

Tesis de Posgrado

Células dendríticas humanas : caracterización de su interacción con proteínas de matriz extracelular y de su capacidad inmunoreguladora

Jancic, Carolina Cristina

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Jancic, Carolina Cristina. (2002). Células dendríticas humanas : caracterización de su interacción con proteínas de matriz extracelular y de su capacidad inmunoreguladora. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3473_Jancic.pdf

Cita tipo Chicago:

Jancic, Carolina Cristina. "Células dendríticas humanas : caracterización de su interacción con proteínas de matriz extracelular y de su capacidad inmunoreguladora". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3473_Jancic.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Departamento de Ciencias Biológicas

Tesis de doctorado

Células dendríticas humanas: caracterización de su interacción con proteínas de matriz extracelular y de su capacidad inmunoreguladora

Autor: Carolina Cristina Jancic
Director: Dr. H. Eduardo Chuluyan

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas "José de San Martín",
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Agosto 2002

Nº 3 4 7 3

Agradecimientos

Al Dr. Eduardo Chuluyan quien me dirigió, por haberme transmitido generosamente sus conocimientos y experiencia.

Al Dr. Leonardo Fainboim por brindarme la posibilidad de realizar este trabajo en el laboratorio que él dirige.

A Mariano Alvarez por su desinteresada y valiosa ayuda en la microscopía confocal.

A todos mis compañeros de laboratorio por brindarme su cooperación siempre que lo necesité.

A Paulo, Fernanda y Ana Claudia por su gran camaradería y buena voluntad, por su cordialidad y su actitud franca.

A Agueda y Cecilia por su amistad desde el primer día en la facu y por compartir todo este camino sin claudicar frente a los obstáculos. A Andre, Adri, Evange, Flor, Gra, Sandra y Vivi por hacer más gratos los días en el lab y por mostrarme con su presencia que existen personas nobles en este mundo. A mis queridísimas amigas les agradezco por todos los muy buenos momentos compartidos y por estar cerca siempre.

El mayor agradecimiento es para mi familia que cada día me brindó su apoyo incondicional, les agradezco por la confianza que depositan en mi y por inculcarme que con esfuerzo y trabajo se puede lograr todo lo que se desea.

Indice

Resumen	1
<hr/>	
Abstract	3
<hr/>	
Introducción	5
<hr/>	
I. El Sistema Inmune	5
1. Generalidades	5
2. Tráfico leucocitario	6
2. 1. Moléculas de adhesión	6
2. 2. Cascada de adhesión y migración	9
II. Las células dendríticas (DC)	11
1. Características generales	11
2. La heterogeneidad de las DC	12
3. Generación de DC <i>in vitro</i>	14
4. El rol de las DC en la respuesta inmune	16
5. El rol de las DC en la inducción de tolerancia periférica	22
6. Señalización intracelular en DC: TNF α y AMPc	22
7. Inmunoterapia y DC	24
7. 1. Tratamiento de cáncer	25
7. 2. Tratamiento de enfermedades infecciosas, alergias y autoinmunidad	26
<hr/>	
Objetivos	28
<hr/>	
Materiales & métodos	29
<hr/>	
1. Cultivos celulares	29
1. 1. Generación de células dendríticas	29
1. 2. Obtención de células endoteliales	29
1. 3. Cultivo de células tumorales	30
2. Determinación de moléculas en moDC por inmunomarcación	30

2. 1. Inmunofluorescencia simple indirecta	30
2. 2. Inmunofluorescencia doble	31
2. 2. Inmunofluorescencia intracitoplasmática	31
3. Capacidad endocítica de las moDC: captación de dextrán-FITC	31
4. Capacidad inmunoestimuladora de moDC	31
4. 1. Respuesta alogeneica (cultivo mixto linfocitario)	31
4. 1. Respuesta antígeno específica	32
5. Estudio del mecanismo de adhesión	33
5. 1. Adhesión de moDC a proteínas de matriz extracelular (FN, LM, Col tipo IV)	33
5. 2. Adhesión de moDC a células endoteliales de vena de cordón umbilical humano y a células tumorales	35
5. 2. 1. Purificación y marcación de moDC con [⁵¹ Cr]	35
5. 2. 2. Ensayo de adhesión	36
5. 3. Bloqueo de la adhesión	36
6. Estudio del mecanismo de migración	36
6. 1. Migración transendotelial de moDC	37
6. 2. Migración de moDC a través de fibronectina	37
7. Cuantificación de AMPc	37
8. Detección de apoptosis	38
9. Determinación de IFN γ	38
10. Determinación de IL10	38
11. determinación de IL12	39
11. 1. Marcación intracitoplasmática	39
11. 2. ELISA	39
11. 3. <i>Western blot</i>	40
12. Análisis de los resultados	41
12. 1. Porcentaje de células adheridas	41
12. 2. Porcentaje de incremento en la adhesión	41
12. 3. Porcentaje de inhibición de la adhesión	41
12. 4. Porcentaje de moDC migradas	41
13. Análisis estadístico	41

14. Anticuerpos monoclonales utilizados	42
15. Soluciones utilizadas	43
Resultados	45
I. Caracterización de las células dendríticas derivadas de monocitos (moDC) obtenidas en cultivo	45
II. Las DC en la respuesta inmune	48
1. Adhesión y migración de moDC a través de células endoteliales	48
2. Captación de dextrán-FITC	53
3. Adhesión de moDC a proteínas de matriz extracelular	56
3. a. El $TNF\alpha$: modulación de la adhesión a proteínas de matriz extracelular	58
3. b. El $TNF\alpha$: señalización a través del AMPc	64
3. c. La $IL1\beta$: modulación de la interacción de moDC con proteínas de matriz extracelular y contenido de AMPc	67
3. d. La osmolaridad extracelular	68
4. Presentación de antígenos por células dendríticas a linfocitos T	71
4. a. Efecto del $TNF\alpha$	71
4. b. Efecto de la hiperosmolaridad	76
4. c. Rol de CD80 en la capacidad inmunoestimuladora de moDC	79
Discusión	86
Conclusiones	100
Referencias bibliográficas	102

Abreviaturas

AMPc: adenosina-3', 5'-monofosfato

CD: cluster de diferenciación

Col: colágeno

CPA: células presentadoras de antígenos

DC: células dendríticas

FN: fibronectina

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

HSA: albúmina sérica humana

HUVEC: células endoteliales de vena de cordón umbilical humano

IBMX: 3-isobutil-1-metixantina

IFN γ : interferón γ

Ig: inmunoglobulina

IL: interleuquina

LC: células de Langerhans

LM: laminina

LPS: lipopolisacárido

MEC: matriz extracelular

moDC: célula dendrítica derivada de monocitos

moDC-SBF: moDC cultivadas en presencia de suero bovino fetal

moDC-SH: moDC cultivadas en presencia de suero humano

PBS: buffer fosfato

PDE: fosfodiesterasa

PMA: "phorbol myristate acetate"

RTNF: receptores de TNF α

SBF: suero bovino fetal

SH: suero humano

TNF α : factor de necrosis tumoral α

TT: toxoide tetánico

Resumen

Las células dendríticas (DC) son las más eficientes células presentadoras de antígenos y cumplen un rol central en la inducción de la respuesta inmune primaria. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la interacción de las DC con otros tipos celulares y con la matriz extracelular (MEC); los factores que modulan dicha interacción; y la capacidad de las DC para inducir la proliferación de células T.

Para ello se utilizaron DC obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica (moDC) empleando interleuquina (IL) 4 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), en presencia de suero humano (SH) o suero bovino fetal (SBF).

Las moDC fueron capaces de adherirse a células endoteliales obtenidas a partir de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) y a distintas proteínas de MEC. Esta adhesión fue modulada por citoquinas como el $TNF\alpha$ y la $IL1\beta$. Mientras que el tratamiento de las células endoteliales con $TNF\alpha$ indujo una mayor adhesión y migración de moDC, el tratamiento de las moDC con dicha citoquina provocó una disminución en la adhesión tanto a endotelio como a fibronectina (FN) y laminina (LM), pero no a colágeno tipo IV (Col tipo IV). Los efectos de esta citoquina fueron mediados por el receptor de tipo II, cuya expresión disminuyó cuando las células se trataron con $TNF\alpha$. La interacción de las moDC con HUVEC no activado fue parcialmente mediada por CD18, CD29, CD49e y CD31. Por otro lado, la adhesión a proteínas de MEC fue mediada por las integrinas CD49e (para FN), CD49c y CD49f (para LM). La expresión de estas moléculas no se modificó con el tratamiento de las moDC con $TNF\alpha$. Sin embargo, la activación de las integrinas con PMA revirtió el efecto inhibitorio del $TNF\alpha$ sobre la adhesión a FN.

Además de disminuir la adhesión a proteínas de MEC, el tratamiento de las moDC con $TNF\alpha$ e $IL1\beta$ disminuyó el contenido intracelular de AMPc. Las células no adherentes a FN presentaron menores niveles de AMPc, mayor expresión de $IL12$ y mejor capacidad estimuladora de linfocitos T, comparadas con las células adherentes. En estas moDC el aumento del contenido de AMPc utilizando un inhibidor de la fosfodiesterasa o análogos de AMPc, revirtió el efecto del $TNF\alpha$ sobre la adhesión a FN y sobre su capacidad inmunoestimuladora.

Resumen

Por otro lado, estímulos “no clásicos” como el aumento de la osmolaridad extracelular modifican ciertas propiedades de las moDC, disminuyendo su capacidad endocítica, su adhesión a proteínas de MEC y su habilidad para inducir la proliferación de linfocitos T alogeneicos. El tratamiento hiperosmolar, además, provocó una disminución en el contenido de IL12, sin modificar la expresión de las moléculas HLA-I, HLA-DR, CD18, CD54 y CD86.

Las moDC generadas bajo diferentes condiciones de cultivo presentaron características particulares. Las células cultivadas en presencia de SBF (moDC-SBF) expresaron CD80 en la superficie celular a diferencia de las células cultivadas en presencia de SH (moDC-SH). Estas últimas presentaron reservorios intracelulares de dicha molécula. Además, las moDC-SBF mostraron una mayor expresión de IL12 y una alta eficiencia para inducir la proliferación de células T durante una respuesta inmune antígeno específica, comparadas con las moDC-SH.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el $TNF\alpha$ actuaría sólo sobre la población de moDC que expresa el RTNF tipo II, posiblemente inactivando las integrinas que participan en la interacción con las proteínas de MEC, lo que resulta en una menor adhesión. Además, existiría una correlación entre el contenido de AMPc y los cambios inducidos por el $TNF\alpha$ en las moDC, tanto en la adhesión a FN como en su capacidad inmunoestimuladora. Por otro lado, el aumento en la osmolaridad extracelular podría generar moDC con baja habilidad para estimular la proliferación de células T, lo cual podría estar en parte debido a la menor producción de IL12 y la menor capacidad para incorporar antígenos bajo condiciones hiperosmolares. Finalmente, la expresión de CD80 podría depender de factores presentes en el suero utilizado durante el cultivo de las moDC.

Resumen

Abstract

Dendritic cells (DC) are professional antigens presenting cells that play a critical role in the induction of acquired immune responses. The aim of the present study was to analyze the cell-DC and extracellular matrix (ECM) proteins-DC interactions. The factors that modulate this interactions and the immunostimulatory capacity of DC were further examined.

Monocytes derived DC (moDC) were used for these experiments. MoDC were able to adhere to endothelial cells obtained from human umbilical vein (HUVEC) and to ECM proteins. This adhesion was modulated by cytokines such as $TNF\alpha$ and $IL1\beta$. $TNF\alpha$ treated HUVEC increased moDC adhesion and migration. In contrast, $TNF\alpha$ treated moDC were less adherent to endothelium, fibronectin (FN) and laminin (LM), but not to collagen type IV (Col type IV). $TNF\alpha$ effect was mediated through TNF receptor II, which was downmodulated on $TNF\alpha$ -treated moDC. The moDC-HUVEC interaction was partially mediated by CD18, CD29, CD49e and CD31. The moDC adhesion to ECM proteins was mediated by CD49e for FN, and CD49c and CD49f for LM. The expression of these molecules did not change on $TNF\alpha$ treated moDC. However, PMA reversed the inhibitory effect of $TNF\alpha$ on FN adhesion, probably by integrin inactivation. $TNF\alpha$ also decreased the cAMP levels on moDC. Indeed, $TNF\alpha$ -treated cells non-adhered to FN showed lower levels of cAMP, higher IL12 expression and better immunostimulatory capacity compared with FN adhered moDC. By increasing the cAMP content with a phosphodiesterase inhibitor (IBMX) or cAMP analogues (8Br-cAMP) was possible to reverse the $TNF\alpha$ effect on adhesion and T-cell stimulatory capacity. Alternatively, moDC incubated with high extracellular osmolarity detached from ECM proteins and showed lower immunostimulatory capacity, compared with cells in iso-osmolar conditions. The effect of hiperosmolarity could be mediated by IL12, since those treated moDC showed lower level of IL12 without changes in the expression of surface molecules.

Some features of moDC were modified depending on the culture conditions. Cells cultured in the presence of fetal bovine serum (FBS) (moDC-FBS) expressed CD80 while $CD80^-$ moDC were generated by using human serum (HS) (moDC-HS). However, the moDC-HS showed intracellular expression of this molecule. Other differences observed between these two moDC were the higher IL12 production and

Abstract

the capacity to stimulate antigen-specific T cells of moDC-FBS, compared with moDC-HS.

Overall, these results suggest that $\text{TNF}\alpha$ and other non-classical stimuli act on some moDC decreasing the adhesion, probably by modulating the activation state of integrins. Furthermore, cAMP levels correlate with $\text{TNF}\alpha$ -induced changes of moDC adhesion and allostimulatory capacity. Finally, expression of CD80 on cellular membrane may depend on different factors present in serum, being FBS able to generate CD80^+ moDC with better immunostimulatory capacity.

Abstract

Introducción

I. El Sistema Inmune

I. 1. Generalidades

El sistema inmune está constituido por un conjunto de células y moléculas muy bien organizadas y especializadas. Todas las células que forman parte del mismo se generan a partir de un precursor pluripotente el cual se diferencia en dos tipos celulares con un potencial más restringido. Uno de ellos da origen a las células del linaje linfóide formado principalmente por linfocitos y el otro a las células del linaje mielóide, constituido por monocitos y leucocitos polimorfonucleares entre otras [1].

Existen dos tipos de respuesta inmune frente al ingreso de un patógeno, la respuesta innata y la adaptativa. Normalmente cuando un microorganismo atraviesa las primeras barreras de defensa (por ejemplo: piel y mucosas) y accede a un tejido, se desarrolla una respuesta inflamatoria (inmunidad innata). Participan de la misma las células NK, las células fagocíticas como los neutrófilos, macrófagos, monocitos y células dendríticas. También hay liberación de mediadores de inflamación por parte de los basófilos, mastocitos y eosinófilos. Otros factores solubles que participan en este tipo de respuesta son el complemento, las proteínas de fase aguda y citoquinas entre ellas los interferones. Durante el proceso inflamatorio hay vasodilatación y aumento en la permeabilidad capilar seguida por el reclutamiento de leucocitos al sitio de la lesión. La infiltración leucocitaria es el resultado de dos mecanismos generales: 1) la producción de factores quimiotácticos en el foco inflamatorio, como el componente C5a del complemento y CXCL8 (IL8) entre otros, que promueven la activación y migración celular; y 2) la expresión de moléculas de adhesión sobre las células endoteliales, activadas por la liberación de citoquinas como la IL1 y el $TNF\alpha$, que provocan la adhesión y migración leucocitaria a través del endotelio vascular [2-4].

La respuesta inmune adaptativa involucra a los linfocitos B y T, los cuales reconocen a los antígenos en forma específica gracias a la presencia de receptores de membrana. Las células presentadoras de antígenos (CPA) son las encargadas de presentar a los linfocitos T los diferentes epítopes antigénicos. Todo este proceso ocurre en un microambiente controlado y modulado por citoquinas y quimoquinas [1, 5-7]. El desarrollo de la respuesta inmune adaptativa tiene lugar en los órganos

Introducción

linfoides periféricos o secundarios. Estos están constituidos por estructuras encapsuladas bien organizadas, como el bazo y los ganglios linfáticos; o por cúmulos no encapsulados dispersos por el organismo, como el tejido linfoide asociado a mucosas. En el bazo tiene lugar el inicio de la respuesta inmune que protege frente a antígenos presentes en la sangre, mientras que en los ganglios linfoides y en el tejido asociado a mucosas se desencadenan respuestas frente a antígenos que viajan por el sistema linfático [6-8]. Por otro lado, los órganos linfoides centrales o primarios, como el timo y la médula ósea, son aquellos donde los precursores de las células T y B adquieren la capacidad de reconocer a los antígenos, mediante la expresión de sus receptores específicos.

I. 2. Tráfico leucocitario

I. 2.1. Moléculas de adhesión

Los leucocitos pueden interactuar con componentes de la matriz extracelular (interacción célula-matriz) como así también con moléculas presentes en la membrana celular (interacción célula-célula), gracias a la expresión en su superficie de moléculas de adhesión.

Existen cinco familias de moléculas de adhesión: las integrinas, las selectinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), las cadherinas y las sialomucinas. Estas moléculas son responsables de la comunicación entre el exterior y el interior celular [9]. La interacción entre ellas y sus ligandos puede ser homofílica (se unen a moléculas pertenecientes a la misma familia) o heterofílica (interactúan con proteínas de diferentes familias) [10]. Dependiendo del tipo de moléculas involucradas en la interacción celular, el tiempo de duración de la misma varía provocando uniones estables o transitorias (**tabla I**) [11]. Las cadherinas median interacciones estables entre células en órganos, contribuyendo a la integridad estructural del cuerpo, en cambio las selectinas intervienen en la mayoría de las interacciones celulares transitorias [11].

Molécula de adhesión	Ligandos	Duración de la adhesión
Integrinas	Superfamilia de las Ig proteínas de matriz extracelular	estable y transitoria
Selectinas	Sialomucinas	transitoria
Superfamilia de las Ig	integrinas Superfamilia de las Ig sialomucinas	estable y transitoria
Cadherinas	Cadherinas	estable
Sialomucinas	Selectinas Superfamilia de las Ig	transitoria

Tabla I: Familias de moléculas de adhesión y sus ligandos[11].

Las **integrinas** son proteínas de membrana compuestas por un heterodímero de cadenas α y β unidas en forma no covalente. Esta última puede unirse a distintas subunidades α determinando diferentes subfamilias de integrinas. Además, una dada subunidad α puede asociarse con más de una cadena β . Las funciones de las integrinas dependen de la cantidad, afinidad y distribución de las mismas [12]. De esta forma una célula puede modificar sus propiedades adhesivas mediante la expresión selectiva o la modulación del estado de activación de las integrinas [13]. Entre los sustratos de las integrinas se encuentran las proteínas expresadas sobre la membrana celular y los componentes de la matriz extracelular [12-14]. Esta última consiste en una mezcla compleja de macromoléculas, que pueden agruparse en elementos formadores de fibras como colágeno (Col) y elastina; glicoproteínas como laminina (LM) y fibronectina (FN); y proteoglicanos [15].

