, en fin....uff... por ser mi "mom". A mi Tata, por ser mi ejemplo de ser humano, por ayudarme con los estudios universitarios y por apoyarme siempre. A mi tía Sylvia, por cuidarme de chiquitita y estar ahí incondicionalmente, también por las clases de francés express. A mis hermanos: Ina, por estar en esos momentos de estrés máximo y escucharme, por estar en los momentos difíciles conmigo. Jameton, por escucharme en los momentos de colapso y tener discusiones tan aterrizadas. Pipeton, por sorprenderse con mis monólogos científicos tratando de explicarlo todo. A mi Nona por esas lecciones de vida que solo pueden darte las abuelas.

Finalmente dejo este último párrafo para agradecer a mi pololo Cristián por quererme tal como soy, por su amor incondicional, por hacerme la vida mucho más querible y por no dudar en embarcarse conmigo, muchas gracias... lo necesitaba.

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCION	5
2. MATERIALES Y METODOS	11
2.1 Animales	11
2.2 Anticuerpos y reactivos	11
2.3 Citometría de flujo, inmunofluorescencias y análisis estadístico	12
2.4 Purificación de DCs a partir de órganos linfoides secundarios	12
2.5 Purificación de linfocitos T CD41	13
2.6 Análisis de citoquinas intracelulares	14
2.7 Activación policlonal de linfocitos T CD4	15
2.8 Purificación de células de lámina propia	15
2.9 Análisis de linfocitos T reguladores de lámina propia	16
3. RESULTADOS	18
3.1 Caracterización y comparación de las poblaciones celulares en distintos órganos linfoides secundarios de ratones <i>il-4α</i> KO y normales.	18
3.2 Análisis de la polarización de linfocitos T CD4 ⁺ <i>il-4α</i> KO en distintos órganos linfoides secundarios.	22
3.3 Producción de IL-12 por células dendríticas del ratón <i>il-4α</i> KO	26
3.4 Análisis de las subpoblaciones de células dendríticas en placas de peyer del ratón <i>il-4α</i> KO	29
3.5 Análisis de linfocitos T reguladores en lámina propia	32
4. DISCUSION	34
5. CONCLUSIONES	38
6. BIBLIOGRAFIA	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. La IL-4 no cumple un papel importante en la homeostasis celular en los órganos linfoides secundarios.	20
Figura 2. La IL-4 no cumple un papel importante en la homeostasis celular de linfocitos T.	21
Figura 3. Los linfocitos T CD4 ⁺ de ratones <i>il-4ra</i> KO se polarizan preferentemente a Th1 excepto en placas de peyer.	24
Figura 4. La activación de linfocitos T CD4 ⁺ purificados provenientes de placas de peyer produce una polarización preferencial Th1.	25
Figura 5. Células dendríticas de ratones <i>il-4ra</i> KO producen cantidades significativamente mayores de IL-12 comparado a ratones controles, excepto en placas de peyer.	28
Figura 6. Organos asociados a tejido intestinal, específicamente PP y LP, del ratón <i>il-4ra</i> KO presentan una menor proporción de DCs CD103 ⁺ en comparación al ratón control.	31
Figura 7. Ratones <i>il-4ra</i> KO poseen un menor porcentaje de linfocitos Treg en lámina propia comparado a ratones controles.	33

ABREVIATURAS

APC:	Células presentadora de antígeno
DCs:	Células dendríticas
FBS:	Suero fetal bovino
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
HBSS:	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
IL:	Interleuquina
<i>Il-4ra</i> KO:	Ratones deficientes en la cadena α del receptor de IL-4
IFN:	Interferón
LB:	Linfocito B
LP:	Lámina propia
LPS:	Lipopolisacárido
MHC-I:	Complejo principal de histocompatibilidad de clase I
MHC-II:	Complejo principal de histocompatibilidad de clase II
MLN:	Linfonodo mesentérico
PBS:	Tampón fosfato salino
PE:	Ficoeritrina
PLN:	Linfonodos periféricos
PP:	Placas de peyer
TCR:	Receptor del linfocito T
Th1/Th2:	T helper 1/ T helper 2
TLR:	<i>Toll-like receptor</i>

RESUMEN

El sistema inmune está compuesto de múltiples tipos celulares que en conjunto combaten la permanencia de patógenos en el organismo. Las células dendríticas (DCs) son las células encargadas de presentar el antígeno a los linfocitos T CD4⁺ vírgenes para así desencadenar una respuesta inmune polarizada Th1/Th2 que está determinada principalmente por el tipo señales provenientes del patógeno en la célula dendrítica.

Se ha demostrado que la secreción de IL-12 por la célula dendrítica es el factor determinante de la generación de respuestas Th1 (fenotipo caracterizado por una baja producción de IL-4 y por una alta producción de IFN- γ), mientras que las respuestas Th2 (fenotipo caracterizado por una alta producción de IL-4) estarían determinadas por la presencia de IL-4 en el momento de la activación del linfocito T. Aunque se han encontrado mecanismos independientes de estas citoquinas en la polarización de la respuesta inmune.

Por otra parte, en nuestro laboratorio demostramos que la IL-4 cumple un papel importante, a través de las DCs, en la inducción de marcadores de *homing* en linfocitos T CD4⁺ y existen evidencias que un subtipo de DCs, las células CD103⁺, serían las células especializadas en este proceso.

El intestino es uno de los lugares en donde habita la flora comensal por lo que debe ser un ambiente altamente tolerogénico. Está descrito que las DCs CD103⁺ son capaces de producir linfocitos T reguladores especializados en mantener la

homeostasis celular del sistema inmune al suprimir la proliferación de linfocitos T efectores. En base a estos antecedentes, en este estudio evaluamos el papel que cumple la IL-4 en la polarización de la respuesta inmune evaluando cómo la falta del receptor de IL-4 afecta a linfocitos T CD4⁺ y DCs. Demostramos que los linfocitos T CD4⁺ de ratones incapaces de censar la IL-4, por no poseer la cadena α del receptor de IL-4 (*il-4ra* KO), presentan una deficiencia en la producción de IL-4, por lo que polarizan la respuesta inmune preferentemente a respuestas Th1. Al analizar la producción de IL-12 por parte de las DCs, encontramos que las células provenientes del ratón *il-4ra* KO producen más de esta citoquina que DCs de ratones controles. En base a estos resultados concluimos que la IL-4 cumple un papel directo en la polarización de la respuesta Th2 de manera directa en los linfocitos T CD4⁺ aumentando la producción en ellos de IL-4 y de manera indirecta, disminuyendo en DCs la producción de IL-12.

Por otra parte, evaluamos parámetros relacionados con la respuesta inmune gastrointestinal como la presencia de linfocitos T reguladores y DCs CD103⁺ (vinculadas con la generación de linfocitos T reguladores) tanto en placas de peyer como en lámina propia en ratones *il-4ra* KO y controles. Encontramos que esta subpoblación de DCs se encuentra disminuida en ambos órganos en ratones *il-4ra* KO y que además estos ratones presentan menos linfocitos T reguladores en lámina propia. Es por esto que concluimos que la IL-4 cumple un papel importante en la generación, mantenimiento o permanencia de DCs CD103⁺ y linfocitos T reguladores en tejidos asociados a mucosa intestinal, por lo que podría ser importante en la generación de tolerancia en el ambiente intestinal.

ABSTRACT

The immune system is composed of multiple cellular types that altogether fight the permanence of pathogens in the organism. The dendritic cells (DCs) are the cells in charge of presenting the antigen to naive CD4⁺ T lymphocytes in order to trigger a Th1/Th2 polarized immune response. This is determined, mainly, by the type of signals derived from pathogens.

It has been shown that IL-12 secretion by DCs is the determining factor in the generation of Th1 responses (phenotype characterized by a low production of IL-4 and a high production of IFN- γ), whereas the Th2 responses (phenotype characterized by a high production of IL-4) would be determined by the presence of IL-4 during T lymphocyte activation. However, IL-12 and IL-4 independent polarization mechanism have also been suggested.

On the other hand, in our laboratory we demonstrated that IL-4 plays an important role, through the DCs, in the induction of homing markers in CD4⁺ T lymphocytes and it is believed that specifically a subtype of DCs, the CD103⁺ cells are the cells specialized in this process.

The intestine is a place where commensal flora reside, reason why it should be a highly tolerogenic environment. It is known that CD103⁺ DCs are able to produce regulatory T cells specialized in maintaining the cellular homeostasis of the immune system, suppressing the proliferation of effector T lymphocytes. On the basis of these evidences, in this study we assess the role of IL-4 in the polarization of the immune

response by evaluating how IL-4 receptor deficiency affects both, CD4⁺ T lymphocytes and DCs. We demonstrate that T lymphocytes from mice unable to sense IL-4, because they do not present the α chain of IL-4 receptor (*il-4ra* KO), present a deficiency in the production of IL-4 in comparison to controls, reason why they preferentially polarize to Th1 responses. When analyzing IL-12 production by DCs, we found that cells derived from *il-4ra* KO mouse produce higher levels of this cytokine in comparison to controls. On the basis of these results we concluded that IL-4 plays an essential role in the polarization of the Th2 responses by directly increasing IL-4 production by CD4⁺ T lymphocytes and in an indirect manner, reducing IL-12 production by DCs.