Las **selectinas** son una familia de proteínas que median interacciones transitorias entre leucocitos, endotelio y plaquetas. Está compuesta por tres miembros: la L (leucocito)-selectina, expresada sólo por leucocitos, y que participa en la adhesión de los mismos a las células endoteliales; la E (endotelio)-selectina, presente sobre células endoteliales, media la adhesión de neutrófilos y monocitos a endotelio

Introducción

activado; y la P (plaqueta)-selectina que es expresada por células endoteliales y plaquetas, está involucrada en los mecanismos de formación del coagulo [16-18]. Los contrareceptores o ligandos para las selectinas son glicoconjugados específicos.

La **superfamilia de las inmunoglobulinas** son proteínas presentes en la superficie celular involucradas en el reconocimiento antigénico, en la unión a componentes del complemento y en la adhesión celular. Integran esta familia: CD4, CD8 presentes en linfocitos T; moléculas de adhesión intercelular ICAM-1 (CD54) e ICAM-2 (CD102) ampliamente distribuidas en células epiteliales, endoteliales, fibroblastos y leucocitos; molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1; CD106), presente en células endoteliales; moléculas de adhesión a células endoteliales y plaquetas-1 (PECAM-1; CD31), expresadas sobre células endoteliales, plaquetas y algunos leucocitos [16, 19]. Estas proteínas pueden establecer uniones homofílica o heterofílica. Los niveles de expresión de algunas de estas moléculas son regulados por citoquinas [16, 20].

Las **cadherinas** en su porción extracelular presentan un dominio de reconocimiento celular homofílico y en la porción intracelular presentan secuencias que interactúan con proteínas citoplasmáticas que unen a las cadherinas con la actina del citoesqueleto [21, 22]. Algunos de los miembros de esta familia son: la E-cadherina, expresada por células epiteliales y por células de Langerhans [23]; la N-cadherina presentes en neuronas, células musculares y endoteliales; la P-cadherina expresada principalmente en placenta y células epiteliales; la K-cadherina en riñón; la OB-cadherina en osteoblastos; y la VE-cadherinas en endotelio, localizándose estrictamente en las uniones intercelulares. Otros miembros de esta familia son las subfamilias de desmogleinas y desmocolinas que son cadherinas presentes en desmosomas [21, 22].

La familia de las **sialomucinas** esta compuesta por las moléculas GlyCAM-1, MadCAM-1 (adhesinas a mucosas), CD34 y PSGL-1 entre otras. Son proteínas altamente glicosiladas y esto les brinda la capacidad de interactuar con las selectinas presentes sobre leucocitos. Uno de los factores que contribuye a la aidez

Introducción

o a la afinidad de esta interacción es la estructura del carbohidrato presente sobre las sialomucinas. Por otro lado, la oligomerización del contrareceptor incrementa la adhesión aumentando el número de interacciones con los carbohidratos presentes en las sialomucinas [16, 19].

I. 2. 2. Cascada de adhesión y migración

La participación de las moléculas de adhesión en los mecanismos de adhesión y migración leucocitaria han sido bien caracterizados para linfocitos durante su recirculación a través de los órganos linfáticos secundarios, y para monocitos y polimorfonucleares durante la extravasación a tejidos periféricos inflamados [16]. Inicialmente ocurre una adhesión primaria transitoria entre los leucocitos y las células endoteliales. En el caso de los linfocitos vírgenes tiene lugar una interacción entre GlyCAM-1 presente sobre las células de las vénulas del endotelio alto en los órganos linfoides secundarios y la L-selectina expresada sobre el linfocito. Con respecto a los neutrófilos y monocitos las moléculas que participan en la interacción con el endotelio son P-, E-selectina presente sobre el endotelio vascular y la mucina PSGL-1 o CD15s expresada por los leucocitos. Este contacto inicial permite que algunas células rueden a lo largo de la pared endotelial. Además, la superficie de los leucocitos presenta microvellocidades las que probablemente inician el contacto con las células del endotelio. Esta interacción de baja afinidad es reversible a menos que los leucocitos se activen por la presencia de factores quimiotácticos como leucotrienos y fragmentos del complemento (C5a) [18], o por los productos liberados por el endotelio activado, como el factor activador de plaquetas (PAF), el CXCL8 y el factor quimiotáctico para monocitos-1 (MCP-1: CCL2) [18, 24]. Como consecuencia de la acción de estas moléculas, hay activación de las integrinas CD11a/CD18 (LFA-1) y CD11b/CD18 (Mac-1) leucocitarias, que se asocian al ligando ICAM-1 presente sobre el endotelio. Esta interacción provoca una adhesión más fuerte y de alta afinidad; los leucocitos cambian su forma y finalmente tiene lugar la migración a través de las uniones intercelulares endoteliales. Este proceso es mediado también por integrinas y por miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. En las

Introducción

fases tardías de la trans migración participarían otras moléculas presentes en el endotelio como CD31 y cadherinas (**figura 1 y tabla II**) [11, 18, 25-27].

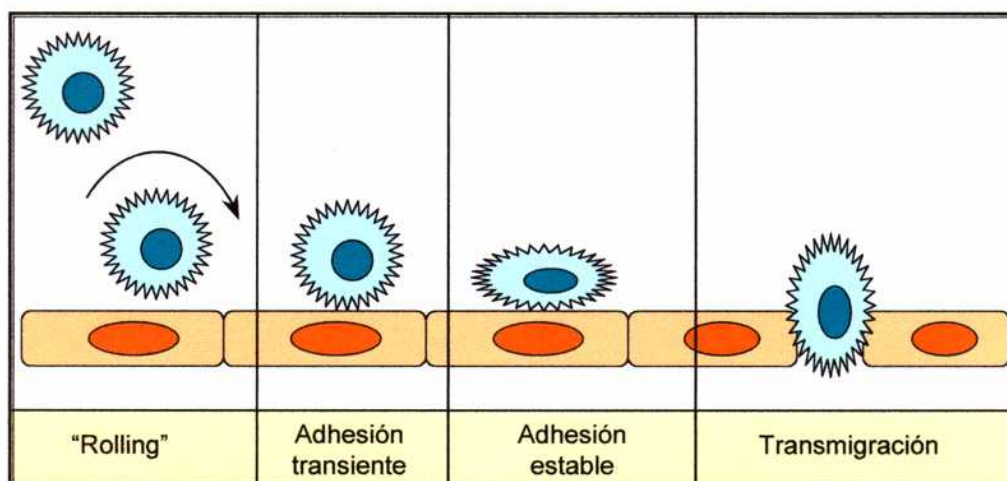


Figura 1: Adhesión y migración de leucocitos a través del endotelio. Los leucocitos sufren una primer adhesión transitoria, de baja afinidad al endotelio. Luego, en presencia de factores activadores, algunos de los leucocitos se adhieren con mayor fuerza y finalmente migran a través de las células endoteliales.

Adhesión transitoria		Activación	Adhesión estable		Migración	
leucocitos	endotelio		leucocitos	endotelio	leucocitos	endotelio
L-sel	GlyCAM ^a CD34	Leucotrienos C5a CXCL8 CCL2 PAF	LFA-1	ICAM-1	LFA-1	ICAM-1
CD15s PSGL-1	E-sel ^b		Mac-1	ICAM-1	$\alpha 4\beta 1$	VCAM-1
PSGL-1	P-sel		$\alpha 4\beta 1$	VCAM-1	$\alpha 4\beta 7$	MadCAM
$\alpha 4\beta 1$	VCAM-1		$\alpha 4\beta 7$	MadCAM	CD31	CD31
$\alpha 4\beta 7$	MadCAM ^c				cadherinas	cadherinas
selectinas integrinas sialomucinas		factores quimiotácticos	integrinas superfamilia de las Ig sialomucinas		integrinas superfamilia de las Ig cadherinas, sialomucinas	

Tabla II: Moléculas de adhesión involucradas en la cascada de adhesión y migración de leucocitos.

^a GlyCAM y CD34 presentes en vénulas de endotelio alto de órganos linfoides secundarios.

^b P-selectina y VCAM-1 se expresan luego de la activación del endotelio vascular.

^c MadCAM-1 se expresa a nivel del sistema linfóide asociado a mucosas.

Introducción

Es importante mencionar que la activación del endotelio por diversas citoquinas como el $TNF\alpha$ y la IL1 o por endotoxinas como los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram negativas, resulta en un aumento de la adhesión de leucocitos por la inducción de varias moléculas de adhesión sobre la superficie celular endotelial [14].

II. Las Células Dendríticas (DC)

II. 1. Características generales

Como se mencionó previamente, las células presentadoras de antígenos (CPA) participan en la inducción de la respuesta inmune adaptativa en los órganos linfáticos secundarios en un proceso que consta de tres etapas: 1) fase de reconocimiento: la CPA presenta antígenos a los linfocitos T con los que interactúan por medio de receptores específicos; 2) fase de activación y proliferación: una vez que los linfocitos T reconocen antígenos específicos y gracias a la participación de señales coestimuladoras (presentes en las CPA), se producen cambios moleculares que activan a estas células; 3) fase efectora: según el tipo de agente invasor, el sistema inmune genera una respuesta humoral o celular para eliminarlo [6-8].

Las CPA son una población de leucocitos con capacidad inmunoestimuladora que incluyen monocitos, macrófagos, linfocitos B y DC. Estas células presentan características comunes en cuanto a su habilidad para incorporar, procesar y presentar antígenos, aunque no todas tienen la misma capacidad presentadora [28]. Las DC son altamente especializadas y constituyen las CPA más eficientes para presentar antígenos a linfocitos T vírgenes durante una respuesta inmune primaria. Los monocitos, macrófagos y linfocitos B tienen débil capacidad presentadora durante una respuesta inmune primaria, sin embargo, son eficientes en la presentación de antígenos a linfocitos T de memoria durante la respuesta inmune secundaria. Además, de la alta eficiencia estimuladora de células T, las DC se caracterizan por los marcadores de superficie y por su morfología. Entre los marcadores que poseen se encuentran las moléculas MHC clase I y II, CD1a, CD1b y CD1c; y moléculas accesorias como CD40, CD44, CD80, CD86, CD11a, CD58 y CD54. La expresión de dichos marcadores depende del microambiente y del estado

Introducción

de maduración de las DC [28, 29]. La capacidad de estas células para expresar altos niveles de MHC y de moléculas accesorias, como así también la habilidad para generar señales coestimuladoras explicarían la eficiencia de las mismas en la presentación de antígenos exógenos a células T [30, 32]. En cuanto a la morfología, las DC son células redondas, de mayor tamaño que los linfocitos, con citoplasma granular y prolongaciones en la membrana externa (**figura 2**) [33].

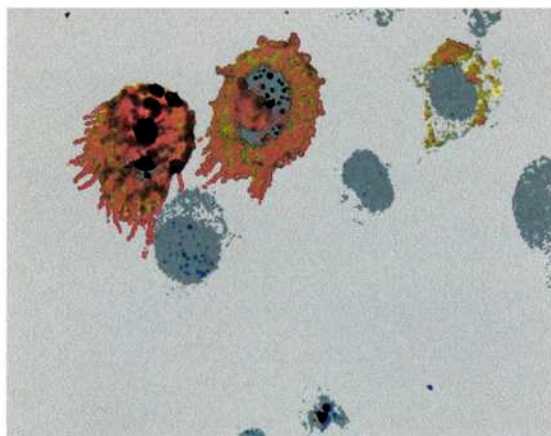


Figura 2: Morfología de las células dendríticas. Inmunoperoxidasa de un citopreparado de DC [33].

II. 2. La heterogeneidad de las DC

Existen diferentes subpoblaciones de DC que se diferencian en cuanto a su origen, fenotipo, función y localización. En los últimos años se ha demostrado que las DC no sólo pueden originarse a partir de un progenitor mieloide, sino que también pueden diferenciarse a partir de un precursor temprano de células T en timo [34] definiéndose un linaje de DC linfóide. Estas últimas expresan CD8 a diferencia de las DC de origen mieloide. Además, ambos tipos celulares difieren en su capacidad para producir IL12 y para inducir respuestas de células T (Th1 y Th2) [35, 34]. Recientemente, se demostró en ratón, que las DC $CD8^+$ (linfoides) inducen respuestas Th1, mientras que las $CD8^-$ (mieloides) favorecen respuestas de tipo Th2. Sin embargo, en humanos se ha observado que las DC de origen mieloide promueven repuestas tipo Th1, mientras que las linfoides inducen un perfil Th2 [35]. Otro hallazgo reciente fue que las DC de origen linfóide presentan poca actividad

Introducción

fagocítica y no se diferencian a macrófagos en presencia de los factores de crecimiento GM-CSF y M-CSF [36]. Es probable que ambas poblaciones celulares reconozcan y respondan a diferentes patógenos, modulando la respuesta inmune.

Dentro del linaje mieloide se distinguen dos tipos de DC, las intersticiales y las derivadas de células de Langerhans. Una de las diferencias principales entre ambas poblaciones es la ausencia de gránulos de Bierbeck (antígeno Lag) en las DC intersticiales. Además, estas últimas comparten algunos marcadores de superficie con los monocitos y macrófagos como MHC clase II, CD14⁺ y CD4⁺ sugiriendo que estas poblaciones están estrechamente relacionadas [28, 35]. Ambos tipos celulares pertenecerían a un linaje común que mediante un progenitor temprano origina DC y macrófagos [28]. En la **tabla III** se resumen algunas de las principales características de las poblaciones de DC.

Linaje	Linfoide	Mieloide	
		DC intersticiales	Langerhans cells
Precursor Fenotipo Producción de IFN α	CD11c ⁻ CD1a ⁻ IL3R ⁺ ++++	CD11c ⁺ CD1a ⁺ IL3R ⁻ --	CD11c ⁺ CD1a ⁺ IL3R ⁻ --
DC madura Fenotipo	CD11c ⁻ CD1a ⁻ IL3R ⁺ MHCII ⁺ CD11b ⁻ CD13 ⁻ CD33 ⁻ CD4 ⁺⁺ CD86 ⁺ CD40 ⁺ Gránulos de Birbeck ⁻	CD11c ⁺ CD1a ⁻ IL3R ⁻ MHCII ⁺ CD11b ⁺ CD13 ⁺ CD33 ⁺ CD4 ⁺ CD86 ⁺ CD40 ⁺ Gránulos de Birbeck ⁻	CD11c ⁺ CD1a ⁺ IL3R ⁻ MHCII ⁺ CD11b ⁺ CD13 ⁺ CD33 ⁺ CD4 ⁺ CD86 ⁺ CD40 ⁺ Gránulos de Birbeck ⁺
Localización	<i>Precursor</i> : sangre <i>DC madura</i> : zona T de órganos linfoides	<i>Precursor</i> : sangre <i>DC inmadura</i> : intersticios de tejidos <i>DC madura</i> : zona T de órganos linfoides	<i>Precursor</i> : sangre <i>DC inmadura</i> : epitelio <i>DC madura</i> : zona T de órganos linfoides
Función			
Secreción de IL12	+/-	++++	++++
Secreción de IL10	-	++++	+/-
Activación LT ^a CD4 ⁺	++	++++	++++
Activación LT CD8 ⁺	++	+++	++++
Interacción con LB ^b	¿?	++++	+

Tabla III: Poblaciones de DC humanas [35]. ^a LT: linfocitos T, ^b LB: linfocitos B

Introducción

II. 3. Generación de DC *in vitro*

En los últimos años se ha profundizado en el conocimiento de las DC para lo cual se han desarrollado diversas metodologías para la obtención de estas células *in vitro*. Este campo fue ampliamente explorado dada la importancia de las DC como herramienta para el tratamiento de diferentes patologías. Uno de los objetivos es mejorar las metodologías de cultivo, permitiendo una eficiente producción de DC. Se han descrito técnicas para su diferenciación, mantenimiento y expansión *in vitro* a partir de distintas fuentes. Entre ellas se encuentran los precursores CD34⁺ presentes en médula ósea y en sangre de cordón umbilical. También es posible obtener DC a partir de monocitos de sangre periférica, suplementando el medio de cultivo con GM-CSF e IL4; esta última inhibe la generación de macrófagos a partir de monocitos sanguíneos, los que a lo largo del cultivo generarán DC. Sin embargo, se ha demostrado que las células así obtenidas pueden revertir a un estado monocítico en ausencia de las citoquinas mencionadas [37]. Otras señales como el IFN γ pueden sinergizar el efecto de la IL4 y el GM-CSF para estimular la generación y la potencia funcional de las DC [28, 31, 38-40]. Dependiendo del precursor y de los factores utilizados para inducir su diferenciación y posterior maduración, se obtendrán poblaciones celulares específicas [28, 40-42]. En la **tabla IV** se enumeran los distintos protocolos empleados para la obtención de las diversas poblaciones de DC *in vitro*.

Población precursora	Inducción de la proliferación	Precursor intermediario	Inductor de la maduración	Población final
Monocitos de sangre periférica	GM-CSF IL4	DC inmadura	GM-CSF TNF α	DC mioide madura
	IL3 IL4		IL1 β IL6 TNF α PGE $_2$	DC linfoide madura
CD34 $^+$ de médula ósea CD34 $^+$ de sangre de cordón	GM-CSF TNF α	CD14 $^+$ CD1a $^-$	M-CSF	Macrófago
		CD14 $^-$ CD1a $^+$	GM-CSF TNF α	DC de órganos linfoides
CD34 $^+$ de médula ósea	GM-CSF TNF α		CD14 $^+$ CD11b $^+$	GM-CSF TNF α TGF β
		CD14 $^-$ CD11b $^+$	LC	
Monocitos de sangre periférica	GM-CSF IL4 TGF β	LC	GM-CSF IL1 TNF α	LC madura
DC de sangre periférica CD11c $^+$ CD1a $^-$				
CD34 $^+$ CD1a $^-$ de timo	IL7, TNF α SCF, Flt3-L			DC madura
CD34 $^+$ CD10 $^+$ Lin $^-$ de médula ósea	IL1, IL7, GM-CSF, SCF, Flt3-L			DC madura
CD34 $^+$ CD45RA $^-$ IL3R $^-$ de médula ósea	Flt3-L			DC linfoide
CD4 $^+$ CD11 $^-$ CD3 $^-$ IL3R $^+$ de amígdala	IL3			

Tabla IV: Principales caminos de diferenciación de DC humanas *in vitro*. Diferentes citoquinas son capaces de inducir la generación de DC a partir de un amplio rango de precursores [40].