On the other hand, we evaluated parameters related to the gastrointestinal immune response such as the presence of regulatory T cells and CD103⁺ DCs (cells specialized in the generation of regulatory T cells) in peyer patches and lamina propria in *il-4ra* KO mice and controls. We found that this subtype of DCs is decreased in *il-4ra* KO mice in both organs and in addition, these mice present less regulatory T cells in lamina propria. This is why we concluded that IL-4 plays an important role in the generation, maintenance or permanence of CD103⁺ DCs and regulatory T cells in gut-associated tissue, reason why it could be important in the generation of tolerance in the intestinal environment.

1. INTRODUCCION

El sistema inmune está compuesto de múltiples tipos celulares que actúan en conjunto para combatir la permanencia y proliferación de un patógeno en el organismo. Dentro de estos tipos celulares, existen las células presentadoras de antígenos (APC) que son las encargadas de mostrar a los linfocitos T (LT), el antígeno invasor. Dentro de las APC existen los linfocitos B, los macrófagos y las células dendríticas (DCs), estas últimas son las únicas APC capaces de activar de manera eficiente a los linfocitos T vírgenes, por lo que han sido denominadas células presentadoras de antígeno profesionales.

Normalmente las DCs se encuentran en los tejidos periféricos, lugar de entrada de patógenos, donde cumplen un papel fundamental en la respuesta inmune. En esta localización las DCs se encuentran en un estado inmaduro y poseen gran capacidad de fagocitosis. El encuentro con el antígeno en un contexto inflamatorio induce la migración de las DCs al órgano linfoide secundario más cercano mientras comienza un proceso de maduración. Durante este proceso aumentan la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD86 y CD80, necesarias para la activación eficiente de los linfocitos T vírgenes, y de moléculas de histocompatibilidad (MHC), en donde será presentado el antígeno (Banchereau, Briere et al. 2000). En cambio, las DCs en un estado inmaduro son capaces de suprimir la respuesta inmune al presentar antígenos en un contexto no inflamatorio generando tolerancia (Vlad, Cortesini et al. 2005).

Se han descrito dos grupos de linfocitos T de acuerdo al papel que cumplen en la respuesta inmune. Por una parte están los linfocitos T $CD4^+$, llamados también

linfocitos T helper (Th), en los cuales los antígenos son presentados en el contexto de moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) (Banchereau, Briere et al. 2000) y los linfocitos T CD8⁺, linfocitos T citotóxicos, en donde la presentación se realiza en un contexto MHC-I (Larsson, Fonteneau et al. 2001). Los primeros desarrollan una respuesta en base a la secreción de citoquinas, mientras que los segundos desempeñan un rol directo en la eliminación de patógenos intracelulares (Kaech, Wherry et al. 2002).

Una vez que la APC ha presentado el antígeno y activado a un linfocito T CD4⁺, este puede tomar diferentes vías de diferenciación o linajes, diferenciándose en un linfocito Th1 o Th2. Los linfocitos Th1 secretan preferentemente IFN- γ , TNF- α y linfoxina especializándose en la eliminación de patógenos intracelulares, mientras que los linfocitos Th2 secretan interleuquina (IL-)-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, especializándose en la eliminación de patógenos extracelulares (Murphy and Reiner 2002) (Szabo, Sullivan et al. 2003). Se cree que la polarización hacia respuestas de tipo Th1 o Th2, está directamente relacionada con la activación por parte de la célula dendrítica, siendo esta en última instancia la que determina la polarización de la respuesta inmune dependiendo de la naturaleza del patógeno y de las citoquinas secretadas por parte de la DC al momento de la activación.

La IL-4 es producida por varios tipos celulares dentro de los cuales se encuentran: un conjunto de los linfocitos T CD4⁺ (Th2), basófilos, mastocitos y eosinófilos (Dubucquoi, Desreumaux et al. 1994). Está reportado en la literatura que si durante la activación el linfocito T está en presencia de IL-4, este se diferenciará a Th2, por lo que la IL-4 cumpliría un papel importante en la generación de este linaje de

linfocitos (Hsieh, Heimberger et al. 1992). Se ha descrito que esta citoquina es capaz de suprimir fuertemente la generación de células T CD4⁺ productoras de IFN- γ (fenotipo Th1) (Nelms, Keegan et al. 1999) y que la presencia de IL-12, o disminución de IL-4 en el ambiente determinan un fenotipo Th1 (Kalinski, Hilkens et al. 1999). Además se ha demostrado que la IL-4 autorregularía la producción de linfocitos Th2 induciendo la producción de IL-12 por parte de las DCs promoviendo la polarización de linfocitos T vírgenes a una diferenciación Th1 (Hochrein, O'Keeffe et al. 2000) (Seegmuller, Hacker et al. 2003) (Kalinski, Smits et al. 2000). Sin embargo, existen evidencias de la existencia de mecanismos independientes de IL-12 e IL-4 en la generación de respuestas Th1 y Th2. Está reportado que ratones knock-out para la cadena α del receptor de IL-4 (*il-4ra* KO) son capaces de generar respuestas Th2 (Noben-Trauth, Shultz et al. 1997) (Finkelman, Morris et al. 2000) y que ratones knock-out para IL-12 son capaces de generar respuestas de tipo Th1 (Jankovic, Kullberg et al. 2002).

En este estudio, y en base a los antecedentes previamente expuestos, estudiamos el papel que cumple la IL-4 en la polarización de la respuesta inmune, específicamente evaluamos cómo afecta la falta del receptor de IL-4, a los LTs y a las DCs.

Por otra parte, nuestro laboratorio demostró recientemente que la IL-4 cumple un papel importante, a través de las DCs, en la inducción de marcadores de *homing* a intestino, específicamente CCR9 y $\alpha_4\beta_7$ en linfocitos T CD4⁺ (Elgueta, Sepulveda et al. 2008). Se piensa que las DCs CD103⁺ serían las DCs involucradas en este proceso ya que aumentan la expresión de estos marcadores en LTs vírgenes, por lo que se las

ha vinculado fuertemente con el *homing* a intestino (Jaensson, Uronen-Hansson et al. 2008). Además, se ha descrito que estas DCs poseen propiedades regulatorias (Annacker, Coombes et al. 2005) y que podrían cumplir un papel en la generación de linfocitos T reguladores (T reg) (Sun, Hall et al. 2007).

El intestino es uno de los lugares donde habita la flora comensal por lo que debe existir una alta regulación de la respuesta inmune para mantener la homeostasis celular del sistema inmune. Se ha descrito que en este lugar existe un gran número de linfocitos Treg, en comparación con otros órganos linfoides, encargados de suprimir la respuesta de linfocitos T efectores (Sun, Hall et al. 2007). Además en este lugar existen varios subtipos de DCs con propiedades regulatorias como DCs inductoras de la producción de IL-10 por parte de los linfocitos T (Iwasaki and Kelsall 2001) (Chirido, Millington et al. 2005). Recientemente se ha descrito que las DCs provenientes de lámina propia inducen la expresión de FoxP3 en linfocitos T efectores (Sun, Hall et al. 2007).

Estudios recientes demuestran que la IL-4 promueve la expansión tanto de linfocitos T $CD4^+CD25^-$ (Pace, Pioli et al. 2005) como $CD4^+CD25^+$ reguladores manteniendo, en estos últimos, la capacidad supresora (Pace, Rizzo et al. 2006) y que en conjunto con la IL-13, citoquina que también se une a la cadena α del receptor de la IL-4 (Nelms, Keegan et al. 1999), induce la expresión de FoxP3 (marcador de linfocitos Treg) en las células $CD4^+CD25^+$ reguladoras a partir de precursores $CD4^+CD25^-$ (Skapenko, Kalden et al. 2005).

El objetivo de este estudio fue caracterizar la respuesta inmune de ratones *il-4ra* KO, tanto desde el punto de vista de la activación como de la supresión de la respuesta inmune. Decidimos evaluar parámetros relacionados con la respuesta inmune gastrointestinal como la presencia de DCs CD103⁺ y linfocitos Treg tanto en placas de peyer como en lámina propia en ratones *il-4ra* KO, evaluar la polarización de linfocitos T CD4⁺, las subpoblaciones de DCs presentes en diferentes tejidos y comparar los resultados con ratones normales.

Hipótesis

Los ratones knock out para la cadena α del receptor para interleuquina 4 son incapaces de producir una polarización diferencial de la respuesta inmune.

Objetivo general

Estudiar el papel de la IL-4 en la polarización de la respuesta inmune.

Objetivos específicos

- 1.- Caracterizar y comparar las subpoblaciones celulares de linfocitos T en distintos órganos linfoides secundarios en ratones *il-4ra* KO y normales.
- 2.- Analizar en ratones *il-4ra* KO y normales la producción de las citoquinas IL-4 e IFN- γ por los linfocitos T CD4⁺ activados con PMA e Ionomicina, provenientes de distintos órganos linfoides.
- 3.- Activar los linfocitos T provenientes de distintos órganos linfoides secundarios policlonalmente para evaluar la producción de citoquinas que determinen una polarización Th1 o Th2 independiente de APC.
- 4.- Analizar la producción de las citoquinas IL-12 y IL-10 por células dendríticas provenientes de distintos órganos linfoides secundarios activadas con LPS en ratones *il-4ra* KO y normales.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Animales.

Se utilizaron ratones Balb/c (H-2^d), ratones *knock-out* para la cadena alfa del receptor de IL-4 (*il-4 α* KO) en un background H-2^d (Noben-Trauth, Shultz et al. 1997). Las cepas fueron adquiridas en the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) y mantenidas en un vivero libre de patógenos en la Fundación Ciencia para la Vida.