^a LC: Langerhans cells

Introducción

II. 4. El rol de las DC en la respuesta inmune

Las DC juegan un papel crítico en la inducción de la respuesta de células T *in vivo* e *in vitro* [43]. Presentan antígenos propios durante el desarrollo de células T en timo y antígenos extraños durante una respuesta inmune [38]. Son capaces de controlar la calidad de la respuesta de los linfocitos T, induciendo su diferenciación hacia distintas clases de células efectoras. Esta adaptación de la respuesta en función del tipo de antígeno es clave para combatir las infecciones. Las DC también pueden inducir la generación de células T regulatorias que suprimen la actividad de otras células T activadas. Esto sería relevante para evitar enfermedades autoinmunes y el rechazo de trasplantes. Además del rol de las DC en la respuesta inmune adaptativa, estas células juegan un papel relevante en la inmunidad innata. Las DC activadas pueden producir gran cantidad de citoquinas como por ejemplo IL12 e interferones, y también pueden activar células NK. Todos estos factores participarían activamente en la eliminación del patógeno [44].

Las DC existen en tres estados de maduración, caracterizados por la función y el fenotipo celular. Inicialmente, se encuentran como una célula precursora inmadura en la circulación sanguínea. Luego, cuando este precursor coloniza los diferentes tejidos periféricos se diferencia a una DC inmadura capaz de capturar y procesar antígenos eficientemente, pero con poca capacidad activadora de células T. Estas DC expresan relativamente bajos niveles de moléculas MHC I y II y de moléculas coestimuladoras, pero presentan abundante síntesis de MHC II la cual se encuentra principalmente en los compartimentos endocíticos tardíos [44]. Finalmente, las DC inmaduras se convierten en células maduras. Este proceso se inicia luego de detectar productos microbianos o citoquinas proinflamatorias. Como resultado final de la maduración, las DC disminuyen su capacidad de procesamiento convirtiéndose en potentes CPA. Esta transición es acompañada por una reorganización citoplasmática, con redistribución de las moléculas MHC II desde los compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática. Además, aumenta la expresión de las moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86), de MHC I, de moléculas de adhesión (entre ellas CD48 y CD58) y se estimula la capacidad de las DC para generar complejos péptido-MHC II funcionales [45]. Simultáneamente, las células generan largas prolongaciones "dendríticas" en su membrana plasmática que aumentan la

Introducción

superficie de contacto con las células T. Estas DC también modifican el perfil de receptores de quimoquinas lo que permite su llegada a los órganos linfáticos secundarios [44]. Una vez localizadas en las zonas T-dependientes, estimulan a las células T vírgenes o de memoria. Existen evidencias que sugieren que el proceso de maduración se completa cuando las DC interactúan con células T, mediante la unión entre moléculas de superficie como por ejemplo CD40 ligando con CD40 y de citoquinas derivadas de células T como el $\text{IFN}\gamma$ [41, 46]. Estas DC maduras serán capaces de producir citoquinas como el $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ e IL12 [41, 46, 47].

La emigración de las DC desde los tejidos periféricos hacia los ganglios linfáticos es regulada por el microambiente celular. Este microambiente es capaz de modular la expresión de moléculas de adhesión [48], quimoquinas y sus receptores. Varias citoquinas estarían involucradas en la modulación de las moléculas de adhesión y de la migración.

Por lo tanto, las DC participan en las diferentes etapas que definen a la respuesta inmune adaptativa que consta de una serie de eventos muy bien regulados y complejos. El proceso en conjunto, dividido en forma arbitraria en tres etapas se esquematiza en la **figura 3**:

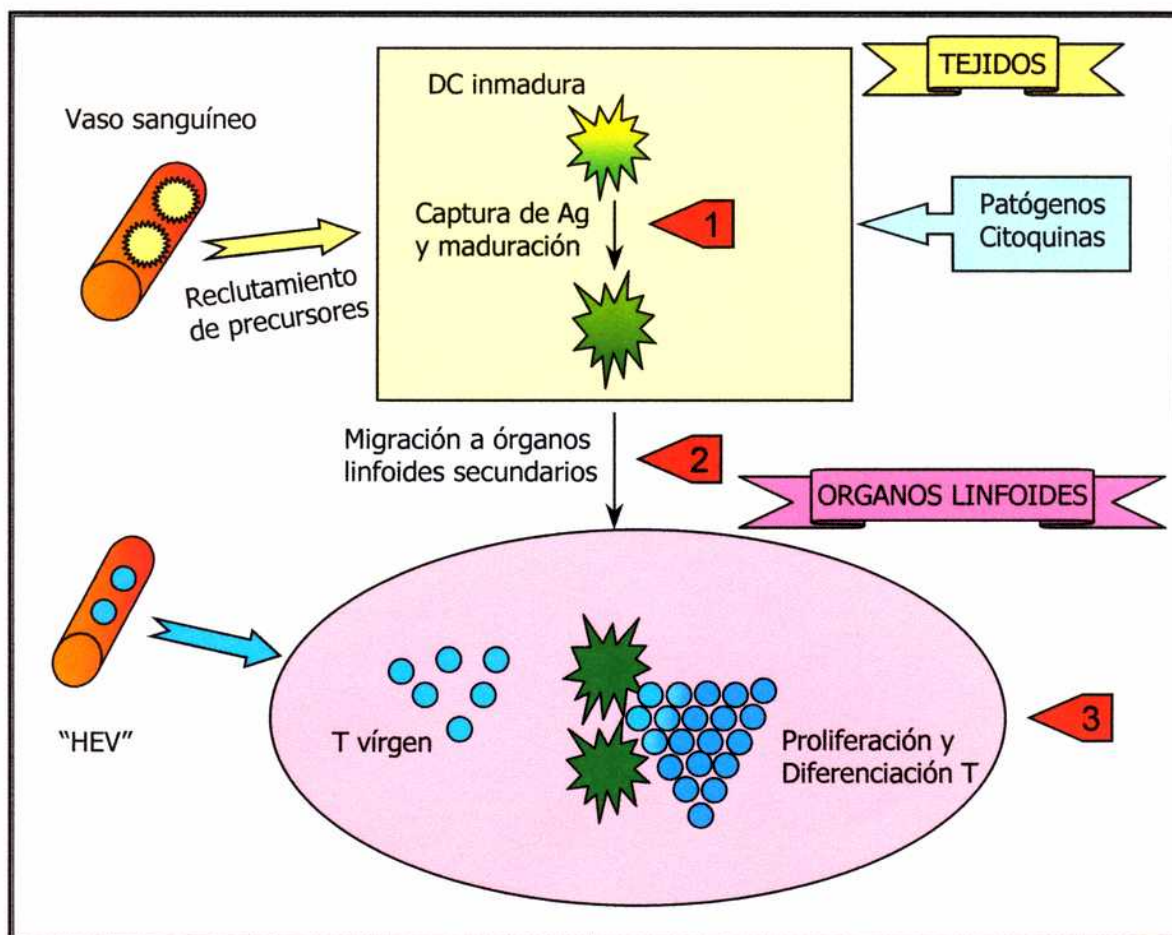


Figura 3: Participación de las DC en la respuesta inmune. Los precursores de las DC migran desde la circulación hacia los tejidos periféricos donde se diferencian. La maduración de las DC en respuesta a patógenos y citoquinas promueve su migración hacia los órganos linfoides drenantes, donde presentan a las células T altos niveles de complejos MHC-péptido y de moléculas coestimuladoras [49].

1) El paso inicial: captación de antígenos por las DC.

Las DC pueden captar un amplio rango de antígenos presentes en los tejidos periféricos y luego presentarlos a las células T como péptidos unidos a las moléculas MHC I y II [44, 49]. La variedad y el número de antígenos presentados por las DC depende de la eficiencia de captura y de la capacidad de las MHC para ser cargadas con los péptidos antigénicos. Las DC inmaduras muestran tres tipos de endocitosis: macropinocitosis, fagocitosis y endocitosis mediada por clatrina. La macropinocitosis y la fagocitosis son procesos relacionados ya que ambos dependen del ensamblado de actina del citoesqueleto. Durante la macropinocitosis, la célula incorpora grandes

volúmenes de fluido extracelular y de membrana plasmática, este proceso ocurre en forma constitutiva. La fagocitosis es inducida por la unión de partículas extracelulares a receptores de membrana. La ingestión de bacterias u otras partículas por fagocitosis es probablemente la forma fisiológica más relevante de captura de antígenos por las DC. Como se ha mencionado anteriormente, la maduración de las DC resulta en células con menor capacidad endocítica. Sin embargo, a pesar de la maduración, la formación de vesículas cubiertas de clatrina continua; por lo tanto las DC maduras no son completamente incapaces de endocitar antígenos [44]. La disminución de la endocitosis contribuye a mantener las MHC II en la membrana en las células maduras. A diferencia de otras CPA que degradan rápidamente las proteínas internalizadas, los lisosomas de las DC pueden secuestrar antígenos por períodos prolongados y luego presentarlos eficientemente [45]. Es importante mencionar que las DC pueden transferir los antígenos transportados desde periferia a otras DC residentes en ganglio. La transferencia podría ocurrir por fagocitosis de células portadoras de antígenos [50] o por liberación de vesículas conteniendo dichos antígenos (exosomas) [51].

2) La segunda etapa del proceso: migración de DC hacia los ganglios linfáticos secundarios

Las DC migran a través de la siguiente ruta: médula ósea, sangre, tejidos no linfoides, vasos linfáticos aferentes y órganos linfoides drenantes donde tienen una vida media de 2-4 días [36]. Durante la migración desde los tejidos hacia los órganos linfáticos secundarios, las DC sufren un proceso de maduración que culmina con la interacción con las células T residentes en los ganglios linfáticos. Como se ha mencionado previamente, la maduración de las DC, que se inicia como consecuencia del estímulo inflamatorio, regula la capacidad de captura, de procesamiento y presentación antigénica, como así también la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citoquinas [49].

En condiciones no inflamatorias, una pequeña fracción de DC residentes en los tejidos periféricos migra espontáneamente hacia los órganos linfoides drenantes, transportando antígenos y vesículas apoptóticas [52]. Existen evidencias de que este proceso sería el responsable de generar la tolerancia periférica [53].

Introducción

En condiciones inflamatorias, por ejemplo en presencia de un patógeno en un tejido periférico, las DC residentes son activadas en forma masiva y migran hacia los nudos linfoides regionales. Simultáneamente, hay reclutamiento de precursores desde la sangre hacia el tejido inflamado donde se diferencian rápidamente a DC capaces de captar antígenos. Luego maduran y migran hacia los órganos linfáticos secundarios, manteniendo los niveles de antígenos presentados a las células T por un período de tiempo prolongado. Las DC activadas producen gran cantidad de citoquinas proinflamatorias y quimoquinas necesarias para mantener el reclutamiento de los precursores. Además, aumentan la expresión del receptor para quimoquinas CCR7, el cual dirige la migración de las DC hacia los vasos linfáticos y luego hacia los ganglios linfáticos drenantes a través de su ligando CCL21 (6Ckine) y CCL19 (MIP3 β) [36, 49].

3) La etapa final: presentación de antígenos por DC a linfocitos T en los ganglios linfáticos periféricos

Para reconocer un antígeno, las células T deben establecer una unión estrecha con las CPA. El receptor T y las moléculas coestimuladoras se concentran en un área central rodeada por moléculas de adhesión accesorias. La estabilización de estos complejos esta regulada además por la secreción de citoquinas [29]. El tipo de señal que el linfocito T recibe depende de tres factores: 1) el nivel de complejos péptido-MHC que inician la señal, 2) el nivel de moléculas coestimuladoras que amplifican la señal, y 3) la estabilidad de la unión entre las células T y la CPA, que determinará el tiempo de duración de la interacción [49, 54]. La eficiencia de la respuesta varía con la naturaleza de la CPA y con el estado de la célula T. Las células T activadas, efectoras y de memoria responden rápidamente a bajas dosis de antígeno aún en ausencia de coestimulación, a diferencia de lo que ocurre en células T vírgenes. Sin embargo, estas últimas pueden ser activadas, en ausencia de señales coestimuladoras, por dosis extremadamente elevadas (no fisiológicas) de antígenos [49]. Bajo condiciones inflamatorias, el ganglio linfático periférico recibe por períodos de tiempos prolongados gran número de DC altamente estimuladas. La alta densidad de DC y el alto nivel de expresión de moléculas coestimuladoras y de antígeno inducen una fuerte y sostenida estimulación de células T específicas. Estas

Introducción

células rápidamente proliferan y se diferencian. La interacción DC-célula T resulta en una recíproca estimulación. En la cual la célula T activada estimula a las DC a través de CD40L, mejorando su capacidad estimuladora, la síntesis de IL12 y prolongando su vida media [49].

La producción de citoquinas está altamente regulada en las DC. Lo cual es particularmente relevante en el caso de la IL12, citoquina prototipo de polarización hacia el perfil Th1. Su producción es inducida por muchos patógenos [55] y durante la maduración celular su síntesis está regulada por otras citoquinas [56]. La secreción de IL12 está restringida a un corto período de tiempo (8-16 horas) luego de la inducción de la maduración [57]. Por lo tanto, la capacidad de las DC para inducir un perfil de respuesta Th1 depende de un gran número de variables que incluyen el microambiente, el estímulo madurativo y la cinética de maduración [49]. En consecuencia, las células T estimuladas por antígenos en presencia de IL12, sufrirán una diferenciación a células Th1, productoras de IFN γ . Además, como parte del proceso de diferenciación, los linfocitos T activados pierden los receptores para la localización en el ganglio linfático y adquieren la capacidad de migrar a tejidos no linfoides inflamados para ejecutar sus funciones efectoras [49]. En contraste, la polarización hacia respuestas Th2 está dirigida por la IL4 producida por células CD4⁺ o por NK1.1. Durante estadios tempranos de la respuesta inmune en los ganglios linfáticos existiría una tendencia preferencial a la polarización hacia respuestas de tipo Th1. Sin embargo, cuando el flujo de DC cesa y las DC sobrevivientes presentes en los órganos linfáticos secundarios dejan de producir IL12, se favorecería la diferenciación hacia células de tipo Th2 [49]. Por lo tanto, la capacidad de inducir respuestas Th2 es una propiedad de las DC que no producen citoquinas que polarizan a respuestas de tipo Th1. Con respecto a la activación de linfocitos T citotóxicos, las DC también son capaces de estimular a células T CD8⁺ antígeno específicas en ausencia de células T CD4⁺ o IL2 [58]. La obtención de una eficiente respuesta de células T citotóxicas, es uno de los objetivos que se persiguen en las terapias antitumorales basadas en el empleo de DC (ver más adelante).

Para ejemplificar lo descrito en esta sección, se puede mencionar el tráfico de las células de Langerhans. En primer lugar el precursor inmaduro procedente de médula

Introducción

ósea, llegaría a dermis vía sangre periférica y colonizaría la epidermis dando origen a las células de Langerhans. En la epidermis, en respuesta a un estímulo inflamatorio, las células maduran transformándose en una DC indeterminada capaz de migrar del epitelio hacia los vasos linfáticos de la dermis, tomando allí el nombre de célula velo. Estas por vía linfática acceden a los órganos linfoides periféricos donde se alojan en el área paracortical e interactúan con los linfocitos T. Las DC en el ganglio linfático reciben el nombre de DC interdigitadas [41, 58].

II. 5. El rol de las DC en la inducción de tolerancia periférica

Las DC son capaces de captar antígenos, aún aquellos contra los cuales no se induce una respuesta inmune. Estos incluyen proteínas del medio ambiente presentes crónicamente en las vías respiratorias y en el tracto digestivo [59], y también antígenos propios de diversos tejidos [52]. La captura de estos antígenos en un estado no inflamatorio, permite a las DC controlar la tolerancia frente a constituyentes propios normales y ambientales [44]. La capacidad de las DC de mediar activación o inhibición de la respuesta inmune esta regulada por la calidad y cantidad de estímulo inflamatorio recibido durante el proceso de maduración, que acopla la respuesta innata a la adaptativa y es clave en la diferenciación entre lo propio y no propio [44, 60]. La capacidad de formar complejos péptido-MHC en ausencia de un estímulo madurativo capaz de inducir cambios en los niveles de moléculas coestimuladoras y de receptores para quimoquinas, son claves para la inducción de tolerancia [44, 53]. Las DC inmaduras que captan antígenos propios bajo condiciones fisiológicas no maduran a una forma inmunogénica. Estudios recientes sugieren que estas células tienen la capacidad de promover la diferenciación de células $CD4^+$ y $CD8^+$ a células T productoras de IL10, la cual tiene un rol regulatorio supresor de la respuesta inmune [36].

II. 6. Señalización intracelular en DC: $TNF\alpha$ y AMPc

Las células de los diferentes tejidos están expuestas a factores del medio extracelular. El impacto de estas señales puede ser altamente específico como por ejemplo durante la interacción entre un ligando y su receptor celular, o bien

Introducción

inespecíficos como ocurre con las señales de estrés entre ellas la alta temperatura o las variaciones en la osmolaridad extracelular [61]. Durante un proceso inflamatorio son varios los estímulos que pueden actuar en forma específica sobre las células presentes en un foco inflamatorio, un claro ejemplo de esta interacción es la activación celular por las citoquinas proinflamatorias como el $TNF\alpha$ y la $IL1\beta$. Los receptores de las diversas señales pueden localizarse en la membrana o en el citoplasma celular y en general están asociados a pequeñas moléculas intracelulares que median entre el estímulo inicial y la respuesta funcional celular. Estas moléculas se conocen con el nombre de segundos mensajeros y están altamente regulados, por lo que pueden sufrir cambios rápidos en su concentración una vez activado el receptor. La consecuencia final de la transducción de la señal extracelular es la transcripción de genes codificantes para diversas proteínas [62].

El $TNF\alpha$ es una citoquina pleiotrópica que media sus funciones a través de dos receptores de membrana distintos presentes en la mayoría de las células nucleadas, el receptor de tipo I (RTNF I, p55 o CD120a) y el de tipo II (RTNF II, p75 o CD120b). Ambos son glicoproteínas con un único dominio transmembrana que pertenecen a una superfamilia de receptores entre los que se encuentran Fas (CD94/Apo1) y CD40, entre otros. Todos los miembros de esta familia presentan homología en sus dominios extracelulares, mientras que sus porciones citoplasmáticas son diferentes, sugiriendo que cada uno de ellos transmite señales distintas e independientes [63, 64]. Se han identificado varias proteínas capaces de asociarse al receptor de TNF implicadas en la transducción de la señal que finalmente conduce a la activación celular o la muerte por apoptosis. Algunas de estas proteínas son el factor de transcripción $NF-kB$, los factores asociados al receptor de TNF (TRAFs), la fosfolipasa C específica para fosfatidilcolina (que aumenta los niveles de diacilglicerol) y la fosfolipasa A_2 (que genera ácido araquidónico) [63, 64]. Las respuestas al $TNF\alpha$ pueden ser reguladas por diversos mecanismos, uno de ellos es la disminución en el nivel de receptores en membrana, mediante la internalización o el clivaje y posterior liberación en forma soluble [65].

Introducción

El AMPc es un nucleótido cíclico que funciona como segundo mensajero intracelular y que puede modular una variedad de procesos. El aumento del contenido de AMPc en células del sistema inmune, en general, conduce a la supresión de respuestas inflamatorias. Por ejemplo, en macrófagos estimulados con LPS, el aumento de AMPc por acción de la prostaglandina E₂ (PGE₂), suprime la liberación de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL1 e IL6) mientras que aumenta la producción de citoquinas antiinflamatorias como la IL10 [66]. En DC estimuladas con LPS, la PGE₂ induce una inhibición en la producción de IL12; sin embargo su liberación esta inducida cuando se estimula a las DC con PGE₂ y TNF α simultáneamente [67].

La modulación de los estímulos celulares tiene estrecha relación con las variaciones en el contenido del segundo mensajero. Las células pueden modificar el contenido de AMPc a través de la regulación de su síntesis a nivel de la adenilato ciclasa, de su secreción y/o de su degradación por la enzima fosfodiesterasa (PDE) [68]. Con respecto a esta última, existen 10 familias diferentes dentro de las cuales las PDE de tipo 3 y 4 son las isoformas predominantes en las células del sistema inmune [66, 69].

En términos generales existe escasa información acerca de la participación del AMPc como segundo mensajero en la estimulación por citoquinas proinflamatorias. Algunos de los estudios realizados describen su rol como mediador de la señalización iniciada por el TNF α en fibroblastos [70], en polimorfonucleares [68] y en endotelio [71].

II. 7. Inmunoterapia y DC

Sobre la base del rol central que las DC cumplen en la regulación de la inmunidad, se ha propuesto su utilización en terapias para el tratamiento de diversas patologías que involucran la respuesta de células T. Entre ellas podemos mencionar, rechazo de transplantes, alergia, autoinmunidad, infecciones, tumores, inmunodeficiencias. También se ha evaluado la utilización de DC para el desarrollo de vacunas. A continuación se detallan algunas de ellas.

Introducción

II. 7. 1. Tratamiento de cáncer

La interacción entre células tumorales y el sistema inmune del huésped es compleja e involucra varios tipos celulares y una variedad de mediadores. Muchos tumores humanos contienen epítopes inmunogénicos sobre la superficie celular que actúan como blanco para los mecanismos de defensa inmune. El resultado de la respuesta es variable, pudiendo generar rechazo inmune o inducir tolerancia. La inducción de tolerancia o falta de respuesta es habitual y puede deberse a: 1) una ineficiente presentación de los antígenos asociados al tumor; 2) un inadecuado procesamiento de los mismos; o 3) una falta de señales coestimuladoras a pesar de la presencia de antígenos tumorales, y de citoquinas [72]. *In vivo*, se observó que la potencia funcional de las DC puede estar estimulada o inhibida por distintas citoquinas producidas por la masa tumoral. Por ejemplo GM-CSF estimula la presentación antigénica por las células de Langerhans, mientras que el $TNF\alpha$ revierte este efecto. La $IL1\alpha$ y la $IL10$ también son capaces de inhibir la presentación de antígenos [46, 73, 74].

Se ha demostrado que la presentación diferencial de antígenos asociados a tumores por una CPA podría tener una importancia crítica para la inducción de inmunidad mediada por células T o para interrumpir la tolerancia tumoral. Una posible estrategia para inducir respuesta antitumoral es alterar células tumorales que son débilmente inmunogénicas para que sean capaces de presentar antígenos propios a las células T. Otra alternativa es la utilización de CPA para inducir inmunidad antitumoral. En este caso las DC tienen una función central en la generación y regulación de la inmunidad [72]. Algunas de las estrategias para la presentación de antígenos tumorales por DC son las siguientes: 1) exponer a las DC con los antígenos asociados al tumor [48]; empleando esta estrategia se observó la regresión de tumores cuando se inyectaron las DC por vía endovenosa o de forma intratumoral [72]; 2) exponer a las DC con partículas que contengan antígenos proteicos tumorales nativos o con bacterias modificadas para que expresen uno o más antígenos tumorales; ambos métodos desencadenan una respuesta de células T citotóxicas; 3) transfectar DC con genes codificantes de antígenos asociados al tumor o con RNA derivado de células tumorales; este procedimiento permite obtener gran cantidad de antígenos a partir de pequeños fragmentos tumorales; 5) *Introducción*

transfectar a las DC con genes codificantes para citoquinas; y 4) establecer quimeras inmunogénicas por fusión entre células tumorales y CPA obteniendo híbridos con la capacidad inmunogénica de las CPA y los antígenos tumorales [39, 43, 48, 75]. Por otro lado, la cotransfección de células tumorales con genes codificantes para IL2 y GM-CSF, indujo inmunidad específica contra tumores, como consecuencia de la estimulación de la función de las CPA. También la IL12 fue capaz de estimular la inmunidad antitumoral [76, 77].

Recientemente se están desarrollando protocolos clínicos para el tratamiento antitumoral, consistentes en inmunizar a pacientes con DC expuestas *ex vivo* con antígenos tumorales [39, 43, 48, 75, 78]. Esta potencial inmunoterapia se basa en la obtención de DC a partir de pacientes con cáncer, las que son expuestas *in vitro* a los antígenos derivados de la masa tumoral y finalmente administradas nuevamente al paciente [46]. El éxito de esta terapia depende de la generación de células T capaces de reaccionar específicamente con las células malignas. En este sentido, la presencia de altos niveles de moléculas coestimuladoras en las DC permitirá el desarrollo de una mejor respuesta inmune [39, 48, 58].

II. 7. 2. Tratamiento de enfermedades infecciosas, alergias y autoinmunidad

Las vacunas diseñadas a partir de DC presentan ventajas relevantes comparadas con las clásicas ya existentes. Las DC pueden estimular respuestas de células T CD4 y CD8, síntesis de anticuerpos y también pueden actuar a nivel de superficies mucosas donde. En contraste, muchas de las vacunas existentes son débiles estimuladoras de respuestas de células T CD8 y CD4 Th1. Por lo tanto, la eficiencia de las mismas se podría incrementar utilizando DC como presentadoras de los patógenos constituyentes de dichas vacunas [60]. Por otro lado, las DC también pueden inducir tolerancia, a partir de lo cual podrían diseñarse vacunas para prevenir respuestas alérgicas[60]. Una de las posibles estrategias empleadas sería inmunizar con células de Langerhans modificadas con haptenos e irradiadas con UV, resultando en un estado de tolerancia específica hacia ese hapteno [48].

Con respecto a las enfermedades autoinmunes, se ha observado que en muchas de ellas hay una exagerada activación de las DC [60]. Por lo tanto una apropiada

modulación fenotípica podría utilizarse para silenciar células T específicas para determinados péptidos propios [48].

En definitiva, dada la función central que cumplen las DC en la respuesta inmune, una correcta manipulación de las mismas permitirá establecer terapias apropiadas para diversas enfermedades.

Objetivos

El objetivo central de la tesis de doctorado fue caracterizar la interacción de las células dendríticas derivadas de monocitos (moDC) con otros tipos celulares y con las proteínas de matriz extracelular (MEC); los factores que regulan dicha interacción; y la capacidad de las moDC para inducir la proliferación de células T. En particular:

1. Obtener DC a partir de monocitos (moDC) de sangre periférica.
2. Caracterizar a las moDC morfológica, fenotípica y funcionalmente.
3. Estudiar la adhesión de moDC a células endoteliales y a proteínas de MEC, analizando y caracterizando las moléculas involucradas en dicha interacción.
4. Examinar la capacidad de migración de moDC a través de endotelio y fibronectina.
5. Evaluar el efecto de citoquinas ($TNF\alpha$ e $IL1\beta$) sobre la adhesión, migración y la capacidad inmunoestimuladora de las moDC.
6. Analizar el rol del AMPc como segundo mensajero en la transducción de señales del $TNF\alpha$ e $IL1\beta$ en moDC.
7. Estudiar el efecto de los cambios de la osmolaridad extracelular en la fisiología de las moDC.
8. Evaluar el rol de las moléculas coestimuladoras, en particular CD80, en la capacidad inmunoestimuladora de las moDC.

Objetivos

Materiales & métodos

1. Cultivos celulares

1. 1. Generación de células dendríticas

Las DC se generaron a partir de monocitos de sangre periférica (moDC) empleando la metodología descrita por Romani y colaboradores [38]. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos a través de un gradiente de Ficoll-Hypaque ($\delta = 1,077 \text{ g/cm}^3$, 2000 rpm durante 20 minutos). Las células mononucleares obtenidas se resuspendieron en RPMI 1640 (Gibco BRL, NY, USA) suplementado con 10 % suero humano (SH) o suero bovino fetal (SBF) (Gibco BRL, NY, USA), 2 mM L-glutamina (Gibco BRL, NY, USA) y 20 $\mu\text{g/ml}$ gentamicina. Posteriormente, las células mononucleares ($3-5 \times 10^6/\text{ml}$) se sembraron en placas de Petri (Falcon, New Jersey, USA) y se incubaron durante 2 horas a 37°C para permitir la adhesión de los monocitos. Luego se descartaron las células no adheridas (linfocitos), y a las adheridas (monocitos) se las incubó con RPMI 1640 suplementado con 10 % SH o SBF, 800 U/ml GM-CSF (Sigma Chemical Co., MO, USA), 500 U/ml IL4 (Sigma Chemical Co., MO, USA), 2 mM L-glutamina, 20 $\mu\text{g/ml}$ gentamicina y 50 μM 2-mercaptoetanol. Las células se cultivaron en estufa a 37°C en una atmósfera con 5% CO_2 durante 3-7 días. Cada 2 días se incorporó 1ml de medio de cultivo fresco suplementado con las citoquinas.

1. 2. Obtención de células endoteliales

Las células endoteliales fueron aisladas a partir de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) mediante tratamiento con colagenasa (Worthington Biochemical Corporation, New Jersey, USA) (0,5 mg/ml, 20 minutos a 37°C) según fue descrito previamente por Jaffe y colaboradores [79]. Posteriormente las células fueron cultivadas en RPMI 1640, 20% SBF, 2mM L-glutamina, 2-mercaptoetanol, piruvato de sodio, penicilina G/estreptomina, 45 $\mu\text{g/ml}$ heparina y 25 $\mu\text{g/ml}$ de suplemento de crecimiento para células endoteliales (Collaborative Research, Lexington, MA). Una vez que las células alcanzaron la confluencia, las mismas se utilizaron para los experimentos de adhesión. En algunos casos, las células endoteliales fueron tratadas con $\text{TNF}\alpha$ (100 ng/ml, 4 horas a 37°C) previo a los experimentos de adhesión.

Materiales & métodos

1. 3. Cultivo de células tumorales

La línea tumoral IIB-MEL-LES, suministrada por el Dr. Osvaldo Podhajcer, establecida a partir de melanoma metastásico [80], fue cultivada en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* suplementado con F-12 (D-MEM/F-12) (Sigma Chemical Co., MO, USA), 10% SBF (Gibco BRL, NY, USA), ácido ascórbico (17,6 mg/ml), ácido pirúvico (150 mg/ml), selenito (3,5 µg/l), galactosa (300 mg/ml), glutamina (2 mM), insulina (5 mg/l), penicilina (64 mg/ml) y estreptomycin (10 mg/ml). Una vez que las células alcanzaron la confluencia se utilizaron para los experimentos de adhesión.

2. Determinación de las moléculas en moDC por inmunomarcación

Las moDC obtenidas a partir de células mononucleares de sangre periférica fueron analizadas por inmunofluorescencia. La fluorescencia fue cuantificada por citometría de flujo mediante los citómetros FACStar^{plus} (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) y CYTORON (Ortho Diagnosis, NJ, USA). Las células muertas fueron excluidas por la incorporación de yoduro de propidio. El análisis de las muestras se llevó a cabo empleando el programa de computación "WinMDI versión 2.5". En algunos casos las muestras fueron analizadas por microscopía confocal empleando el microscopio Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany).

2. 1. Inmunofluorescencia simple indirecta

Las células se incubaron con suero normal de cabra, 30 minutos a 4°C para bloquear los receptores Fc de inmunoglobulinas. Luego se agregó un primer anticuerpo monoclonal ratón anti humano (2-10 µg/ml, 45 minutos a 4°C). A continuación las células fueron incubadas con un segundo anticuerpo (porción F(ab')₂) cabra contra ratón conjugado a R-Phicoertrina (R-PE) o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (DAKO Lab. A/S, Dinamarca), 45 minutos a 4°C. Luego de cada incubación se realizaron lavados con buffer fosfato (PBS), 0.02 % azida, 0.5 % albúmina sérica bovina. En los controles negativos el primer anticuerpo fue reemplazado por un anticuerpo monoclonal del mismo isotipo.

2. 2. Inmunofluorescencia doble

Se bloquearon los receptores Fc incubando la suspensión celular con suero normal de cabra, 30 minutos a 4°C. Luego se realizaron las siguientes incubaciones: 1) primer anticuerpo ratón anti humano, 45 minutos a 4°C; 2) segundo anticuerpo (porción F(ab')₂) cabra anti ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (DAKO Lab. A/S, Dinamarca), 45 minutos a 4°C; 3) suero normal de ratón (1/10), 45 minutos a 4°C, para bloquear posibles sitios libres de unión de inmunoglobulinas; 4) tercer anticuerpo ratón anti humano R-PE, 45 minutos a 4°C. Luego de cada incubación se realizaron lavados con PBS, 0.02 % azida, 0.5 % albúmina sérica bovina. En los controles negativos los anticuerpos anti humano fueron reemplazados por controles isotópicos.

2. 3. Inmunofluorescencia intracitoplasmática

Las células fueron fijadas con paraformaldehído (1 %, 20 minutos a temperatura ambiente). Posteriormente, se resuspendieron en buffer de permeabilización (PBS, 0.05 % saponina, 10 % SBF) y se incubaron con un anticuerpo ratón anti humano. Transcurridos 30 minutos se realizó un último lavado en buffer de permeabilización. En los controles negativos el anticuerpo fue reemplazado por un control isotópico. Para la determinación de IL12, las células fueron preincubadas con 10 µg/ml de brefeldina A (Sigma Chemical Co., MO, USA) durante 3 horas a 37°C previo a la marcación intracitoplasmática.

3. Capacidad endocítica de las moDC: captación de dextrán-FITC

Las moDC sometidas a diferentes tratamientos fueron incubadas con 2 mg/ml de dextrán-FITC (Molecular Probes, OR, USA) durante 60 minutos a 37°C o 4°C. Este último grupo fue utilizado como control negativo de la captación.

4. Capacidad inmunoestimuladora de moDC

4. 1. Respuesta alogénea (cultivo mixto linfocitario)

Preparación de células presentadoras: Las células presentadoras (moDC o mononucleares de sangre periférica) se resuspendieron en RPMI 1640, 10 % SH y 0.05 mg/ml de mitomicina c (30 minutos a 37°C) (Boehringer Mannheim, Mannheim, *Materiales & métodos*

Germany). Luego se lavaron con solución fisiológica y se resuspendieron en RPMI 1640, 10 % SH, 2 mM L-glutamina y 20 µg/ml gentamicina.

En algunos experimentos las moDC fueron previamente tratadas o no con 10-100 U/ml de TNF α (Sigma Chemical Co., MO, USA) durante 30 minutos a 37°C. En otros, se utilizaron como células presentadoras a las moDC recuperadas luego de un ensayo de adhesión a fibronectina.

Preparación de células respondedoras alogeneicas: En todos los casos se utilizaron como células respondedoras a las células mononucleares de sangre periférica obtenidas mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque, tal como fuera descrito en la sección 1.1.

Cultivo mixto leucocitario: Se realizaron en microplacas de cultivo de fondo en "U" (Falcon, New Jersey, USA), colocando 10.000-100.000 células presentadoras y 100.000 células respondedoras. Luego se cultivaron durante 5 días a 37°C en una atmósfera de 5 % CO₂. Transcurrido este período, a los cultivos se les incorporó 1 µCi/pozo de [³H]timidina (NENTM, Boston, MA, USA) y se incubó durante 18 horas. Luego las células fueron cosechadas y se analizó la proliferación celular midiendo la incorporación de [³H]timidina, empleando un contador de centelleo líquido (1214 BETARACK, Pharmacia, UK).

4. 2. Respuesta antígeno específica

Las moDC fueron incubadas con toxoide tetánico (TT, 1 µg/ml, 4 horas a 37°C) y posteriormente se trataron con mitomicina c (0.05 mg/ml, 30 minutos a 37°C) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Luego de ser resuspendidas en RPMI 1640, 10 % SH, 2 mM L-glutamina y 20 µg/ml gentamicina se enfrentaron con células mononucleares singeneicas (células respondedoras) en microplacas de cultivo de fondo en "U" (Falcon, New Jersey, USA) en una relación de 20.000 moDC a 100.000 células respondedoras. Luego de 4-7 días (37°C en una atmósfera de 5 % CO₂) a los cultivos se les incorporó 1 µCi/pozo de [³H]timidina (NENTM, Boston, MA, USA) y se incubó durante 18 horas. Posteriormente, las células se cosecharon y se analizó la proliferación celular tal como fuera descrito en la sección anterior.

Materiales & métodos

En algunos experimentos, para evaluar la participación de diferentes moléculas coestimuladoras en la respuesta antígeno específica, las moDC fueron preincubadas con anticuerpos monoclonales bloqueantes (20 $\mu\text{g/ml}$, 30 minutos a temperatura ambiente) y posteriormente estas células fueron enfrentadas a células mononucleares respondedoras singeneicas.