2.2 Anticuerpos y reactivos.

Para el análisis fenotípico de LT y DCs por citometría de flujo, se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales de BD Biosciences; CD11c PE (clon HL3), CD11c FITC (clon HL3), CD86 FITC (clon GL1), IA^d FITC (clon AMS-32.1), CD80 FITC (clon 16-10A1), CD4 PE-Cy5 (clon RM 4-5), CD4 FITC (clon RM 4-5), B220 PE-Cy5 (clon RA 3-6B2), CD8 α FITC (clon 53-6.7), CD8 α PE-Cy5 (clon 53-6.7), CD62L PE (clon MEL-14), IFN- γ FITC (clon XMG1.2), IL-4 PE (clon 11B11), IL-12 PE (clon C15.6). Los anticuerpos CD11c PE-Cy5 (clon N418), FoxP3 PE-Cy5 (clon FJK-16s) y IgG2a PE-Cy5 (Isotipo FoxP3) fueron comprados a e-Bioscience. Por otro lado, los anticuerpos CD49b PE (clon DX5), CD103 FITC (clon M290) fueron comprados a BD Pharmingen.

En las activaciones policlonales de los LTs se utilizaron los siguientes anticuerpos BD Biosciences; CD3 (clon 145-2C11), CD28 NA/LE (clon 37.51).

2.3 Citometría de flujo, inmunofluorescencias y análisis estadístico.

Para las inmunofluorescencias las células fueron incubadas con las diluciones correspondientes de anticuerpos en PBS + 10% FBS por 20 minutos a 4°C. Luego, las células fueron lavadas con PBS + 10% FBS centrifugando a 500xg por 7 minutos a 4°C. Posteriormente las células fueron resuspendidas a 1×10^6 células/ml en PBS + 2% FBS para ser analizadas con un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences). Para analizar los resultados se utilizaron los softwares FCS Express V3 y WimDi.

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad PRISM, los datos son presentados con el promedio y la significancia estadística luego de ser analizados con un t test no pareado de dos colas. Los datos se consideraron estadísticamente significativos si $p < 0,05$.

2.4 Purificación de células dendríticas a partir de órganos linfoides secundarios.

Los diferentes órganos linfoides (bazo, linfonodo mesentérico (MLN), placas de peyer (PP) y linfonodos periféricos (PLN) (ganglios axilares e ingüinales)) fueron aislados y disgregados mecánicamente en medio RPMI + 10% FBS (suero fetal bobino). En el caso de PP, el intestino fue previamente lavado con HBSS.

Luego de disgregar mecánicamente los órganos la suspensión celular obtenida fue sometida a una digestión enzimática con 1 mg/ml Colagenasa D (Roche) en

presencia de 20 µg/ml de DNAsa I por 45 minutos a 37°C en rotación. Posteriormente las células fueron pasadas por malla metálica de 90 µm y en el caso del bazo se lisaron los glóbulos rojos en 2 ml de una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 10mM y Na₂EDTA 0,1mM, pH 7,2-7,4) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego las células fueron lavadas con medio RPMI + 10% FBS centrifugando a 500xg por 7 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas con 10 ml de tampón MACS (PBS + 5%FBS + 2Mm EDTA) e incubadas por 30 minutos a 4°C con rotación en 30 µl de MACS anti-CD11c (clon N418) (Miltenyi Biotec) por cada 1x10⁸ de células totales diluidas en 300 µl de tampón MACS. Luego de la incubación, las células fueron lavadas con 10 ml de tampón MACS y se resuspendieron a 1x10⁸ células/ml en tampón MACS, la selección de las DCs se realizó utilizando un magneto (VarioMACS) y columnas LS (Miltenyi Biotec) según el protocolo descrito por el fabricante. La eficiencia de la purificación se evaluó mediante citometría de flujo analizando la presencia del marcador de superficie CD11c en las células seleccionadas. El porcentaje de células CD11c⁺ obtenidas luego de la purificación fue de aproximadamente un 70%.

2.5 Purificación de linfocitos T CD4.

Los LT se extrajeron del bazo y placas de peyer. En el caso del bazo, este fue perfundido con medio RPMI + 10% FBS, luego se centrifugó la suspensión celular a 500xg por 7 minutos y se lisaron los glóbulos rojos con 2 ml de una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 10mM y Na₂EDTA 0,1mM, pH 7,2-7,4) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego las células fueron lavadas con medio RPMI + 10% FBS centrifugando a 500xg por 7 minutos. En el

caso de PP, el intestino fue previamente lavado con HBSS, luego se extrajeron las PP las que fueron disgregadas de manera mecánica y pasadas por malla metálica de 90 μm . Posteriormente, las células fueron lavadas con 10 ml de tampón MACS (PBS + 5% FBS + 2 mM EDTA) e incubadas por 20 minutos con 7,5 μl de MACS anti-CD4 en 90 μl de tampón MACS (CD4 L3T4 microbeads, Miltenyi Biotec) por cada 1×10^7 células a 4°C con rotación. La purificación de las células se realizó mediante selección positiva utilizando un magneto (VarioMACS) y columnas LS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). La pureza de la fracción positiva se verificó por citometría de flujo mediante el marcaje con CD4 obteniendo un porcentaje de células CD4⁺ de aproximadamente un 90%.

2.6 Análisis de citoquinas intracelulares.

En el caso de los LTs las células fueron resuspendidas a 2×10^6 células/ml en medio RPMI + 10% FBS. Posteriormente, fueron activadas por 4 horas a 37°C y 5% CO₂ con 0,25 μM de PMA (Sigma) y 1 $\mu\text{g/ml}$ de Ionomicina (Sigma) en presencia de Brefeldina A (GolgiPlug, BD Biosciences).

En el caso de las DCs, las células fueron resuspendidas a 2×10^6 células/ml en medio RPMI + 10% FBS. Posteriormente, fueron activadas por 4 horas a 37°C y 5% CO₂ con LPS 100 ng/ml (*Salmonella typhosa*, Sigma) en presencia de 0,7 μl de Monensina por cada ml de suspensión celular (GolgiStop, BD Biosciences).

Luego las células fueron lavadas con RPMI + 10% FBS y marcadas con anticuerpos fluorescentes de superficie de acuerdo al punto 2.3. Luego del marcaje

de superficie las células fueron fijadas y permeabilizadas con 200 μ l de Cytofix/Cytoperm (Cytofix/Cytoperm kit, BD Biosciences) por 20 minutos a 4°C. Después de ser lavadas con Perm Wash (Cytofix/Cytoperm kit, BD Biosciences) se incubaron por 30 minutos a 4°C en 50 μ l de Perm Wash con anti-IL-12 PE, anti-IL-10 FITC, en el caso de las DCs y anti-IL-4 PE y anti-IFN- γ FITC en el caso de los LTs. Luego, las células fueron lavadas con 700 μ l de PermWash centrifugando a 600xg por 8 minutos a 4°C y resuspendidas finalmente en PBS + 2% FBS para ser analizadas por citometría de flujo.

2.7 Activación policlonal de linfocitos T CD4.

La purificación de LTs CD4⁺ se hizo a partir de esplenocitos de ratones Balb/c y se realizó mediante separación inmunomagnética tal como indicado en 2.5. Luego los LTs CD4⁺ se resuspendieron a 2×10^6 células/ml en medio IMDM + 10% FBS + 50 μ M 2- β -mercaptoetanol y se activaron con 1 μ g/ml de anti-CD28. Por otro lado, una placa de 24 pozos se recubrió con 1 μ g/ml de anti-CD3 en donde posteriormente se colocaron los LT CD4⁺. Al tercer día de activación, los linfocitos se trasladaron a pozos sin anti-CD3, para detener la activación policlonal y se les agregó 1 ml de medio fresco. Al quinto día se analizó mediante citometría de flujo la producción de citoquinas intracelulares, como IL-4 e IFN- γ .

2.8 Purificación de células de lámina propia.

Se disecó el intestino delgado y se lavó con una solución HBSS utilizando una sonda nasogástrica para ratón. Posteriormente se removieron las placas de peyer y se cortó el intestino en pequeños trozos. Los trozos fueron lavados repetidamente con HBSS y se incubaron tres veces por 15 minutos con rotación a 37° C en medio de separación de células epiteliales (MSCE) que consiste en HBSS + 10% FBS + EDTA 2 mM, descartando el sobrenadante.

Para liberar los leucocitos el tejido se digirió incubando durante 45 minutos a 37°C con rotación con 600 U/ml de Colagenasa D y 50 µg/ml de HBSS + 10% FBS + HEPES 10 mM y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente se repitió la digestión y el sobrenadante se pasó por un gradiente de Percoll para enriquecer la población celular. Finalmente las células se resuspendieron en medio IMDM + 10% FBS + 2β-Mercaptoetanol.

2.9 Análisis de linfocitos T reguladores de lámina propia.

Las células de lámina propia fueron resuspendidas en 1×10^6 células/ml de PBS + 5% FBS. Luego se centrifugaron a 714xg por 5 minutos a 4°C para resuspender el pellet en 100 µl de los anticuerpos de superficie CD4 FITC y CD25 PE a la dilución correspondiente en PBS + 5% FBS por 15 minutos en oscuridad a 4° C. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS + 5% FBS y se incubaron en una solución de fijación/permeabilización (eBiosciences) durante toda la noche a 4°C en oscuridad.