5. Estudio del mecanismo de adhesión

5. 1. Adhesión de moDC a proteínas de matriz extracelular (FN, LM, Col tipo IV)

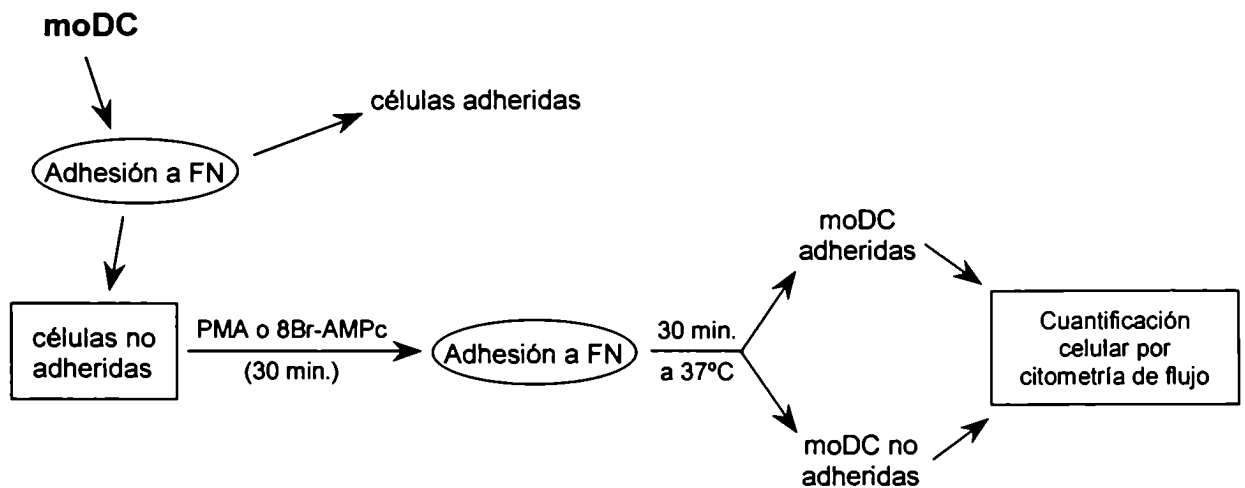
Los ensayos de adhesión de moDC a diferentes matrices se realizaron utilizando la metodología descrita por LeVarlet y colaboradores [81]. En microplacas de fondo plano se colocaron 30 $\mu\text{g/ml}$ de FN purificada a partir de plasma humano (Gibco, NY, USA), LM (Gibco, NY, USA) o Col tipo IV (Gibco, NY, USA) y se incubó durante 30-60 minutos a 37°C. Transcurrido este período, se retiró el excedente lavando con PBS y se bloquearon los sitios de unión inespecíficos incubando las microplacas con 10 mg/ml de albúmina sérica humana (HSA) (UNC Lab. de Hemoderivados, Córdoba, Argentina) en RPMI 1640. Posteriormente, sobre las microplacas cubiertas con las proteínas de MEC se agregaron $2-10 \times 10^4$ células, resuspendidas en RPMI 1640/HSA (2,5 mg/ml), y se incubó durante 30-190 minutos a 37°C en 5 % CO_2 . Luego se retiraron las células no adheridas realizando cuatro lavados con RPMI 1640; mientras que las células adheridas a las proteínas de MEC se despegaron utilizando una solución de 0,25 % tripsina (Gibco BRL, NY, USA) - 0,02 % EDTA (Farmitalia, Milán, Italia), neutralizando la tripsina con 10 % SBF.

En algunos casos, las moDC fueron tratadas con 10-1000 U/ml de $\text{TNF}\alpha$ (Sigma Chemical Co., MO, USA) o 10 ng/ml de $\text{IL1}\beta$ (Sigma Chemical Co., MO, USA) previo al ensayo de adhesión.

En algunos experimentos, luego de un primer ensayo de adhesión a FN, se recuperaron las células adheridas y no adheridas y se incubaron con "phorbol myristate acetate" (PMA, 1 ng/ml 30 minutos a temperatura ambiente) o análogos de AMPc (8Br-AMPc, 1 mM 30 minutos a 37°C). Posteriormente, estas células fueron colocadas nuevamente sobre microplacas de cultivo cubiertas con FN. Transcurridos 30 minutos se recuperaron las células adheridas y no adheridas y se cuantificaron por citometría de flujo.

Materiales & métodos

Este protocolo se esquematiza en el siguiente diagrama:



En aquellos experimentos donde se evaluó el efecto de la hiperosmolaridad sobre la adhesión de moDC a proteínas de MEC, se partió de las células adheridas a las diferentes matrices. Para lo cual, en primer lugar se realizó un ensayo de adhesión tal como fuera previamente descrito. Luego se descartaron las células no adheridas y sobre las adheridas se agregaron 50 μ l de los medios hiperosmolares **(1)**. Transcurridos 45 minutos a 37°C se recuperaron las moDC no adheridas y adheridas.

La cuantificación de las moDC adheridas y no adheridas se realizó utilizando el citómetro de flujo "CYTORON" (Ortho Diagnosis, NJ, USA) y el programa de computación "Absoluto". Este permite establecer regiones en base al tamaño (*forward scatter: FW-SC*) y a la granularidad (*side scatter: SSC* o *right angle scatter: RT-SC*) de las células. El análisis de las distintas regiones permite separar y cuantificar a células grandes y granulares que corresponden a las moDC, de las células pequeñas y poco granulares que definen a la población linfocitaria (**figura 1**). Es importante remarcar que estas regiones fueron inicialmente establecidas utilizando marcadores de superficie específicos de DC.

Materiales & métodos

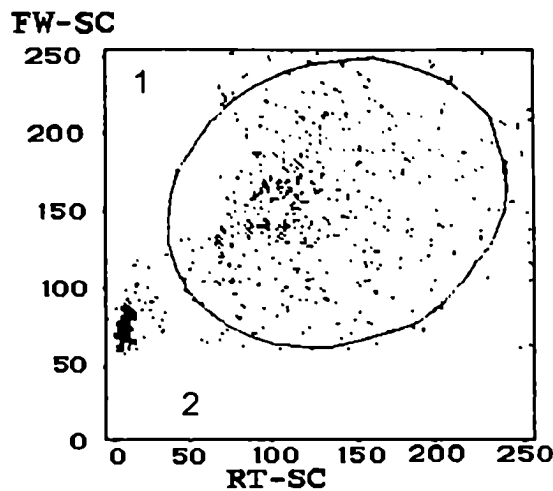


Figura 1: Gráfico obtenido por citometría de flujo. En el eje vertical está representado el tamaño celular (*FW-SC*), y en el horizontal la granularidad celular (*RT-SC*). Se pueden diferenciar dos poblaciones celulares: las moDC (1) y los linfocitos (2).

5. 2. Adhesión de moDC a células endoteliales de vena de cordón umbilical humano y a células tumorales

5. 2. 1. Purificación y marcación de moDC con [⁵¹Cr]

Las moDC y las células endoteliales presentan características similares en cuanto a su tamaño y granularidad, por lo que no fue posible realizar la cuantificación de la adhesión mediante citometría de flujo. Por tal motivo fue necesario utilizar una metodología alternativa en la cual se marcaron a las moDC con [⁵¹Cr]. Previamente a la marcación fue necesario obtener una población pura de moDC (libre de linfocitos). La purificación de las moDC se realizó mediante un gradiente discontinuo de Percoll (Sigma Chemical Co., MO, USA) y las células obtenidas se analizaron por citometría de flujo. Este análisis evidenció una población enriquecida en moDC sobre la interfase de 40 % de Percoll. Posteriormente estas moDC fueron marcadas con [⁵¹Cr] (25 μ Ci/ml) en buffer T1⁺ (2)/HSA (2,5 mg/ml). Luego de 30 minutos a 37°C las células fueron lavadas y resuspendidas en RPMI 1640/HSA (2,5 mg/ml) y a continuación se procedió al ensayo de adhesión.

5. 2. 2. Ensayo de adhesión

Los ensayos de adhesión de moDC se realizaron utilizando la metodología empleada por Srinivas y colaboradores [20]. Para lo cual, las células endoteliales o tumorales se cultivaron en microplacas de cultivo de fondo plano hasta que alcanzaron la confluencia. Luego se colocaron sobre la monocapa 5×10^4 ^{51}Cr -moDC resuspendidas en RPMI 1640/HSA (2,5 mg/ml). Transcurridos 60 minutos a 37°C se descartaron las células no adheridas y las células adheridas fueron lisadas. El contenido de cada pozo se recuperó y se cuantificó en un contador gamma (LKB Wallac 1272 Clingamma, Pharmacia, UK). En algunos ensayos, las moDC fueron tratadas con 1000 U/ml de $\text{TNF}\alpha$ (Sigma Chemical Co., MO, USA) o 10 ng/ml de $\text{IL1}\beta$ (Sigma Chemical Co., MO, USA) previo al ensayo de adhesión.

5. 3. Bloqueo de la adhesión

Para estudiar el tipo de moléculas involucradas en el mecanismo de adhesión de moDC a matriz extracelular, se emplearon anticuerpos bloqueantes para distintas moléculas de adhesión. Las moDC, resuspendidas en RPMI 1640/HSA (2,5 mg/ml), se preincubaron con los diferentes anticuerpos (20 $\mu\text{g/ml}$, 30 minutos a temperatura ambiente) y se colocaron en microplacas de cultivo cubiertas con las proteínas de MEC o con HUVEC.

6. Estudio del mecanismo de migración

Para estudiar la migración de moDC se emplearon cámaras de Boyden modificadas con filtros de policarbonato de 5 μm de diámetro de poro (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA), en los que se sembraron células endoteliales (2×10^4 células/filtro) o FN (30 $\mu\text{g/ml}$) como fuera previamente descrito [82]. Los filtros definen dos compartimentos, uno superior donde se siembran las células que luego migrarán y otro inferior donde se localizarán las células que han podido migrar.

Las células migradas recuperadas del compartimento inferior de la cámara de migración fueron cuantificadas por medio de un citómetro de flujo "CYTORON" (Ortho Diagnosis, NJ, USA) utilizando el programa de computación "Absoluto", tal como fuera previamente detallado en la sección 5.1.

Materiales & métodos

6. 1. Migración transendotelial de moDC

En algunos experimentos las monocapas de HUVEC fueron estimuladas con $\text{TNF}\alpha$ (100 U/ml, 4 horas a 37°C). Luego de la incubación con la citoquina, los filtros fueron suavemente lavados con RPMI 1640. Posteriormente, se agregaron moDC ($5\text{-}10 \times 10^5$ células/ml) sobre el endotelio, y 0,6 ml de RPMI 1640/HSA (2.5 mg/ml) en el compartimento inferior. Luego de 60 minutos de incubación se detuvo la migración retirando el filtro y se procedió a la cuantificación de las moDC presentes en el compartimento inferior (células migradas).

6. 2. Migración de moDC a través de fibronectina

Se cubrieron los filtros con FN (30 $\mu\text{g/ml}$, 30 minutos a 37°C). Luego de bloquear los sitios de unión inespecíficos con HSA (10 mg/ml) se colocaron las moDC ($5\text{-}10 \times 10^4$ células) en el compartimento superior y en el inferior 0,6 ml de RPMI 1640/HSA (2.5 mg/ml). Luego de 60 minutos a 37°C se colocó $\text{TNF}\alpha$ (100 U/ml) en el compartimento inferior incubándose durante 2 horas más a 37°C. Transcurrido este período, se detuvo la migración retirando el filtro, y se cuantificaron las moDC migradas.

7. Cuantificación de AMPc intracelular

Para cuantificar los niveles de AMPc se realizó un radioinmunoensayo (RIA). Para lo cual el pellet de las moDC tratadas o no con $\text{TNF}\alpha$ (10-1000 U/ml, 30 minutos a 37°C) en presencia o ausencia de 3-isobutil-1-metixantina (IBMX, 0.5 mM) fue resuspendido en agua destilada y hervido durante 2 minutos. Luego se centrifugaron a 5000g durante 5 minutos a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con anhídrido acético/trietilamina y los productos obtenidos fueron incubados 12 horas a 4°C con [^{125}I]-AMPc (15000-20000 dpm, actividad específica 140 mCi/mmol) y con un antisuero de conejo (1:5000). Luego de agregar 2 ml de etanol con 2% de albúmina sérica bovina, los complejos antígeno-anticuerpo fueron precipitados por centrifugación a 2000g durante 3 minutos y los sobrenadantes fueron recuperados por aspiración y cuantificados en un contador gamma (LKB Wallac 1272 Clinygama, Pharmacia, UK).

Materiales & métodos

8. Detección de apoptosis

Para determinar la viabilidad celular se realizó una marcación con Anexina V conjugada a FITC (Oncogen Research Products, MA, USA) según el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, luego de lavar con PBS las células se incubaron con Anexina V-FITC (0,5 µg/ml, 15 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad). A continuación se les agregó yoduro de propidio e inmediatamente se analizaron por citometría de flujo.

9. Determinación de IFN γ

Para cuantificar IFN γ se realizó un ELISA sándwich empleando un anticuerpo de captura (2 µg/ml, 16 horas a 4°C) y otro de detección biotinilado (0.5 µg/ml, 1 hora a temperatura ambiente). A continuación se incubó con avidina conjugada a peroxidasa (0.4 µg/ml, 30 minutos a temperatura ambiente. ImmunoPure Streptavidin, Horseradish Peroxidase Conjugated, Pierce, USA) y se reveló utilizando *o*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Gibco BRL, NY, USA). La reacción se detuvo con una solución de H₂SO₄ 4 N y la densidad óptica se leyó a 492 nm mediante un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS). La curva estándar se realizó haciendo diluciones seriadas de IFN γ recombinante humano (Endogen, MA, USA). La determinación de IFN γ se realizó en los sobrenadantes de los cultivos de respuesta antígeno específica, recuperados a los 4-7 días de cultivo previo a la incorporación de [³H]timidina.

10. Determinación de IL10

Las moDC se incubaron con soluciones hiperosmolares (460 y 580 mOsm, 60 minutos a 37°C). Luego se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo completo para moDC, colocándose 5x10⁶ células/ml en microplacas de cultivo durante 48 horas a 37°C. Transcurrido este período se recuperó el sobrenadante libre de células y se lo utilizó para la cuantificación de IL10 mediante un ELISA sándwich, utilizando un anticuerpo de captura (2 µg/ml, 16 horas a 4°C) y otro de detección biotinilado (0.5 µg/ml, 1 hora a temperatura ambiente). A continuación se incubó con avidina conjugada a peroxidasa (0.4 µg/ml, 30 minutos a temperatura

Materiales & métodos

ambiente. ImmunoPure Streptavidin, Horseradish Peroxidase Conjugated, Pierce, USA) y se reveló utilizando *o*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Gibco BRL, NY, USA). La reacción se detuvo con una solución 4 N de H₂SO₄ y la densidad óptica se leyó a 492 nm mediante un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS). La curva estándar se realizó haciendo diluciones seriadas de la citoquina recombinante (IL10 Endogen, MA, USA).

11. Determinación de IL12

Para la medición de IL12 se emplearon tres técnicas distintas, marcación intracitoplasmática, ELISA y *Western blot*.

11. 1. Marcación intracitoplasmática

Se utilizó el protocolo descrito en la sección 2.3, destacando que las moDC fueron incubadas con 10 µg/ml de brefeldina A (Sigma Chemical Co., MO, USA) durante 3 horas a 37°C previo a la marcación. Para la misma se empleó un anticuerpo anti IL12 conjugado a R-PE (B-P24, ImmunoQuality Products, Groningen, The Netherlands).

11. 2. ELISA

La cuantificación de la citoquina por ELISA se realizó sobre moDC tratadas de la siguiente manera: las células fueron activadas con 100 ng/ml de LPS (obtenido a partir de *E. Coli* 0111:B4, Sigma Chemical Co., MO, USA) durante 2 horas a 37°C y a continuación incubadas con soluciones hiperosmolares (460 y 580 mOsm, 60 minutos a 37°C) a las que también se les agregó LPS. Posteriormente, las células se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo completo para moDC. Finalmente se colocaron 5x10⁶ células/ml en microplacas de cultivo durante 48 horas a 37°C en medio de cultivo suplementado con LPS (100 ng/ml) e IFN γ (7.5 ng/ml). Transcurrido este período se recuperaron los sobrenadantes libres de células y se los utilizó para realizar la cuantificación mediante un ELISA sándwich. Para lo cual se utilizó un anticuerpo de captura (1/250, 16 horas a 4°C) y otro de detección biotinilado (1/250, 2 horas a temperatura ambiente). A continuación se incubó con avidina conjugada a peroxidasa (0.4 µg/ml, 90 minutos a temperatura ambiente. ImmunoPure

Materiales & métodos

Streptavidin, Horseradish Peroxidase Conjugated, Pierce, USA) y se reveló utilizando *o-phenylenediamine dihydrochloride* (OPD) (Gibco BRL, NY, USA). La reacción se detuvo con una solución 4 N de H₂SO₄ y la densidad óptica se leyó a 492 nm mediante un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS). La curva estándar se realizó haciendo diluciones seriadas de la citoquina recombinante (IL12 p70, PharMingen, CA, USA).

11. 3. Western blot

Las moDC se trataron con LPS (100 ng/ml, 2 horas a 37°C) y luego fueron sometidas a un aumento de la osmolaridad extracelular (460 y 580 mOsm, 60 minutos a 37°C) en presencia de LPS. Posteriormente se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo completo para moDC suplementado con LPS (100 ng/ml), IFN γ (7.5 ng/ml) y brefeldina A (10 μ g/ml) y se incubaron durante 16 horas a 37°C. A continuación las muestras fueron procesadas para la obtención de un extracto proteico. Para lo cual, luego de realizar dos lavados con solución fisiológica, el pellet celular fue incubado 30 minutos a 4°C con buffer de lisis [\(3\)](#) y posteriormente centrifugado 15 minutos a 12.000 rpm a 4°C. Finalmente se recuperaron los sobrenadantes y se los congeló a -70°C hasta su utilización. Para la separación electroforética de proteínas, las muestras fueron sembradas en un gel de acrilamida/bisacrilamida 10 % y corridas durante 60 minutos a 150 V. La transferencia de las proteínas a una membrana de PDVF se realizó a 250 mA durante 105 minutos. Una vez transferidas las muestras, la membrana de PDVF se incubó a 4°C durante toda la noche con un primer anticuerpo ratón anti humano para la subunidad p40 de la IL12 (Santa Cruz Biotechnology, USA). Luego se agregó un segundo anticuerpo cabra anti ratón conjugado a peroxidasa (Jackson Immuno Research Lab, PA, USA) durante 60 minutos a 37°C. Finalmente se reveló con reactivo para quimioluminiscencia (ECL Western Analysis, Amersham Pharmacia, UK).

12. Análisis de resultados

12. 1. Porcentaje de células adheridas

⇒ Para la adhesión a proteínas de MEC:

$$\% \text{ de moDC adheridas} = \frac{\text{n}^\circ \text{ moDC adheridas a MEC}}{\text{n}^\circ \text{ moDC colocadas}} \times 100$$

⇒ Para la adhesión a HUVEC:

$$\% \text{ de moDC adheridas} = \frac{\text{cpm adheridas a HUVEC}}{\text{cpm colocadas}} \times 100$$

12. 2. Porcentaje de incremento en la adhesión

$$\% \text{ de incremento} = \frac{(\% \text{ adhesión a la matriz} - \% \text{ adhesión sin matriz})}{\% \text{ adhesión a la matriz}} \times 100$$

12. 3. Porcentaje de inhibición de la adhesión

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\% \text{ moDC adheridas control} - \% \text{ moDC adheridas tratadas})}{\% \text{ moDC adheridas}} \times 100$$

12. 4. Porcentaje de moDC migradas

$$\% \text{ de células migradas} = \frac{\text{n}^\circ \text{ moDC en el compartimento inferior de la cámara}}{\text{n}^\circ \text{ moDC colocadas}} \times 100$$

13. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) y para la comparación entre medias se utilizaron los tests de Student Newman Kules, Dunnett, Bonferroni o el *t* test para muestras pareadas. Se

Materiales & métodos

consideró como significativo un valor $p < 0.05$ (*) (Φ), y como altamente significativo los valores de $p < 0.01$ (**).

14. Anticuerpos monoclonales empleados

Nombre	Especificidad	Isotipo	Especie	Procedencia
Marcadores de DC:				
W6/32	MHC clase I	IgG2a	ratón	ATCC
HB-55	HLA-DR	IgG2a	"	"
NA-134	CD1a	IgG2a	"	(a)
MHCD1a	CD1a-R-PE	IgG2a	"	DAKO
NU-72	CD1b	IgG1	"	(a)
WM25	CD1b	IgG1	"	(a)
L161	CD1c	IgG1	"	(a)
TÜK4	CD14	IgG2a	"	DAKO
TÜK4	CD14-R-PE	IgG2a	"	"
HB15e	CD83	IgG1	"	PharMingen
Moléculas coestimuladoras:				
Dae-1	CD80	IgG1		(b)
BB1	CD80	IgM		PharMingen
BU63	CD86	IgG1		(b)
FUN-1	CD86	IgG1k		PharMingen
Moléculas de adhesión:				
TS1/18	CD18 (β 2 integrina)	IgG1		ATCC
Lia 1/2	CD29 (β 1 integrina)	IgG1		(b)
ASC-5	CD49c (α 3 integrina)	IgG1		(b)
HP2/1	CD49d (α 4 integrina)	IgG1		Immunotech
VC5	CD49e (α 5 integrina)	IgG1k		(b)
SAM1	CD49e (α 5 integrina)	IgG2b		Immunotech
4F10	CD49f (α 6 integrina)	IgG2b		(b)
84H10	CD54 (ICAM-1)	IgG1		Immunotech
2B3	CD31 (PECAM-1)	IgG1		(c)
Receptores para quimoquinas:				
2D7	CCR5	IgG2a		PharMingen
3D12	CCR7	IgG2a		(d)
Receptores de TNFα:				
htr9	RTNF I	IgG1	ratón	(b)
utr1	RTNF II	IgG1	"	(b)

Materiales & métodos

Citoquinas:

2G1	IFN γ captura	IgG1,k	ratón	Endogen
B133.5	IFN γ detección	IgG1,k	"	"
9D7	IL10 captura	IgG1	rata	Endogen
12G8	IL10 detección	IgG2a	"	"
20C2	IL12 captura	IgG1	"	PharMingen
C8.6	IL12 detección	IgG1	ratón	"
B-P24	IL12-R-PE	IgG1	"	IQ Products

Controles isotípicos:

IgG1	ratón	DAKO
IgG2a	"	"
IgG2a-R-PE	"	"
IgG2b	"	"

- (a) Vth International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshop (Boston, 1993)
 (b) VIth International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshop (Tokio, 1996)
 (c) Provisto por el Dr. Ramón Vilella, España.
 (d) Provisto por el Dr. Martín Lipp, MDC, Berlín.

15. Soluciones utilizadas**(1) Soluciones hiperosmolares:**

5 mM KCl

2.5 mM CaCl₂1 mM MgCl₂

5.6 mM glucosa

concentraciones variables de NaCl: 140 mM para una osmolaridad de 280 mOsm, 230 mM para 460 mOsm y 290 mM para 580 mOsm.

Los valores de osmolaridad de las diferentes soluciones se midieron con un osmómetro (μ OSMETTETM, Precision System).

(2) Buffer T1^o (Tyrode's solution):10 % buffer T10^o, pH 7,4*Materiales & métodos*

Buffer T10⁺:

8 % NaCl

0.2 % KCl

0.05 % NaH₂PO₄.H₂O

1 % NaHCO₃

1 % glucosa

(3) Buffer de lisis:

50 mM Tris-HCl pH 7,4

150 mM NaCl

1% NP-40

10 mM EDTA

10 µg/ml de los inhibidores de proteasas (Sigma Chemical Co., MO, USA):
aprotinina, leupeptina, pefabloc, pepstatina y bestatina.

Resultados

I. Caracterización de las células dendríticas derivadas de monocitos (moDC) obtenidas en cultivo:

Las DC se caracterizan por su morfología, por la expresión de marcadores de superficie y por su capacidad para generar una potente respuesta proliferativa de células T. En primer lugar se analizaron las características fenotípicas de las células obtenidas *in vitro* a partir de monocitos humanos de sangre periférica cultivados en presencia de GM-CSF e IL4. En la **tabla I** se puede observar que al tercer día de incubación con las citoquinas, las células comienzan a expresar la molécula CD1b (resultados similares se obtuvieron para CD1a y CD1c), aumentan los niveles de HLA-DR y CD86, y disminuyen la expresión de CD14 comparadas con los monocitos. El cambio en el porcentaje de expresión de CD14 fue más pronunciado al quinto día de cultivo con respecto al tercer día. En la **figura 1** se puede observar la intensidad de fluorescencia media (IFM) para cada molécula. Como se describió para el porcentaje de expresión en la tabla I, al quinto día de cultivo las moDC mostraron una mayor IFM para HLA-DR, CD1b y CD86, mientras que fue menor para CD14 comparadas con los monocitos. El fenotipo obtenido para estas células se corresponde con lo previamente descrito por otros autores [83, 84]. Sin embargo, el análisis de la expresión de otra molécula coestimuladora como CD80, mostró cierta discrepancia ya que estas células no expresaron dicha molécula sobre la superficie celular.

Células	Monocitos	moDC	
Tiempo de cultivo (días)	0	3	5
HLA-DR	63	96	94
CD14	87	42	13
CD1b	3	48	51
CD86	60	94	91
CD80	0	9	4

Tabla I: Porcentaje de expresión de moléculas de superficie en monocitos y moDC generadas en presencia de GM-CSF e IL4. Se representan las diferencias en el porcentaje de fluorescencia para cada marcador con respecto al control negativo.

Resultados

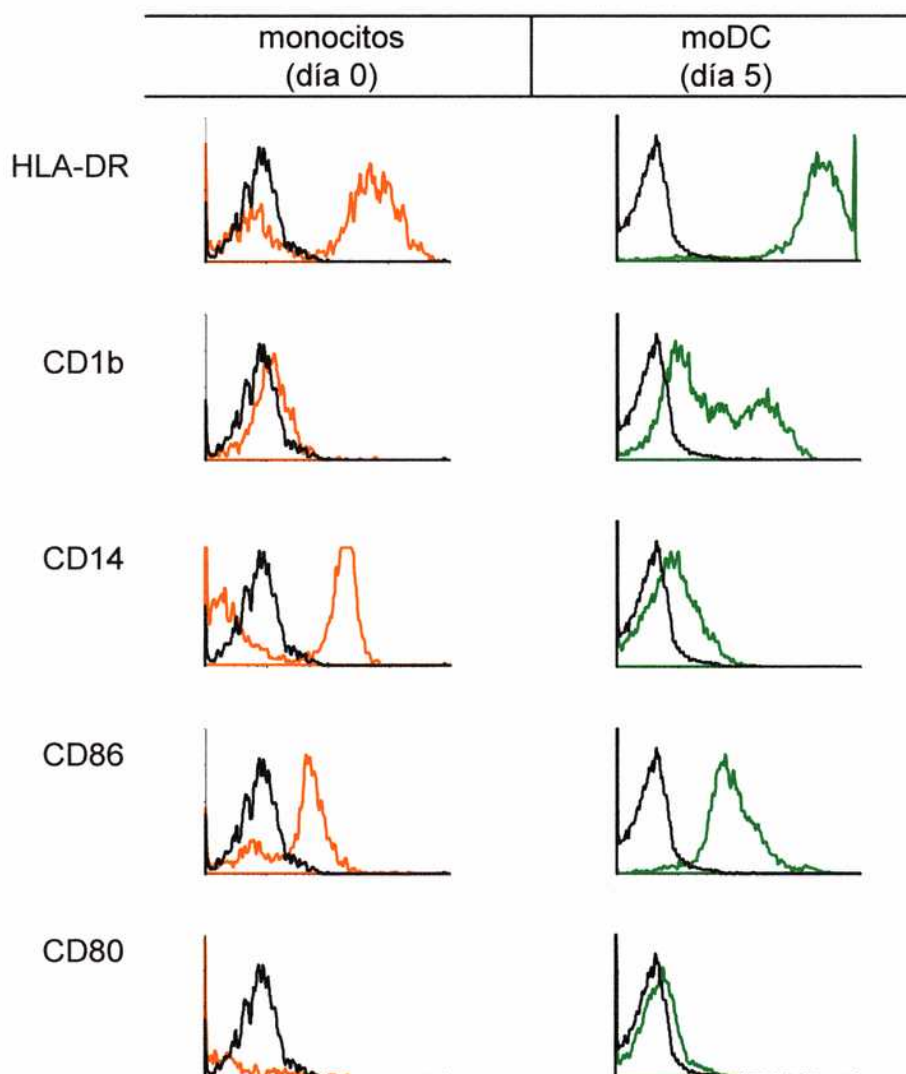


Figura 1: Fenotipo de monocitos y moDC. Los monocitos fueron cultivados durante 5 días con GM-CSF e IL4. Se realizó una inmunofluorescencia simple y una doble (según se describe en materiales y métodos) para moDC y monocitos, respectivamente. En los histogramas se representa en el eje "x" el logaritmo de la intensidad de fluorescencia y en el "y" el número de células. Cada gráfico muestra el marcador analizado (línea coloreada) superpuesta con el control negativo correspondiente (línea negra). La fluorescencia de cada muestra fue analizada por citometría de flujo, excluyendo a las células muertas con yoduro de propidio.

Morfológicamente estas células presentan un tamaño mayor comparadas con los linfocitos y contienen un citoplasma granular con microvellocidades en la membrana celular, algunas de ellas forman agregados con los linfocitos presentes en el cultivo. Es importante remarcar que una de las principales características diferenciales entre

Resultados

monocitos y moDC es su capacidad de adhesión al plástico. Los monocitos cultivados en presencia de GM-CSF e IL4 perdieron las propiedades adhesivas transformándose en células no adherentes con la morfología descrita anteriormente, típica de las DC (**figura 2**).

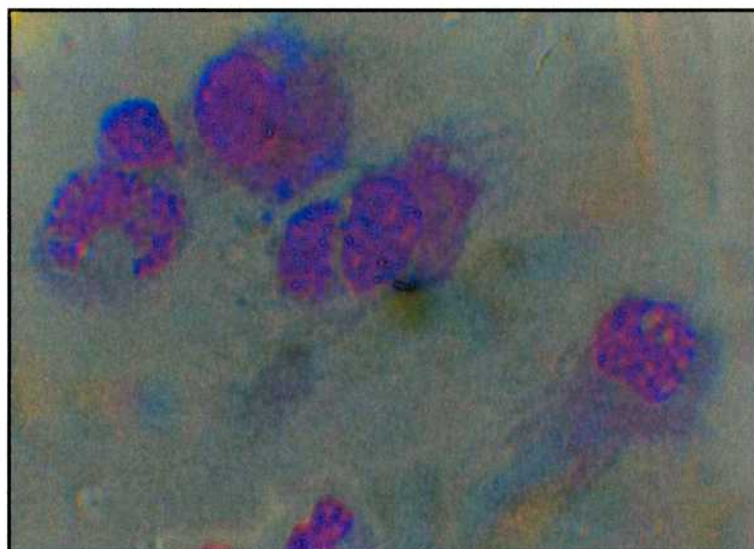


Figura 2: DC derivadas de monocitos. Monocitos cultivados durante 7 días en presencia de suero humano, GM-CSF e IL4 fueron teñidos con hematoxilina eosina (1000X).

Por último, se analizó la capacidad inmunoestimuladora de las moDC. Para lo cual se realizó un cultivo mixto leucocitario, utilizando a las moDC como células presentadoras y a las células mononucleares de sangre periférica alogeneicas como células respondedoras. En la **figura 3** se observa que las moDC fueron capaces de inducir una mayor proliferación de células T respondedoras comparadas con la proliferación inducida por concentraciones diez veces superiores de otras células presentadoras de antígenos (en este caso particular fueron células mononucleares de sangre periférica).

Resultados

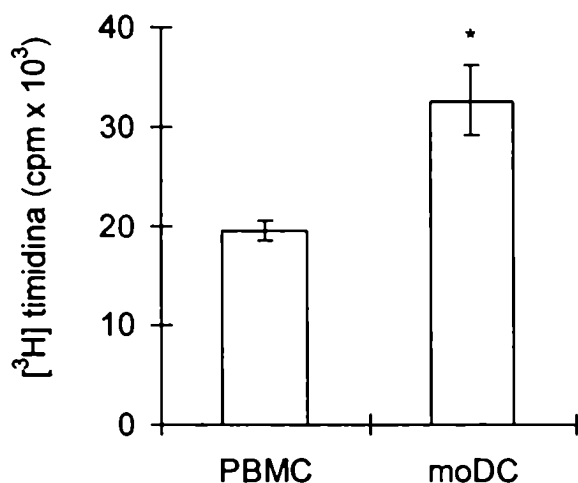


Figura 3: Capacidad inmunestimuladora de moDC. Células mononucleares (PBMC) y moDC fueron empleados como células presentadoras en un cultivo mixto leucocitario. La relación célula presentadora a respondedora fue 1/10 para moDC y 1/1 para PBMC (según se describe en materiales y métodos). Los resultados se expresan como incorporación de [³H]timidina en cpm. Cada barra representa la media \pm DS de un experimento representativo de dos. * $p < 0,05$ empleando el test de Student.

A partir de los resultados obtenidos se concluye que los monocitos cultivados en presencia de GM-CSF e IL4 presentan la mayoría de las características necesarias para ser consideradas como DC derivadas de monocitos (moDC).

II. Las DC en la respuesta inmune

Como se mencionó previamente, las DC juegan un papel crítico en la inducción de la respuesta inmune adaptativa e innata. En el presente trabajo se analizó la participación de las moDC en cada una de las etapas que conducen al desarrollo de una respuesta inmune. Para lo cual se evaluó: 1) el reclutamiento de las moDC hacia los tejidos periféricos, estudiando su adhesión y migración a través de células endoteliales, 2) la capacidad de captación de antígenos por las moDC, analizando la captación de dextrán, 3) la emigración celular desde los tejidos no linfoides periféricos, evaluando su interacción con las proteínas de MEC, 4) la capacidad de las moDC para inducir una respuesta inmune antígeno específica y alogeneica, analizando la proliferación de linfocitos T en respuesta a las moDC.

II. 1. Adhesión y migración de moDC a través de las células endoteliales

Una vez generadas las DC en médula ósea, éstas entran al torrente sanguíneo como DC inmadura y colonizan los tejidos no linfoides periféricos. Esto involucra la

Resultados

interacción con células endoteliales vasculares y la posterior migración a través de las mismas. En esta etapa del estudio, se analizó la capacidad de las moDC para adherirse a células endoteliales purificadas a partir de vena de cordón umbilical humano (HUVEC). En la **figura 4** se observa que las moDC fueron capaces de adherirse al endotelio, siendo el incremento en la adhesión del 63 %.

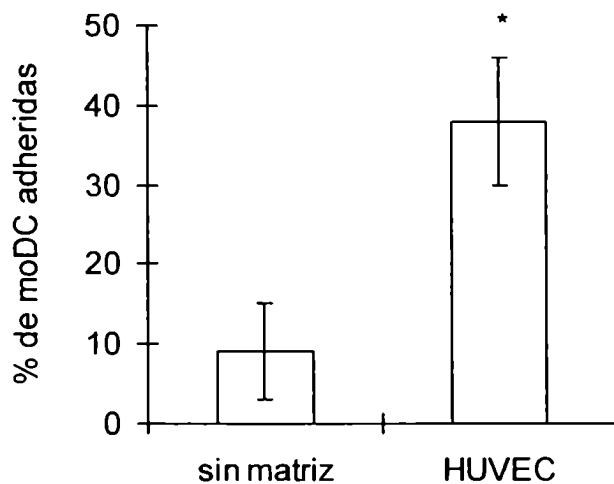


Figura 4: Adhesión de moDC a HUVEC. Se colocaron $5-10 \times 10^4$ células sobre monocapas de HUVEC. Luego de 60 minutos a 37°C se descartaron las células no adheridas y se recuperaron las adheridas. Se graficó el porcentaje de adhesión. Cada barra del gráfico representa la media \pm ES de cuatro experimentos. * $p < 0,05$ con respecto al basal, empleando el test de Student.

Posteriormente, se caracterizaron las moléculas involucradas en la adhesión de moDC a HUVEC realizando ensayos de bloqueo de la adhesión empleando anticuerpos monoclonales contra las moléculas CD18, CD29, CD49e y CD31. En la **figura 5** se observa que el tratamiento de las moDC con los anticuerpos mencionados bloqueó parcialmente la adhesión al endotelio, siendo los porcentajes de adhesión obtenidos del 31 % para CD18, 36 % para CD29, 29 % para CD49e y 38 % para CD31. Estos resultados sugieren que la interacción entre moDC y HUVEC estaría parcialmente mediada por las moléculas de adhesión CD18, CD29, CD49e y CD31.

Resultados

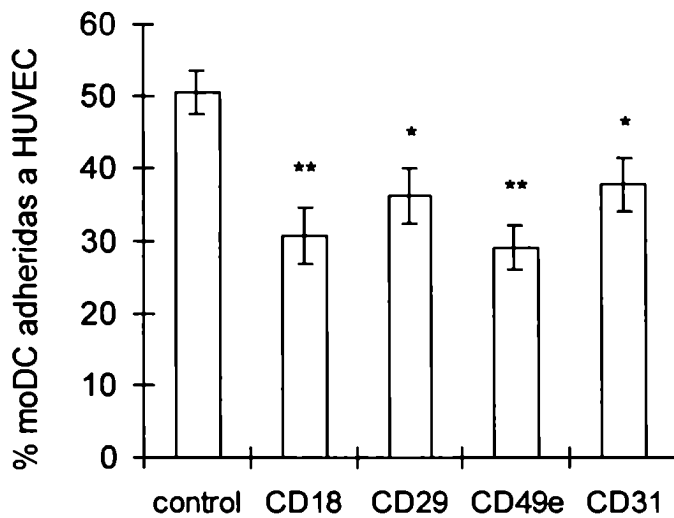


Figura 5: Bloqueo de la adhesión de moDC a HUVEC. Las células incubadas con anticuerpos bloqueantes para CD18, CD29, CD49e y CD31 se colocaron ($5 \cdot 10^4$) sobre monocapas de HUVEC. Luego de 60 minutos se recuperaron las células adheridas. Como control se utilizó un anticuerpo contra HLA-DR. Se graficó el porcentaje de adhesión \pm ES de cinco experimentos.

* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control, el análisis de los datos se realizó mediante un ANOVA y el test de Student Newman Kules.

La activación del endotelio por citoquinas liberadas durante un proceso inflamatorio aumenta la expresión de ciertas moléculas de adhesión como CD54 (ICAM-1), lo cual facilita el reclutamiento de leucocitos desde la circulación hacia el sitio de la lesión. El comportamiento de las moDC frente a un endotelio activado fue similar al descrito para otros leucocitos. En la **figura 6** se observa que la activación de las células endoteliales con $\text{TNF}\alpha$ incrementó la adhesión de las moDC, comparado con el endotelio no estimulado.

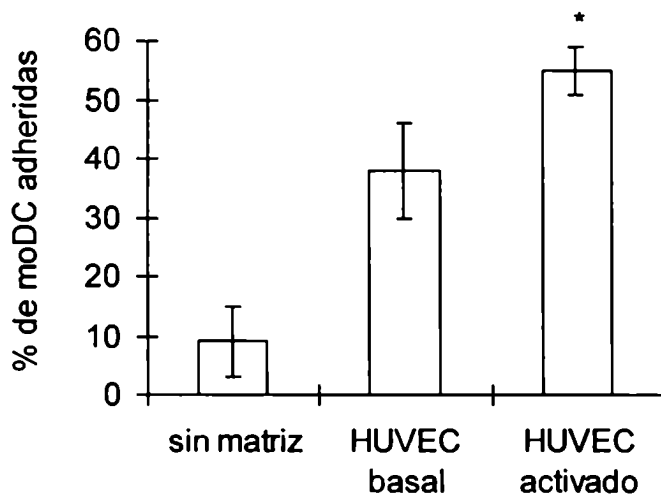


Figura 6: Adhesión de moDC a HUVEC. Se sembraron $5 \cdot 10^4$ células sobre HUVEC no activado o estimulado con $\text{TNF}\alpha$ (100 U/ml, 4 horas a 37°C). Luego de 60 minutos se descartaron las células no adheridas y se recuperaron las adheridas. Se graficó la media del porcentaje de células adheridas \pm ES de cuatro experimentos.

* $p < 0,05$ con respecto al endotelio no estimulado, el análisis de los datos se realizó mediante un ANOVA y el test de Student Newman Kules.

Resultados

Luego de la adhesión de las DC a las células endoteliales, se produce un proceso denominado migración transendotelial. Como se observa en la **figura 7**, un pequeño porcentaje de moDC fue capaz de atravesar el endotelio vascular. Sin embargo, este porcentaje se vio incrementado cuando el endotelio fue previamente activado con $\text{TNF}\alpha$ (figura 7). Estos resultados sugieren que el reclutamiento de las moDC inmaduras es mayor en un foco inflamatorio de forma similar a lo observado para otras poblaciones leucocitarias.

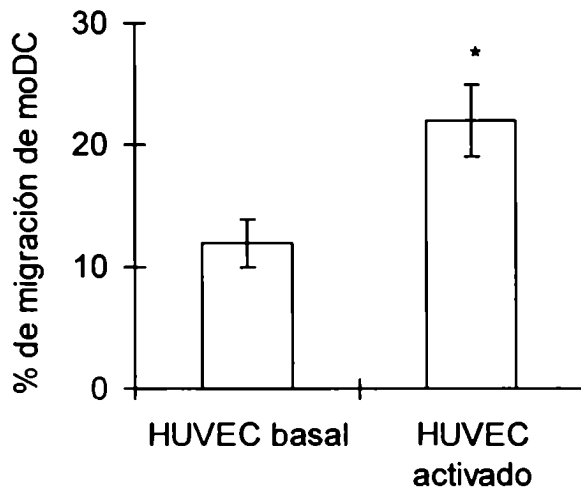


Figura 7: Migración transendotelial de moDC. Se colocaron $5-10 \times 10^4$ moDC sobre monocapas de HUVEC estimulado o no con $\text{TNF}\alpha$ (100 U/ml, 4 horas a 37°C). Luego de 60 minutos a 37°C se recuperaron las células migradas. Se graficó la media del porcentaje de migración \pm SD, de un experimento representativo de dos. * $p < 0,05$ con respecto al endotelio no estimulado, empleando el test de Student.

Modulación de la adhesión de moDC a células endoteliales

Niveles elevados de $\text{TNF}\alpha$ pueden hallarse en un foco inflamatorio como así también en el suero de pacientes sépticos. De esta manera el $\text{TNF}\alpha$ podría actuar no sólo sobre las DC inmaduras residentes en los tejidos periféricos sino también sobre sus precursores circulantes, que aún no han colonizado los tejidos. En este último caso el resultado final podría ser el inicio prematuro del proceso de maduración celular. Con el objetivo de evidenciar el efecto de las citoquinas proinflamatorias sobre las DC inmaduras, se estudió la adhesión de las moDC previamente tratadas con $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL}1\beta$ a HUVEC. En la **figura 8** se observa que ambas citoquinas disminuyeron levemente la adhesión de las moDC a HUVEC. Estos resultados sugieren que las moDC circulantes serían menos eficientes para adherirse al endotelio en aquellas

Resultados

condiciones donde las concentraciones plasmáticas de IL1 y $\text{TNF}\alpha$ sean lo suficientemente elevadas como para iniciar el proceso de maduración de las células.

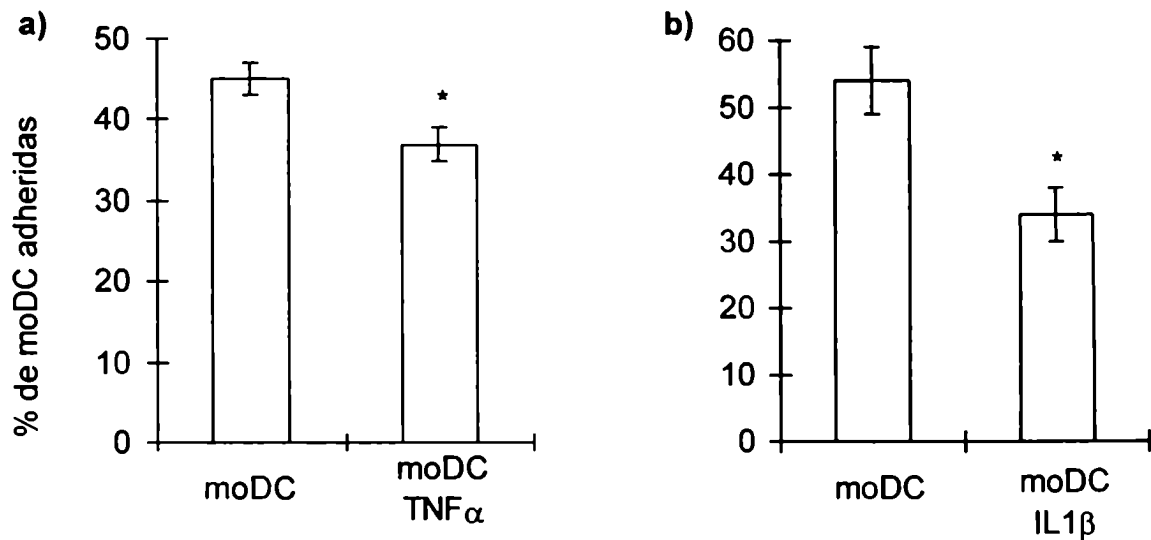


Figura 8: Efecto del $\text{TNF}\alpha$ y la $\text{IL1}\beta$ sobre la adhesión de moDC a endotelio. MoDC previamente tratadas durante 1 hora con (a) $\text{TNF}\alpha$ (100 U/ml) o (b) $\text{IL1}\beta$ (10 ng/ml) fueron colocadas sobre monocapas confluentes de HUVEC. Luego de 60 minutos se descartaron las células no adheridas y se recuperaron las células adheridas. Los resultados representan el porcentaje medio de adhesión \pm DS de un experimento representativo de dos. * $p < 0,05$, comparado con las células no tratadas (moDC). El análisis de los datos se realizó empleando el test de Student.

La menor adhesión de moDC a HUVEC, inducida por el tratamiento con $\text{TNF}\alpha$, podría deberse a modificaciones a nivel de la expresión de las moléculas de adhesión. Dado que la adhesión de las moDC a HUVEC fue parcialmente mediada por CD18, CD29, CD49e y CD31, se analizó la expresión de dichas moléculas sobre las moDC luego del tratamiento con $\text{TNF}\alpha$. En la **figura 9** se observa que las moDC tratadas con $\text{TNF}\alpha$ presentaron una mayor expresión de CD18 y menor expresión de CD31, comparadas con las células no tratadas. En cambio no se observaron diferencias en la expresión de CD29 y CD49e. Los cambios en CD31 podrían explicar en parte la disminución en la adhesión al endotelio vascular de las moDC tratadas con $\text{TNF}\alpha$.

Resultados

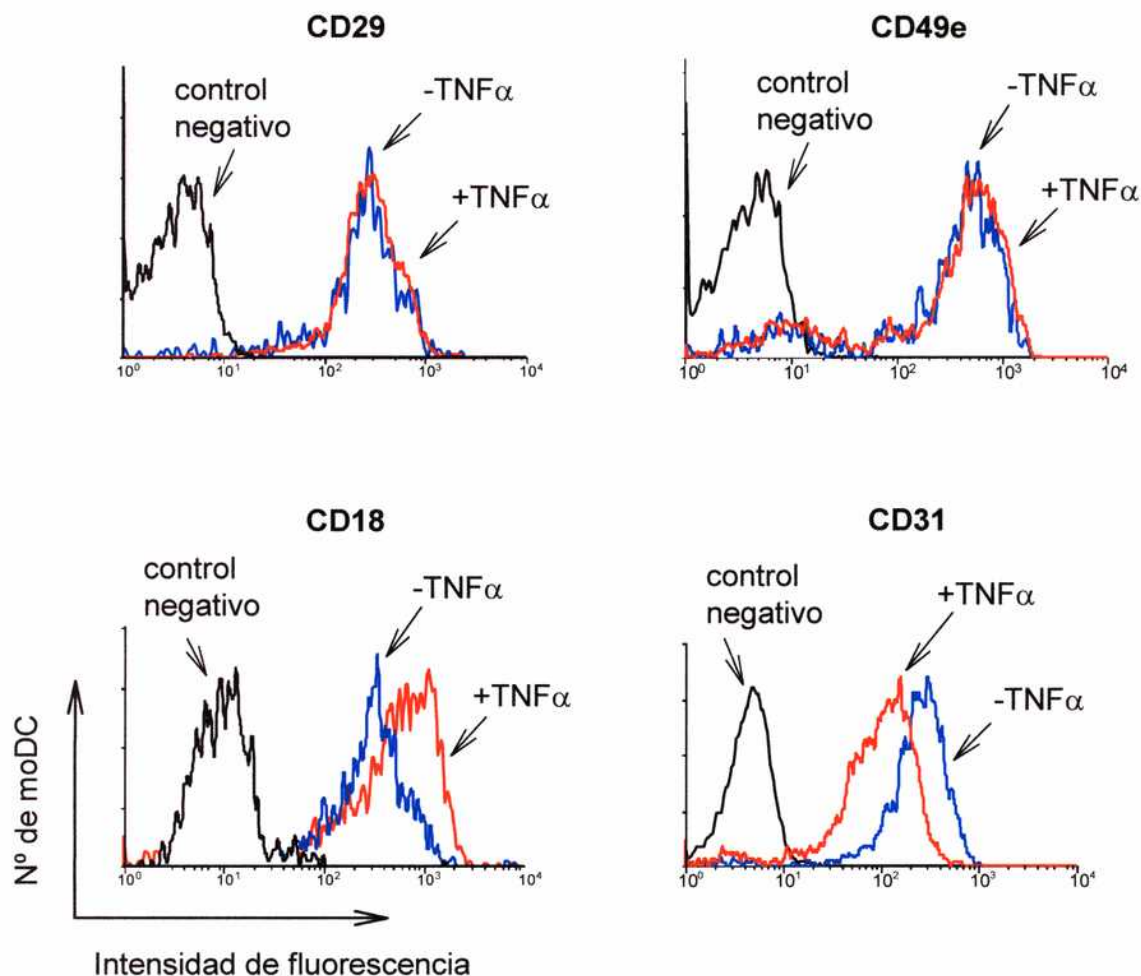


Figura 9: Efecto del TNF α sobre la expresión de moléculas de adhesión en moDC. Se realizó una inmunofluorescencia simple indirecta para las diferentes moléculas según se describe en materiales y métodos. En cada gráfico se representa la expresión para moDC sin tratar con TNF α (azul), para las células tratadas con TNF α (naranja) y el control negativo para ambos grupos (negro). La fluorescencia de cada muestra fue analizada por citometría de flujo, excluyendo a las células muertas con yoduro de propidio.

II. 2. Captación de dextrán-FITC.

Una vez localizadas en los tejidos periféricos, las DC inmaduras podrán captar diferentes antígenos. La variedad y el número de antígenos presentados por las DC dependen de la eficiencia de captura y de la capacidad de las MHC para ser cargadas con los péptidos antigénicos. Con el objeto de evaluar la capacidad de las moDC para captar antígenos se incubaron las células con dextrán conjugado a

Resultados

isotiocianato de fluoresceína (FITC). El dextrán es una molécula no degradable que puede utilizarse como parámetro de los procesos de macropinocitosis y de endocitosis mediada por clatrina [85]. Estímulos clásicos como el LPS (que inducen la maduración de DC) pueden modificar la capacidad de captación de antígenos, el procesamiento y la presentación de los mismos. Otros estímulos no clásicos como las variaciones en la osmolaridad extracelular también pueden inducir cambios en estas funciones celulares.

Estímulos clásicos: lipopolisacáridos

En la **figura 10** se observa que las moDC tratadas con LPS (100 ng/ml, 2 horas a 37°C) presentaron una menor captación de dextrán-FITC.

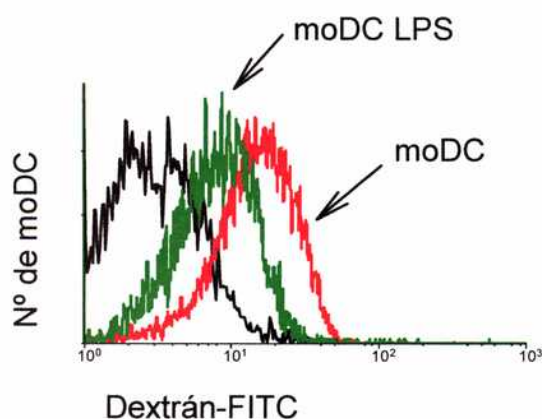


Figura 10: Captación de dextrán por moDC inmaduras y maduras. Las células fueron tratadas (verde) o no (rojo) con LPS (100 ng/ml, 2 horas a 37°C) y luego incubadas con dextrán-FITC (60 minutos a 37°C). El control negativo (línea negra) corresponde a las moDC tratadas o no con LPS incubadas con dextrán-FITC a 4°C. Los resultados se analizaron por citometría de flujo, excluyendo a las células muertas con yoduro de propidio.

Estímulos no clásicos: la hiperosmolaridad

Se ha demostrado que los leucocitos sufren un estrés mecánico que modifica su forma y altera el volumen celular durante el pasaje a través del endotelio vascular, o durante el proceso de quimiotaxis. Estos cambios deben ser compensados mediante el intercambio de iones y agua con el medio extracelular, los que en definitiva redundarán en cambios en la osmolaridad celular [86]. Poco se sabe con respecto al efecto de cambios osmolares sobre las DC, por tal motivo se evaluó el efecto del aumento de la osmolaridad extracelular sobre las propiedades de las moDC, entre ellas su capacidad para incorporar antígenos. En la **figura 11** se observa que el

Resultados

tratamiento de las moDC con medios hiperosmolares (460 y 580 mOsm) disminuyó la incorporación de dextrán-FITC comparado con un medio iso-osmolar (280 mOsm).

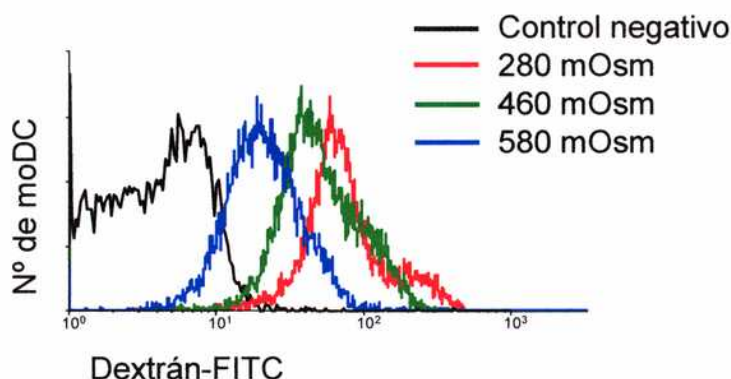


Figura 11: Efecto de la hiperosmolaridad sobre la captación de dextrán por moDC. Las células sometidas a un aumento de la osmolaridad (460 y 580 mOsm, 60 minutos a 37°C) fueron incubadas con dextrán-FITC (60 minutos a 37°C). El control negativo se realizó incubando las células con el dextrán a 4°C (histograma negro). A continuación las muestras fueron analizadas por citometría de flujo, excluyendo a las células muertas con yoduro de propidio.

Posteriormente se descartó un aumento de la mortalidad inducido por el tratamiento hiperosmolar, analizando los niveles de apoptosis y necrosis en los diferentes cultivos. En la **figura 12** se observa que el tratamiento de las moDC con medios hiperosmolares disminuye levemente la viabilidad celular comparada con un medio iso-osmolar. Sin embargo, esta disminución no fue concentración dependiente.