Al día siguiente, las células fueron lavadas con 1 ml de tampón de permeabilización (eBiosciences), centrifugando a 714xg por 8 minutos a 4°C. Posteriormente, bloqueamos las células durante 15 minutos con 50 µl de tampón de permeabilización + 10% FBS en oscuridad a 4°C y agregamos 50 µl del anticuerpo FoxP3 PE-Cy5 o control de isotipo diluido en tampón de permeabilización e incubamos 30 minutos en oscuridad a 4°C. Posteriormente, lavamos las células con 1 ml de tampón de permeabilización, centrifugando a 714xg por 8 minutos a 4°C para finalmente resuspenderlas en PBS + 5% FBS y pasarlas por el citómetro.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización y comparación de las poblaciones celulares en distintos órganos linfoides secundarios de ratones *il-4 α* KO y normales.

En primer lugar analizamos las poblaciones celulares en los distintos órganos linfoides, específicamente bazo, linfonodo mesentérico (MLN), placas de peyer (PP) y linfonodos periféricos (PLN) para determinar si la IL-4 es importante en la homeostasis celular. Para esto determinamos el número absoluto de LTs, linfocitos B (LB), células natural killer (NK) y DCs en ratones *il-4 α* KO, incapaces de sentir la IL-4 por no poseer la cadena α del receptor de IL-4, con ratones normales que poseen el mismo fondo genético (Balb/c) y fenotipo.

Las células de los distintos órganos linfoides fueron disgregadas en medio RPMI + 10% FBS y pasadas a través de una malla metálica y en el caso de los esplenocitos (células del bazo) se lisaron además los glóbulos rojos. Posteriormente, las células fueron marcadas con los anticuerpos adecuados de acuerdo al tipo celular en estudio (Mat. y Met. 2.3). Como el porcentaje de células dendríticas es muy bajo (alrededor de un 1% del total de las células), se enriquecieron por selección inmunomagnética luego de un tratamiento con Colagenasa D en presencia de DNAsa I por 45 minutos a 37°C en rotación (Mat. y Met. 2.4). Posteriormente se realizó el marcaje celular con los anticuerpos adecuados (Mat. y Met. 2.3).

Para identificar los linfocitos T analizamos la presencia del marcador celular CD3, para LB el marcador B220, para las células NK el marcador CD49b y para las DCs el marcador CD11c.

La Fig. 1 muestra que los valores absolutos de las diferentes poblaciones celulares en bazo, MLN, PP y PLN del ratón *il-4ra* KO comparado al ratón control no presentan diferencias significativas sugiriendo que la IL-4 no cumple un papel fundamental en la homeostasis de las poblaciones celulares en dichos órganos.

Profundizamos el análisis estudiando las sub-poblaciones de linfocitos T presentes en los distintos órganos linfoides, específicamente linfocitos T de ayuda CD4⁺, linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y linfocitos T reguladores caracterizados como células CD4⁺ CD25^{high} y CD62L⁻. La Fig. 2 muestra que no existen diferencias significativas en el número absoluto de los distintos tipos de linfocitos T estudiados al comparar el ratón *il-4ra* KO con el control, en ninguno de los órganos linfoides secundarios evaluados.

Estos resultados sugieren que la IL-4 no ejerce un papel importante en el desarrollo y/o establecimiento de las poblaciones celulares del sistema inmune en ninguno de los órganos linfoides secundarios estudiados.

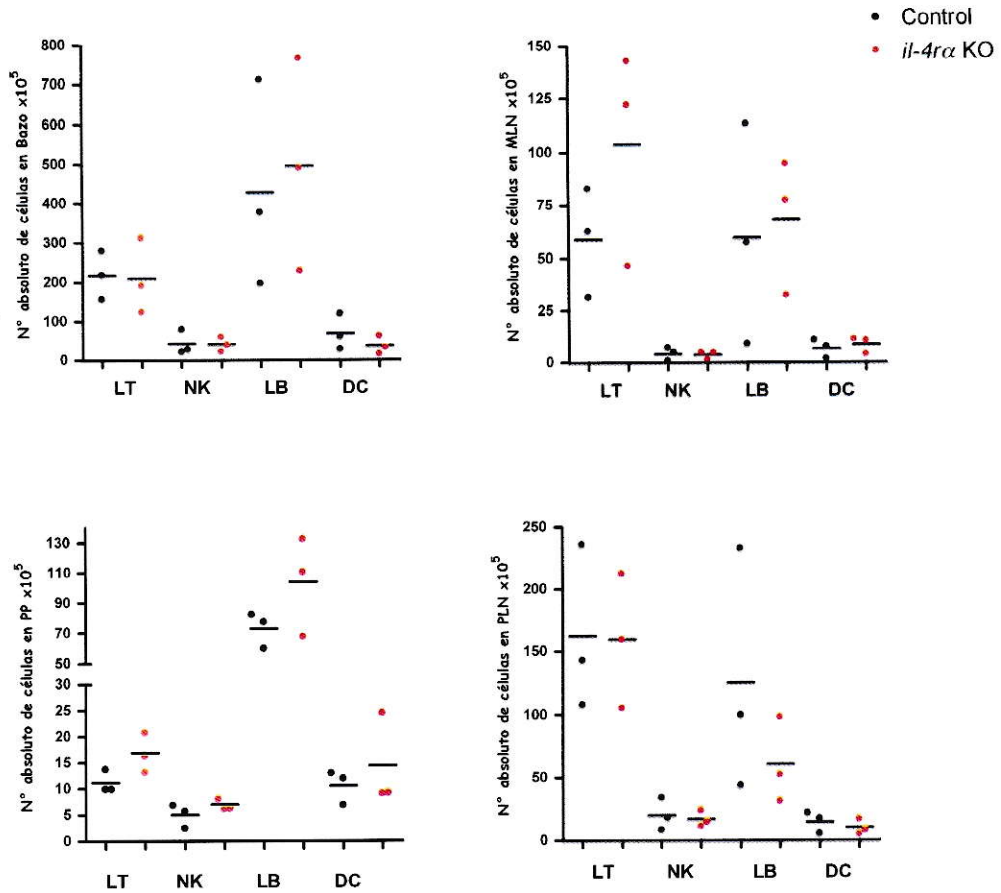


Figura 1: La IL-4 no cumple un papel importante en la homeostasis celular en los órganos linfoides secundarios. Valores absolutos de linfocitos T, linfocitos B, células NK y DCs presentes en bazo, MLN, PP y PLN de ratones *il-4ra* KO y Balb/c. Los distintos órganos linfoides secundarios fueron disgregados y pasados por malla metálica antes de realizarse el marcaje celular. Para determinar el número de células dendríticas, los órganos fueron previamente digeridos con Colagenasa D en presencia de DNasa I y se purificaron las DCs mediante selección positiva utilizando MACS anti-CD11c. Los linfocitos T fueron marcados con CD3, los LB con B220, las células NK con CD49b y las DCs con CD11c. En los gráficos se muestra la media de 3 experimentos. En todas las comparaciones realizadas no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

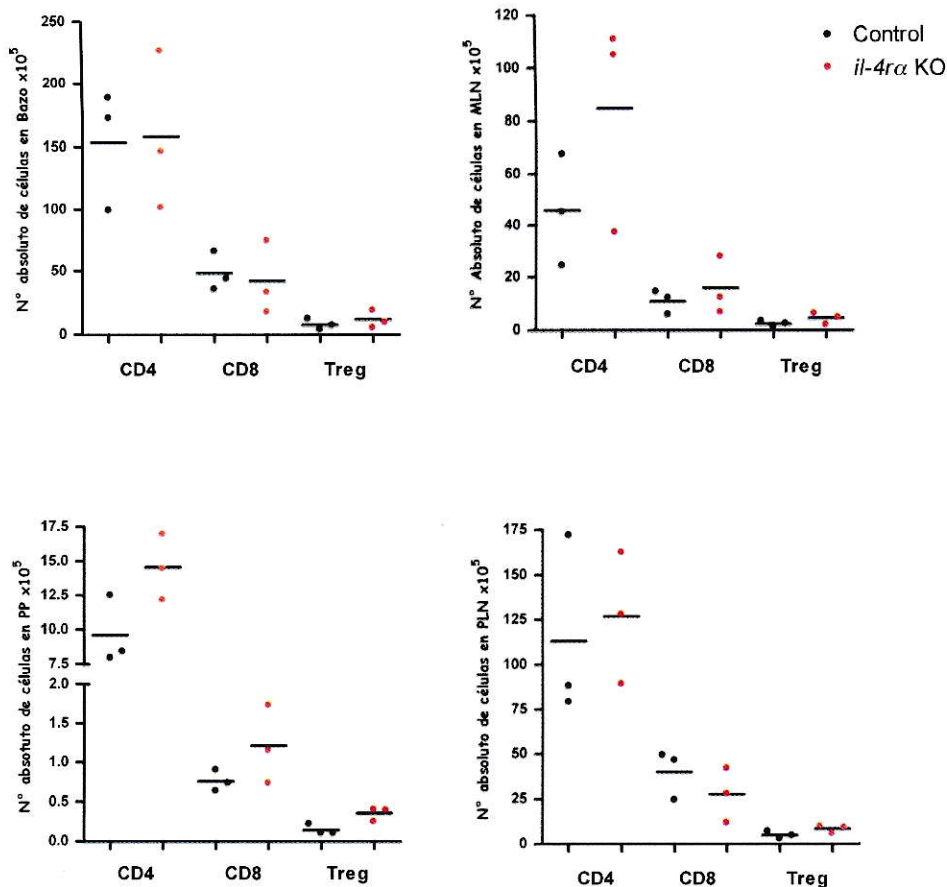


Figura 2: La IL-4 no cumple un papel importante en la homeostasis celular de linfocitos T. Valores absolutos de linfocitos T CD4⁺, linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y linfocitos Treg presentes en bazo, MLN, PP y PLN de ratones *il-4ra* KO y controles. En los gráficos se muestra la media de 3 experimentos. En todas las comparaciones realizadas no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

3.2 Análisis de la polarización de linfocitos T CD4⁺ *il-4 α* KO en distintos órganos linfoides secundarios.

Diferentes estudios muestran que la IL-4 cumple un papel importante en la generación de linfocitos Th2, que se caracterizan por producir IL-4 (Hsieh, Heimberger et al. 1992) (Kalinski, Hilkens et al. 1999). Además está descrito que la IL-4 genera un *feed back* negativo para la generación de nuevos linfocitos Th2, ya que induce en las células dendríticas la producción de IL-12, citoquina relacionada con la generación de linfocitos Th1 (Hochrein, O'Keeffe et al. 2000) (Seegmuller, Hacker et al. 2003) (Kalinski, Smits et al. 2000).

Para analizar la polarización de los linfocitos T CD4⁺ en ratones *il-4 α* KO y controles, se aislaron las células del bazo, MLN, PP y PLN y se activaron con PMA y Ionomicina en presencia de Brefeldina. Luego de la activación, las células fueron lavadas y marcadas en la superficie con un anticuerpo anti-CD4 para poder analizar la producción de citoquinas intracelulares sólo en este tipo celular. Posteriormente las células fueron permeabilizadas para analizar la presencia de IL-4 (característica de linfocitos Th2) e IFN- γ (característica de linfocitos Th1) intracelulares (Mat. y Met. 2.6), mediante marcaje con anticuerpos y citometría de flujo.

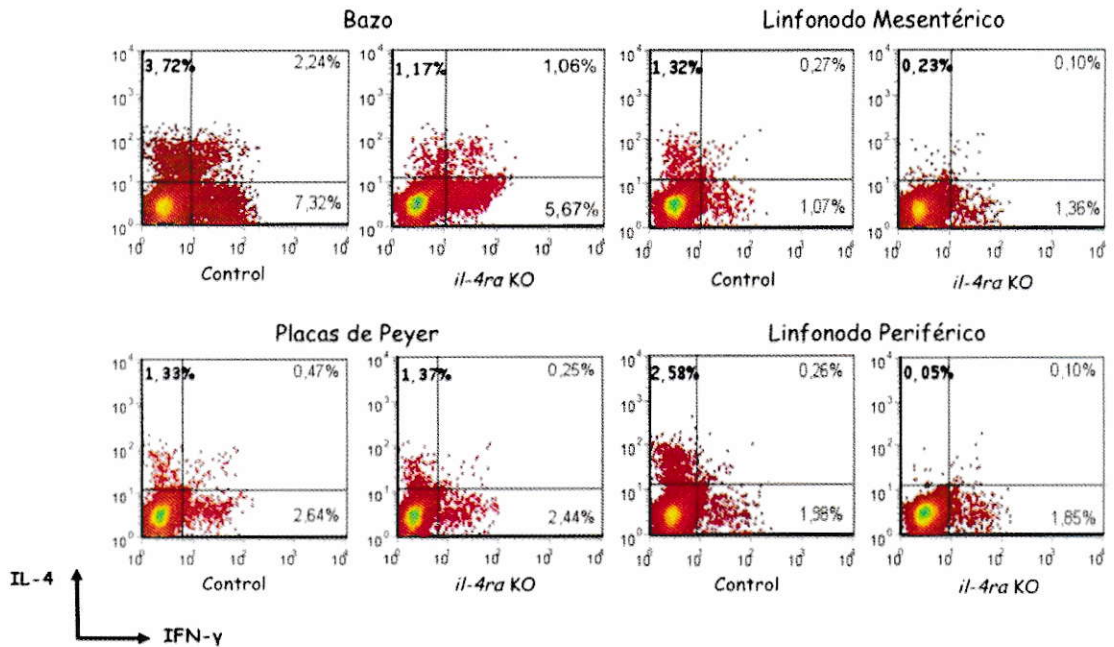
La Fig. 3 demuestra que los linfocitos T CD4⁺ de bazo, MLN y PLN provenientes del ratón *il-4 α* KO se polarizan preferentemente hacia un fenotipo Th1, ya que producen menos IL-4 en comparación al ratón control. Sin embargo, en PP no existe tal

diferencia produciéndose células IFN- γ ⁺ e IL-4⁺ en igual porcentaje. Este resultado se reprodujo en 5 experimentos independientes.

Puesto que las activaciones de los linfocitos T CD4⁺ se realizaron en presencia de todos los tipos celulares presentes en los diferentes órganos (Fig. 3), decidimos activar de forma aislada y policlonal los linfocitos T CD4⁺ de placas de peyer, para descartar la posible influencia del microambiente tolerogénico característico de este órgano en la polarización de los linfocitos T.

Para esto, los LTs CD4⁺ fueron purificados desde PP de ratones *il-4 α* KO y control mediante selección positiva utilizando MACS anti-CD4 y activados mediante el uso de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Mat. y Met. 2.7). Luego de 5 días de cultivo, se analizó la producción de citoquinas mediante el análisis de citoquinas intracelulares como se especificó más arriba. Como control de estos experimentos se aislaron y activaron linfocitos T CD4⁺ de bazo mediante el mismo procedimiento. A diferencia de lo observado con células totales, los linfocitos T CD4⁺ purificados de PP del ratón *il-4 α* KO son capaces de polarizar la respuesta inmune hacia un fenotipo Th1 tal como se observa para LTs CD4⁺ purificados de bazo (Fig. 4). Estos resultados sugieren que efectivamente el microambiente propio de PP no permite evidenciar la deficiencia en la producción de IL-4 de los LTs CD4⁺ *il-4 α* KO, lo que podría explicarse porque este ambiente podría estar contrarrestando la sobreproducción de IL-4 de los linfocitos T al momento de la activación mediado por un microambiente tolerogénico.

A.



B.

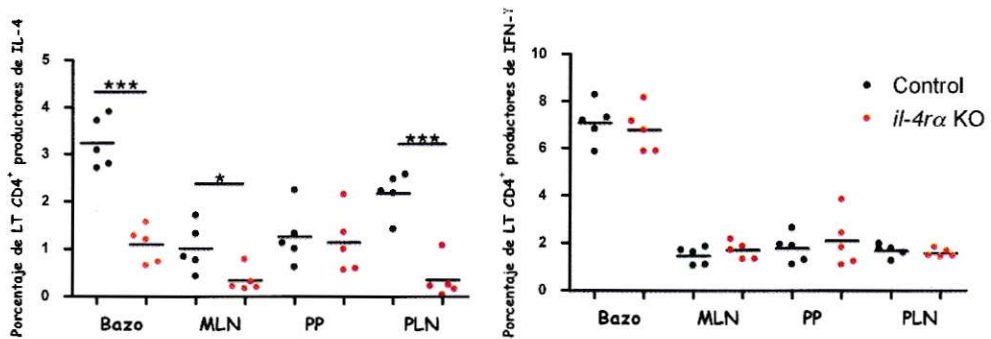
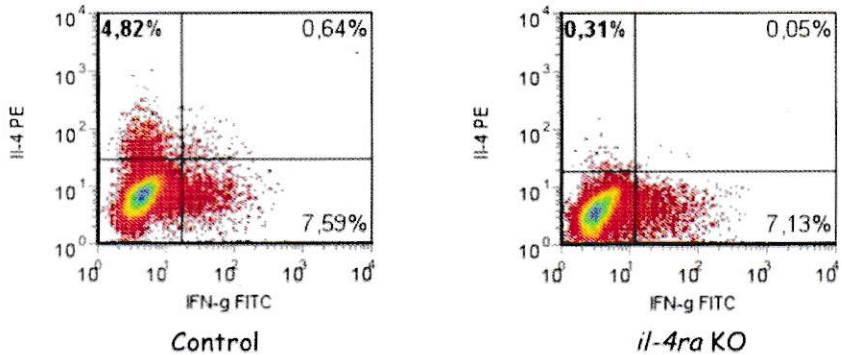


Figura 3: Los linfocitos T CD4⁺ de ratones *il-4ra* KO se polarizan preferentemente a Th1 excepto en placas de peyer. Análisis realizado en células CD4⁺. Se aislaron las células de bazo, MLN, PP y PLN y se activaron por 4 horas a 37°C y 5% CO₂ con PMA y Ionomicina en presencia de Brefeldina. Posteriormente, se realizó un marcaje de superficie con anti-CD4, se fijaron y permeabilizaron las células para marcar de manera intracelular con los anticuerpos anti-IL-4 y anti-IFN- γ . La producción de citoquinas intracelulares se analizó mediante citometría de flujo. A) Experimento representativo de 5 experimentos independientes. B) Valores obtenidos en 5 experimentos independientes, se muestra el promedio y la significancia estadística; (***) p < 0,001, (*) p < 0,05.

Linfocitos T CD4⁺ de Placas de Peyer



Linfocitos T CD4⁺ de Bazo

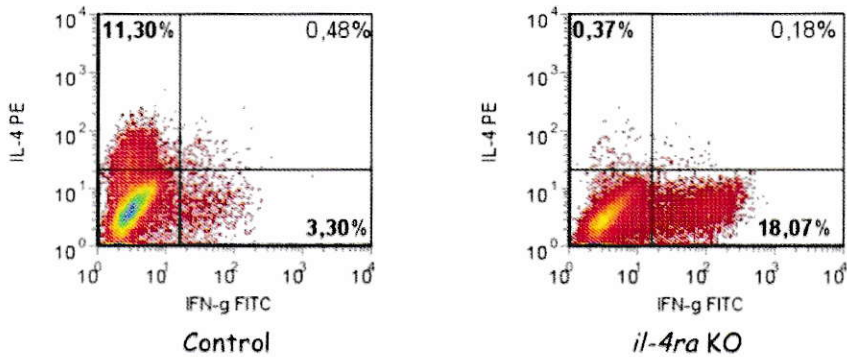


Figura 4: La activación policlonal de linfocitos T CD4⁺ purificados provenientes de placas de peyer produce una polarización preferencial a Th1. Análisis realizado en células CD4⁺. Se aislaron las células del bazo y PP, luego se purificaron los linfocitos T CD4⁺ mediante selección positiva utilizando MACS anti-CD4. Los linfocitos T CD4⁺ fueron activados por 4 horas a 37°C y 5% CO₂ con PMA y Ionomicina en presencia de Brefeldina y luego fueron fijados y permeabilizados para realizar el marcaje de citoquinas intracelulares con anticuerpos anti-IL-4 y anti IFN- γ . La producción de citoquinas intracelulares se analizó mediante citometría de flujo. Resultado de 1 experimento.

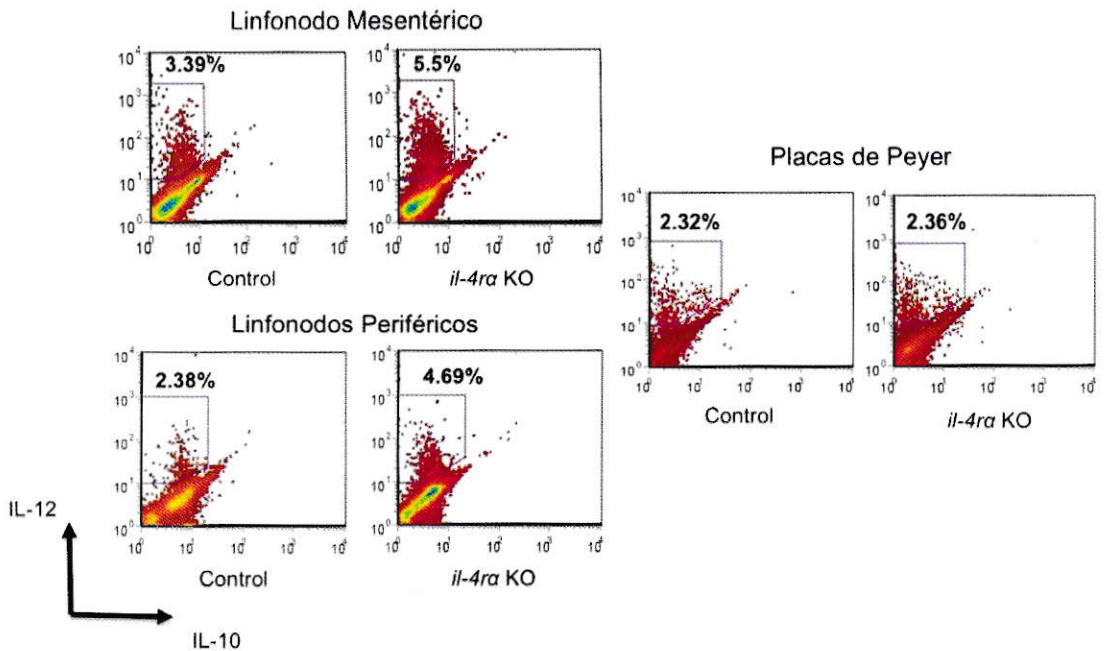
3.3 Producción de IL-12 por células dendríticas del ratón *il-4ra* KO.

Se ha demostrado que las células dendríticas cumplen un papel fundamental en la activación de los linfocitos T influenciando la polarización de la respuesta inmune. Se ha descrito que la activación de DCs por medio de receptores del tipo Toll (TLRs) suprime la secreción temprana de IL-4 por parte de los linfocitos T por lo que inhibe la generación de linfocitos Th2 (Sun and Pearce 2007). Por esta razón analizamos la producción de IL-12 (citoquina que determina un patrón Th1) por las células dendríticas en los ratones *il-4ra* KO. Para esto purificamos las células dendríticas mediante selección positiva utilizando MACS anti-CD11c (Mat. y Met. 2.4), obteniendo aproximadamente un 70% de células CD11c⁺, y las activamos con LPS (ligando de TLR4). Luego de la activación, las células fueron marcadas en la superficie con un anticuerpo anti-CD11c para focalizar el análisis solo en las DCs, y se realizó un marcaje intracelular de citoquinas (Mat. y Met. 2.6) con anti-IL-12 y anti-IL-10 para luego evaluar la producción de estas mediante citometría de flujo. Analizamos la IL-10 ya que está reportado que esta citoquina es producida preferentemente por las DCs provenientes de placas de peyer activadas mediante CD40, la cual induce una diferenciación a un fenotipo Th2 (Iwasaki and Kelsall 1999).

Los resultados presentados en la Fig. 5 demuestran que las células dendríticas naturales no producen IL-10 al ser activadas con LPS y que existe una mayor producción de IL-12 en las células dendríticas provenientes del ratón *il-4ra* KO comparadas a ratones controles en MLN y PLN. Sin embargo DCs provenientes de PP no muestran esta tendencia, demostrando nuevamente que en PP existen mecanismos

compensatorios del efecto de IL-4. Estos resultados sugieren que la regulación de la producción de IL-12 estaría relacionada directamente por la IL-4.

A.



B.

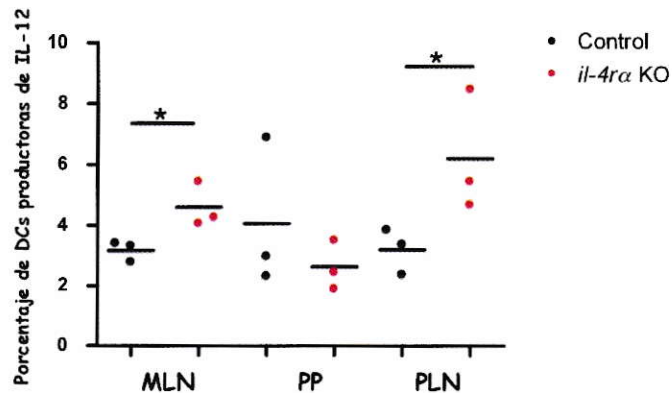


Figura 5: Células dendríticas de ratones *il-4ra* KO producen cantidades significativamente mayores de IL-12 comparado ratones controles, excepto en placas de peyer. Análisis realizado en las células CD11c⁺. Se aislaron las células provenientes de MLN, PP y PLN de animales *il-4ra* KO y controles. Luego se purificaron las células dendríticas mediante selección positiva utilizando MACS anti-CD11c y se activaron con LPS por 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente se realizó un marcaje de superficie con un anticuerpo anti-CD11c para analizar sólo las DCs. Finalmente, las células fueron fijadas y permeabilizadas para ser marcadas de manera intracelular con anticuerpos anti-IL-12 y anti-IL-10. La producción de citoquinas intracelulares se evaluó mediante citometría de flujo. A) Experimento representativo de 3 experimentos. B) Representación gráfica del promedio de 3 experimentos independientes, se muestra la significancia estadística; (*) p < 0,05.

3.4 Análisis de las subpoblaciones de células dendríticas en placas de peyer del ratón *il-4ra* KO.

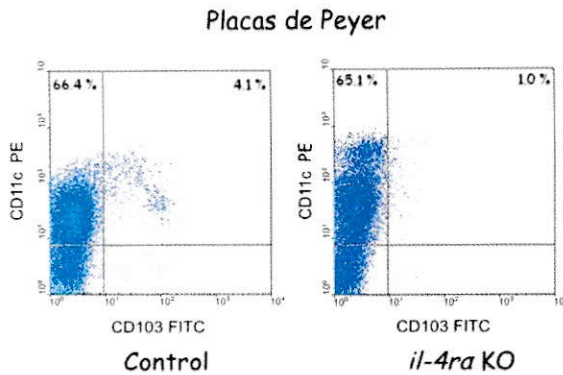
Al analizar los marcadores de maduración de las células dendríticas de PP en el ratón *il-4ra* KO y control no encontramos diferencias significativas de los marcadores clásicos como CD86, IA^d y CD80. Evidencias de nuestro laboratorio demuestran que la IL-4 cumple un papel importante en la inducción de marcadores de *homing* a intestino en linfocitos T (Elgueta, Sepulveda et al. 2008). El efecto de la IL-4 se produce a través de las DCs, por lo tanto decidimos estudiar las poblaciones de células dendríticas presentes en tejidos asociados a mucosa intestinal, en particular, la población CD103⁺, vinculada con la inducción de marcadores de *homing* a intestino en linfocitos T. Para esto purificamos las DCs de PP mediante selección positiva utilizando MACS anti-CD11c (Mat. y Met. 2.4), obteniendo aproximadamente un 70% de células CD11c⁺. Posteriormente se realizó un marcaje de superficie utilizando anticuerpos anti-CD11c y anti-CD103 para evaluar el porcentaje de DCs CD103⁺ mediante citometría de flujo. En el caso de lámina propia, las células fueron obtenidas realizando un gradiente de Percoll (Mat. y Met. 2.8).

El análisis de las DCs CD103⁺ en PP de ratones *il-4ra* KO demuestra que esta población se encuentra considerablemente disminuida respecto de los ratones controles (Fig. 6A y 6B). Cabe destacar que las DCs de PP del ratón *il-4ra* KO presentan una pequeña población de DCs CD11c⁺ de mayor intensidad de fluorescencia ausente en los ratones controles, lo que evidencia que las DCs provenientes del ratón *il-4ra* KO no pueden diferenciarse a DCs CD103⁺. Por lo tanto,

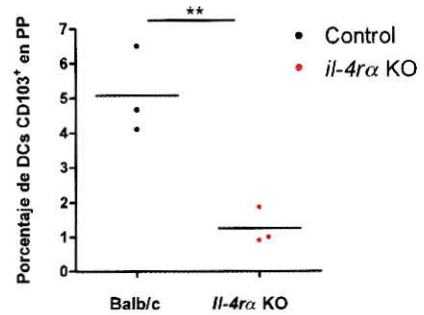
la IL-4 podría tener un efecto en la generación, mantenimiento y/o permanencia de este subtipo de DCs en el intestino.

En lámina propia, así como en PP, también se observa una disminución de esta subpoblación de DCs, de alrededor de un 25% menos en el ratón *il-4ra* KO (Fig. 6C). Estos resultados sugieren que la existencia de las DCs CD103⁺ no depende estrictamente de la presencia de IL-4, pero sí esta citoquina cumple algún papel en el número de ellas presentes en órganos asociados a mucosa intestinal.

A.



B.



C.

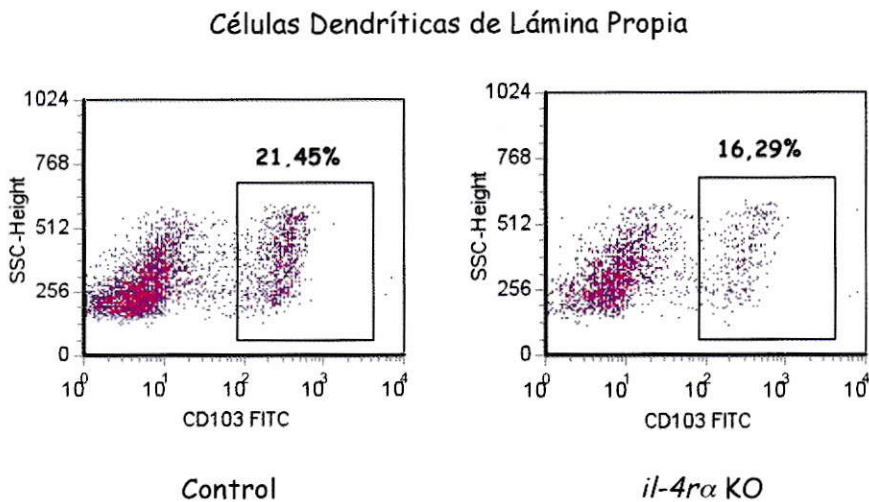


Figura 6: Organos asociados a mucosa intestinal, específicamente placas de peyer y lámina propia, del ratón *il-4ra* KO presentan una menor proporción de células dendríticas CD103⁺ en comparación al ratón control. En el caso de PP, las DCs fueron purificadas mediante selección positiva utilizando MACS anti-CD11c para luego ser marcadas con anti-CD11c y anti-CD103. En el caso de LP, las células fueron obtenidas de intestino delgado y pasadas por un gradiente de Percoll para luego ser marcadas con anticuerpos anti-CD11c y anti-CD103. El porcentaje de CD11c⁺CD103⁺ fue analizado mediante citometría de flujo. A) Experimento representativo de 3 experimentos independientes, se muestra el promedio y la significancia estadística; () $p < 0,01$. C) Resultado de 1 experimento, el análisis está hecho en las células CD11c⁺.**

3.5 Análisis de linfocitos T reguladores en lámina propia.

Existen evidencias que demuestran que las DCs CD103⁺, asociadas a mucosa intestinal, poseen propiedades regulatorias (Annacker, Coombes et al. 2005) e inducen la generación de linfocitos T reguladores (Sun, Hall et al. 2007), por lo tanto decidimos evaluar el porcentaje de este tipo de LTs en lámina propia del ratón *il-4ra* KO y ratones controles.

Las células fueron obtenidas del intestino delgado realizando un gradiente de Percoll (Mat. y Met. 2.8). Luego, se realizó un marcaje de superficie utilizando anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25. Posteriormente, las células fueron fijadas y permeabilizadas, para realizar un marcaje intracelular con anti-FoxP3. El porcentaje de linfocitos T CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ fue determinado mediante citometría de flujo (Mat. y Met. 2.9).

La Fig. 7 muestra que en ratones *il-4ra* KO existe un menor porcentaje de linfocitos T reguladores comparados a ratones controles. Por lo que concluimos que el déficit de DCs CD103⁺ está influenciando el porcentaje de linfocitos Treg, parecieran producir menos linfocitos Treg. Estos resultados sugieren que la IL-4 cumpliría un papel indirecto en la generación de linfocitos Treg aumentando la generación de DCs CD103⁺.

LT reguladores de Lámina Propia

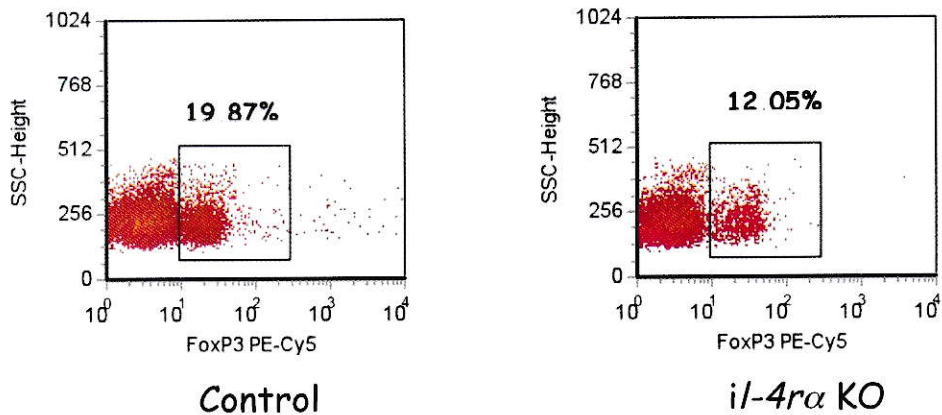


Figura 7: Ratones *il-4ra* KO poseen un menor porcentaje de linfocitos T reguladores en lámina propia comparado a ratones controles. Análisis hecho en las células CD4⁺CD25⁺. Se obtuvieron las células de lámina propia a partir del intestino delgado de ratones *il-4ra* KO y ratones controles. Luego, las células fueron pasadas por un gradiente de Percoll y se marcaron con anticuerpos de superficie anti-CD4 y anti-CD25. Posteriormente, las células fueron fijadas y permeabilizadas para realizar un marcaje intracelular con el anticuerpo anti-FoxP3. El porcentaje de linfocitos T reguladores (linfocitos T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) fue de determinado mediante citometría de flujo. Resultado obtenido de 1 experimento.

4. DISCUSION

Al comenzar este estudio, decidimos evaluar si la falta de IL-4 en los animales *il-4ra* KO producía diferencias en la composición de las poblaciones celulares del sistema inmune, ya que no existen evidencias en la literatura sobre la posible influencia de la IL-4 en la homeostasis celular. Al analizar el número absoluto de LB, células NK, DCs o linfocitos T en bazo, MLN, PP y PLN no encontramos diferencias significativas en el número de estas poblaciones en los distintos órganos linfoides estudiados (Fig. 1). Por otra parte, al evaluar si existían diferencias en los distintos tipos de linfocitos T, como linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺ o linfocitos T reguladores presentes en estos órganos, tampoco encontramos diferencias significativas en ninguno de los órganos linfoides estudiados (Fig. 2). Por lo tanto concluimos que la IL-4 no afecta o no cumple un papel importante en la homeostasis celular del sistema inmune.

Por otro lado, existen evidencias que la IL-4 cumple un papel en la polarización de la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ hacia una respuesta Th2 (Hsieh, Heimberger et al. 1992), lo que nos llevó a evaluar la producción de esta citoquina en los linfocitos del ratón *il-4ra* KO. Encontramos que los linfocitos T CD4⁺ provenientes de ratones *il-4ra* KO poseen preferentemente un fenotipo Th1 en todos los órganos estudiados, excepto en PP (Fig. 3), por lo que concluimos que los linfocitos provenientes de ratones *il-4ra* KO son deficientes en la producción de IL-4. Esto se correlaciona con lo mencionado en la literatura (Hsieh, Heimberger et al. 1992) que le otorga a la IL-4 un papel esencial en el desarrollo de linfocitos Th2, por lo que la incapacidad de sentir la IL-4 produciría efectivamente una polarización de la respuesta hacia un fenotipo Th1.

Con el fin de entender las diferencias encontradas en PP (Fig. 3 y Fig. 4) nos planteamos como hipótesis que la presencia de linfocitos Th2 en el animal *il-4ra* KO podía deberse al ambiente tolerogénico allí presente (Sun, Hall et al. 2007) (Iwasaki and Kelsall 2001) (Chirido, Millington et al. 2005) que podría estar anulando la activación y por tanto la sobreproducción de IL-4 por parte de los LTs. Es por esto que decidimos purificar los linfocitos T CD4⁺ de este órgano y activarlos de manera policlonal en ausencia de otros tipos celulares, como se habría realizado en el primer experimento. Observamos que los linfocitos T CD4⁺ provenientes de PP de ratones *il-4ra* KO producen principalmente IFN- γ y presentan un déficit en la producción de IL-4 al igual que en otros órganos linfoides estudiados (Fig. 4). Estos resultados sugieren que el ambiente tolerogénico propio de este órgano efectivamente enmascara las diferencias en la producción de IL-4, que se observan en los linfocitos T CD4⁺ del animal *il-4ra* KO, al activar toda la suspensión celular. Esto podría deberse específicamente a la influencia de otros tipos celulares presentes al momento de la activación en la generación de linfocitos Th2, como por ejemplo, células dendríticas, linfocitos B, etc.

Ya que está ha descrito que la polarización de la respuesta inmune depende en gran manera de la secreción de citoquinas por las DCs en el momento de la interacción con los linfocitos T (Hochrein, O'Keeffe et al. 2000) (Seegmuller, Hacker et al. 2003) (Kalinski, Smits et al. 2000), decidimos evaluar la producción de IL-12, citoquina que determina un fenotipo Th1, por las DCs en ratones *il-4ra* KO y controles. Observamos que las DCs de MLN y PLN provenientes de los ratones *il-4ra* KO producen más IL-12 que las DCs de ratones controles (Fig. 5). Sin embargo, las DCs de PP producen cantidades similares de IL-12. Estos resultados sugieren que la IL-4 posee una función

reguladora de la producción de IL-12 en las DCs ya que cuando estas no son capaces de sentir la IL-4 aumenta la producción de IL-12 a excepción de lo que ocurre en placas de Peyer. Esto contradice lo presentado en la literatura en donde la IL-4 aumentaría la producción de IL-12 (Hochrein, O'Keeffe et al. 2000) (Seegmuller, Hacker et al. 2003) (Kalinski, Smits et al. 2000). De esta forma, la IL-4 estaría induciendo de manera indirecta, a través de las DCs, la generación de linfocitos Th2 en órganos como el bazo, MLN y PLN y también lo haría de forma directa en los linfocitos T induciendo en ellos la producción de IL-4. Justificamos la excepción de los resultados observados en PP también pensando en el microambiente tolerogénico de este órgano, ya que como el porcentaje de DCs en PP es de alrededor de un 1%, el porcentaje de DCs luego de la purificación es de alrededor de un 70%, por lo que el 30% de células restantes podrían estar ejerciendo un papel tolerogénico que imposibilita ver el resultado.

Con el fin de evaluar el papel de la IL-4 en órganos asociados a mucosa intestinal, como PP y LP, decidimos analizar las subpoblaciones de DCs presentes en estos órganos en los ratones *il-4ra* KO. Nuestro análisis demostró que las DCs presentes en PP no presentan diferencias respecto de marcadores de maduración en ratones *il-4ra* KO y controles (datos no mostrados). Sin embargo, en ambos órganos los ratones *il-4ra* KO presentan una disminución de alrededor de un 25% de la población de DCs CD103⁺ (Fig. 6), esta subpoblación de DCs está vinculada con la inducción de marcadores de *homing* a intestino en LTs (Jaensson, Uronen-Hansson et al. 2008) y con la generación de linfocitos T reguladores (Sun, Hall et al. 2007).

De acuerdo a los resultados previamente expuestos, la IL-4 podría tener alguna influencia en la generación, mantenimiento y/o permanencia de las DCs CD103⁺ en órganos asociados a tejido intestinal. Por esto, evaluamos los linfocitos T reguladores en LP de ratones *il-4ra* KO y controles. Encontramos que en LP de ratones *il-4ra* KO existe una menor población de linfocitos T reguladores en comparación al ratón control, esto además de confirmar la vinculación de este tipo de DCs con la generación de linfocitos Treg probaría que estas DCs son funcionales, independiente de su incapacidad para sensar la IL-4. Finalmente, la IL-4 tendría un efecto indirecto a través de la generación de DCs tolerogénicas, pero no menos importante, en la generación de linfocitos T reguladores en lámina propia.

En conclusión la IL-4 cumple un papel directo en la polarización de la respuesta Th2 en los linfocitos T CD4⁺ aumentando, mediante un feed-back positivo, la producción de IL-4 y un papel indirecto, a través de las DCs, disminuyendo en ellas la producción de IL-12. Por otra parte, la IL-4 cumple un papel importante en la generación, mantenimiento o permanencia de DCs CD103⁺ y linfocitos Treg en tejidos asociados a mucosa intestinal.

5. CONCLUSIONES

En conjunto nuestros resultados muestran que la IL-4 cumple un papel importante en la polarización de la respuesta inmune, ya que ejerce una influencia directa en los linfocitos T induciendo en ellos la producción de IL-4 y por lo tanto un fenotipo Th2.

Por otro lado, la IL-4 regula la producción de IL-12 en las DCs produciendo un feedback positivo en la generación de linfocitos Th2. Además observamos que la IL-4 cumple un papel importante en la generación, mantenimiento y/o permanencia de las DCs CD103⁺ en PP y LP, por lo que podría influenciar de manera indirecta la inducción de moléculas de *homing* a intestino en linfocitos T. Finalmente, encontramos que la IL-4 también cumple un papel indirecto en la generación, mantenimiento y/o permanencia de linfocitos T reguladores en LP, lo que podría ser explicado por determinar la generación de DCs tolerogénicas.

Los ratones knock out para la cadena α del receptor para interleuquina 4 son incapaces de producir una polarización diferencial de la respuesta inmune.

6. BIBLIOGRAFIA

Annacker, O., J. L. Coombes, et al. (2005). "Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis." *J Exp Med* 202(8): 1051-61.

Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 18: 767-811.

Chirido, F. G., O. R. Millington, et al. (2005). "Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria." *Eur J Immunol* 35(6): 1831-40.

Dubucquoi, S., P. Desreumaux, et al. (1994). "Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion." *J Exp Med* 179(2): 703-8.

Elgueta, R., F. E. Sepulveda, et al. (2008). "Imprinting of CCR9 on CD4 T cells requires IL-4 signaling on mesenteric lymph node dendritic cells." *J Immunol* 180(10): 6501-7.

Finkelman, F. D., S. C. Morris, et al. (2000). "Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses." *J Immunol* 164(5): 2303-10.

Hochrein, H., M. O'Keeffe, et al. (2000). "Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells." *J Exp Med* 192(6): 823-33.

Hsieh, C. S., A. B. Heimberger, et al. (1992). "Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(13): 6065-9.

Iwasaki, A. and B. L. Kelsall (1999). "Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells." *J Exp Med* 190(2): 229-39.

Iwasaki, A. and B. L. Kelsall (2001). "Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells." *J Immunol* 166(8): 4884-90.

Jaensson, E., H. Uronen-Hansson, et al. (2008). "Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans." *J Exp Med* 205(9): 2139-49.

Jankovic, D., M. C. Kullberg, et al. (2002). "In the absence of IL-12, CD4(+) T cell responses to intracellular pathogens fail to default to a Th2 pattern and are host protective in an IL-10(-/-) setting." *Immunity* 16(3): 429-39.

Kaech, S. M., E. J. Wherry, et al. (2002). "Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development." *Nat Rev Immunol* 2(4): 251-62.

Kalinski, P., C. M. Hilkens, et al. (1999). "T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal." *Immunol Today* 20(12): 561-7.

Kalinski, P., H. H. Smits, et al. (2000). "IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells." *J Immunol* 165(4): 1877-81.

Larsson, M., J. F. Fonteneau, et al. (2001). "Dendritic cells resurrect antigens from dead cells." *Trends Immunol* 22(3): 141-8.

Murphy, K. M. and S. L. Reiner (2002). "The lineage decisions of helper T cells." *Nat Rev Immunol* 2(12): 933-44.

Nelms, K., A. D. Keegan, et al. (1999). "The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions." *Annu Rev Immunol* 17: 701-38.

Noben-Trauth, N., L. D. Shultz, et al. (1997). "An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4+ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10838-43.

Pace, L., C. Pioli, et al. (2005). "IL-4 modulation of CD4+CD25+ T regulatory cell-mediated suppression." *J Immunol* 174(12): 7645-53.

Pace, L., S. Rizzo, et al. (2006). "Cutting edge: IL-4-induced protection of CD4+CD25- Th cells from CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated suppression." *J Immunol* 176(7): 3900-4.

Seegmuller, I., H. Hacker, et al. (2003). "IL-4 regulates IL-12 p40 expression post-transcriptionally as well as via a promoter-based mechanism." *Eur J Immunol* 33(2): 428-33.

Skapenko, A., J. R. Kalden, et al. (2005). "The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors." *J Immunol* 175(9): 6107-16.

Sun, C. M., J. A. Hall, et al. (2007). "Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid." *J Exp Med* 204(8): 1775-85.

Sun, J. and E. J. Pearce (2007). "Suppression of early IL-4 production underlies the failure of CD4 T cells activated by TLR-stimulated dendritic cells to differentiate into Th2 cells." *J Immunol* 178(3): 1635-44.

Szabo, S. J., B. M. Sullivan, et al. (2003). "Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses." *Annu Rev Immunol* 21: 713-58.

Vlad, G., R. Cortesini, et al. (2005). "License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC." *J Immunol* 174(10): 5907-14.