Resultados

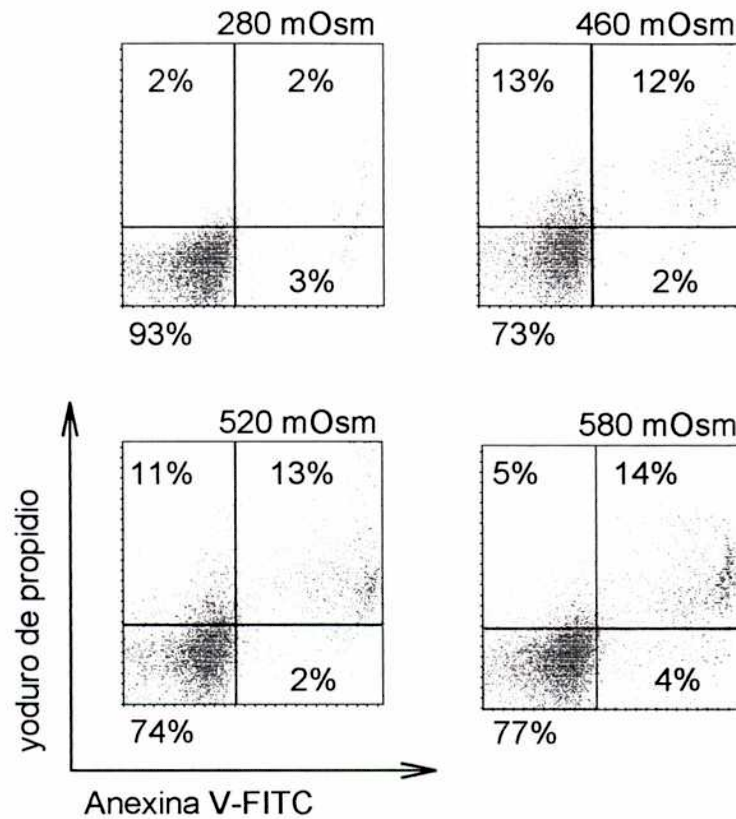


Figura 12: Viabilidad de moDC sometidas a un aumento de la osmolaridad extracelular. Luego del tratamiento hiperosmolar las células fueron marcadas con Anexina V-FITC/yoduro de propidio y analizadas por citometría de flujo, según se describe en materiales y métodos

II. 3. Adhesión de moDC a proteínas de matriz extracelular

Las DC inmaduras residentes en los tejidos periféricos deben interactuar con proteínas de MEC, entre las que se encuentran la FN, LM y Col tipo IV. A continuación, se analizó la capacidad de adhesión de moDC inmaduras a las proteínas previamente mencionadas. En la **figura 13** se observa que las células se adhirieron a las distintas proteínas de MEC en un porcentaje que osciló entre el 40 y el 60%.

Resultados

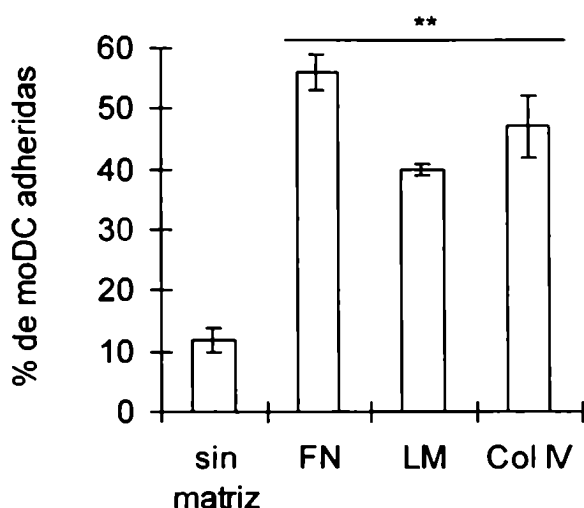


Figura 13: Adhesión de moDC a proteínas de MEC. $5-10 \times 10^4$ células se sembraron sobre FN, LM o Col tipo IV. Luego de 60 minutos se recuperaron las células no adheridas. Los datos se expresan como el porcentaje medio de adhesión \pm DS de un experimento representativo de tres. $**p < 0,001$, comparado con la adhesión en ausencia de proteína de MEC. El análisis de los datos se realizó mediante un ANOVA y el test Student Newman Kules.

La interacción de las células con proteínas de MEC está mediada por integrinas. Las moléculas clásicamente descritas para la adhesión a FN son las integrinas: CD49e/CD29 ($\alpha 5\beta 1$) y CD49d/CD29 ($\alpha 4\beta 1$). Sin embargo, otras integrinas pueden participar en la interacción como por ejemplo CD49d/ $\beta 7$ ($\alpha 4\beta 7$), CD51/CD29 ($\alpha v\beta 1$), CD51/ $\beta 6$ ($\alpha v\beta 6$). Los receptores descritos para LM son CD49c/CD29 ($\alpha 3\beta 1$) y CD49f/CD29 ($\alpha 6\beta 1$). Con el objeto de determinar las integrinas involucradas en la adhesión de las moDC a FN y LM se realizaron ensayos de bloqueo de la adhesión utilizando anticuerpos monoclonales bloqueantes dirigidos hacia las diferentes integrinas.

En la **figura 14** se observa que la adhesión de las moDC a FN y LM fue bloqueada completamente cuando las células se trataron con un anticuerpo contra la cadena $\beta 1$ integrina (CD29), receptor común para ambas proteínas. Con respecto a la cadena α , la adhesión a FN (**figura 14a**) fue totalmente bloqueada con un anticuerpo contra CD49e pero no con un anticuerpo contra CD49d. La magnitud del bloqueo con el anticuerpo contra CD49e fue similar al obtenido con el dirigido contra CD29. Cuando se analizó la cadena α en la adhesión a LM, los resultados fueron más complejos. En la **figura 14b** se observa que la misma fue parcialmente bloqueada con un anticuerpo contra CD49c, mientras que un anticuerpo contra CD49f no tuvo efecto. Sin embargo, la incubación simultánea de las células con ambos anticuerpos (CD49c y CD49f) bloqueó completamente la adhesión a LM.

Resultados

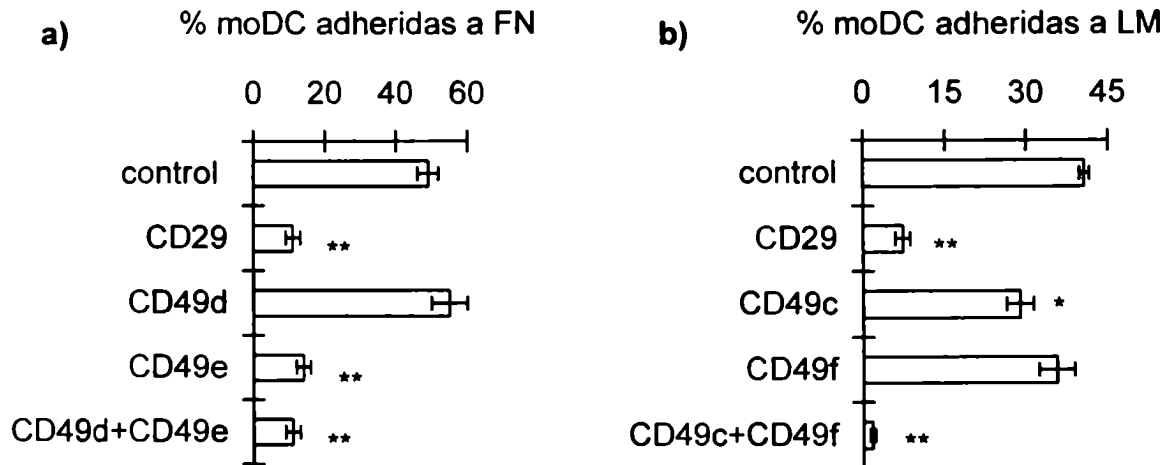


Figura 14: Bloqueo de la adhesión de moDC a proteínas de MEC. Las moDC fueron preincubadas (30 minutos a temperatura ambiente) con anticuerpos bloqueantes para CD29, CD49c, CD49d, CD49e y CD49f. Luego se colocaron $5-10 \times 10^4$ células en placas cubiertas con (a) FN o (b) LM. Como control se utilizó un anticuerpo irrelevante. Los resultados se expresan como porcentaje de células adheridas con respecto a las colocadas inicialmente. Cada barra representa el porcentaje de adhesión \pm DS, de un gráfico representativo de dos experimentos. La comparación entre los valores obtenidos se realizó mediante un ANOVA y el test de Student Newman Kules, ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

II. 3. a. El $\text{TNF}\alpha$: modulación de la adhesión a proteínas de matriz extracelular.

Las DC se encuentran bajo la influencia del microambiente que las rodea. Entre los moduladores de la fisiología de las DC se encuentran el $\text{TNF}\alpha$ y la $\text{IL}1\beta$, presentes en un foco inflamatorio. Estas citoquinas proinflamatorias son capaces de iniciar la maduración y migración de las células de Langerhans *in vivo* [87, 88]. En base a estos antecedentes, se analizó el efecto del $\text{TNF}\alpha$ sobre las moDC en su interacción con proteínas de MEC (FN, LM y Col IV). La **figura 15** muestra que las moDC tratadas con $\text{TNF}\alpha$ (100 U/ml, 60 minutos) fueron menos adherentes a FN y LM pero no a Col tipo IV, comparadas con las células no tratadas (porcentaje de inhibición: FN: 22 ± 2 %, $n = 17$; y LM: 24 ± 9 %).

Resultados

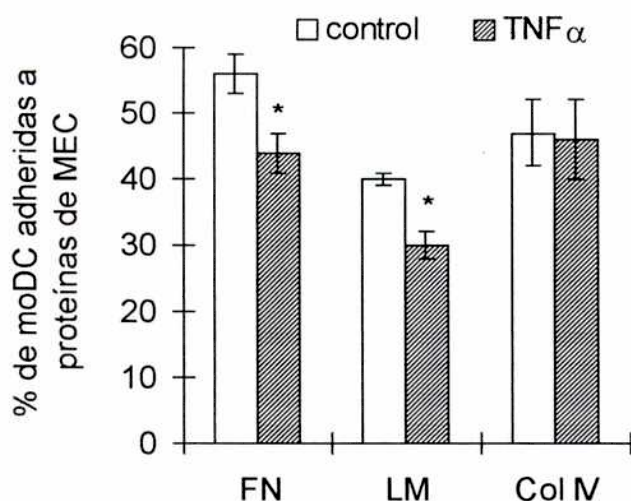


Figura 15: Efecto del TNF α sobre la adhesión de moDC a proteínas de MEC. Previo al ensayo de adhesión las moDC fueron incubadas con TNF α (100 U/ml, 60 minutos). Los resultados se expresan como el porcentaje medio de adhesión \pm DS de un experimento representativo de cuatro. La comparación entre los valores obtenidos se realizó mediante un ANOVA y el test de Student Newman Kules, * $p < 0.05$.

Esta citoquina no sólo fue capaz de alterar la capacidad de adhesión de las moDC a proteínas de MEC, sino que también afectó su migración. En la **figura 16** se observa que algunas moDC tratadas con TNF α presentaron una mayor movilidad sobre FN, hecho que se evidencia por un leve aumento en la migración a través de esta proteína de MEC.

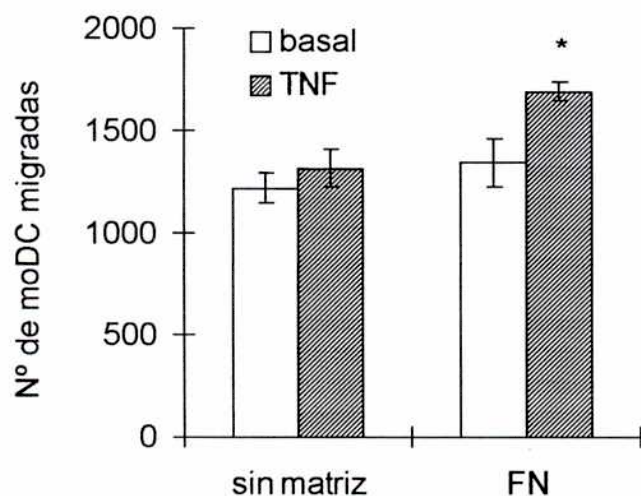


Figura 16: Migración de moDC a través de fibronectina. Se colocaron $5-10 \times 10^4$ células en filtros cubiertos con FN durante 60 minutos a 37°C para permitir su adhesión. Posteriormente se agregó TNF α (100 U/ml) en el compartimento inferior de las cámaras de Boyden modificadas. Luego de 2 horas se recuperaron las células migradas. Los datos se expresan como el nº de moDC migradas \pm ES de dos experimentos. * $p < 0,05$ comparado con las células no tratadas con TNF α . El análisis de los datos se realizó mediante un ANOVA y el test de Student Newman Kules.

El efecto del TNF α sobre la adhesión de las moDC a proteínas de MEC y a HUVEC, también podría ser relevante en otro tipo de interacciones celulares. Se ha

Resultados

demostrado que la presencia de DC en un foco tumoral es un signo de buen pronóstico. Sin embargo, esto no es habitual por lo que el tumor puede establecerse sin ser rechazado por el sistema inmune. Una probable explicación para este fenómeno podría ser la presencia de factores liberados por el tumor (como por ejemplo $\text{TNF}\alpha$) capaces de actuar sobre las DC evitando su adhesión a las células tumorales. Con el objetivo de evaluar esta hipótesis se realizó un ensayo de adhesión empleando células de melanoma humano. En la **figura 17** se observa que 40 % de las moDC fueron capaces de adherirse a las células tumorales y que esta adhesión fue levemente menor para las moDC tratadas con $\text{TNF}\alpha$.

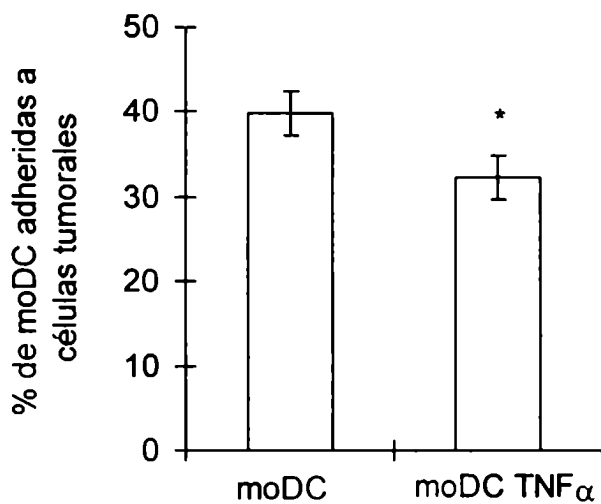


Figura 17: Efecto del $\text{TNF}\alpha$ sobre la adhesión de moDC a células tumorales. Previo al ensayo de adhesión las moDC fueron incubadas con $\text{TNF}\alpha$ (100 U/ml, 60 minutos). Los resultados se expresan como el porcentaje medio de adhesión \pm ES de dos experimentos.

* $p < 0.05$ con respecto a las moDC sin tratar, se empleó el test de Student.

Los niveles de inhibición de la adhesión y el aumento de la migración de las moDC tratadas con $\text{TNF}\alpha$ fueron muy bajos en todas las interacciones examinadas, sugiriendo que sólo una subpoblación de células fue capaz de responder a la citoquina. Para examinar esta hipótesis, se analizó la expresión de los receptores para $\text{TNF}\alpha$ sobre las moDC. En la **figura 18** se observa que sólo un bajo porcentaje (24 %) de moDC expresa el receptor para TNF de tipo II. Este valor fue variable entre experimentos (mayor nivel de expresión observado 53 %). Por otro lado, en cuatro experimentos independientes la expresión del receptor de tipo I fue casi indetectable (mayor nivel de expresión: 10 %). Estos resultados confirmarían que

Resultados

sólo la subpoblación de moDC que expresan el receptor para TNF tipo II serían capaces de responder a la citoquina.

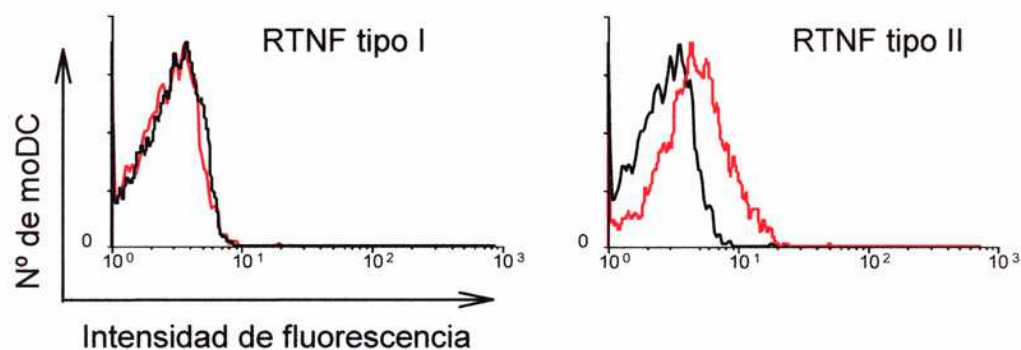


Figura 18: Expresión de receptores para $TNF\alpha$ en moDC. Se realizó una inmunofluorescencia indirecta para el receptor de $TNF\alpha$ de tipo I (RTNF tipo I) y el de tipo II (RTNF tipo II). En cada gráfico se representa el marcador (rojo) superpuesto con el control negativo correspondiente (negro). La fluorescencia de cada muestra fue analizada por citometría de flujo, excluyendo a las células muertas con yoduro de propidio.

La disminución en la adhesión a FN y LM sugieren cambios en la expresión de las integrinas presentes en las moDC tratadas con $TNF\alpha$. En base a los resultados obtenidos para el bloqueo de la adhesión a las proteínas de MEC (figura 14), se estudió la expresión de las integrinas CD29, CD49c, CD49d, CD49e y CD49f sobre las moDC tratadas o no con $TNF\alpha$, con la finalidad de evidenciar una posible modificación en su expresión. En la **tabla II** se observa que más del 90 % de las moDC expresan CD49d, CD49e y CD49f, pero sólo el 68 % de las células expresan CD49c. La intensidad de fluorescencia media fue moderada para CD49c, CD49d y CD49f, y alta para CD49e. Sin embargo, el tratamiento con $TNF\alpha$ (100 U/ml a 37°C) no modificó ni el porcentaje ni la intensidad de expresión de las integrinas analizadas. Es importante señalar que el tratamiento de las moDC con $TNF\alpha$ durante 24 horas tampoco modificó la expresión de las integrinas analizadas.

Resultados

	moDC no tratadas		moDC tratadas con TNF α	
	%	IFM	%	IFM
CD49c	68 \pm 19	1438 \pm 334	55 \pm 18	1574 \pm 182
CD49d	97 \pm 1	2363 \pm 103	98 \pm 1	2389 \pm 30
CD49e	98 \pm 1	3395 \pm 124	98 \pm 2	3424 \pm 130
CD49f	91 \pm 2	2323 \pm 232	85 \pm 3	2167 \pm 358

Tabla II: Expresión de integrinas en moDC tratadas o no con TNF α . Se representan los porcentajes de expresión y la IFM para los distintos marcadores de superficie.

En base a la hipótesis planteada en la que sólo la subpoblación que expresa el receptor para TNF α fue capaz de responder a dicha citoquina, se examinó la expresión de CD49e sólo en la población RTNF II⁺, previo y posteriormente al tratamiento de las moDC con TNF α . Como se observa en la **figura 19**, aproximadamente el 86 % de las células expresaron CD49e y dentro de esta población el 65 % fueron positivas para el RTNF II. El tratamiento de las moDC con TNF α mantuvo el nivel de expresión de CD49e, mientras que se observó una disminución en la expresión del RTNF II de aproximadamente el 20 %.

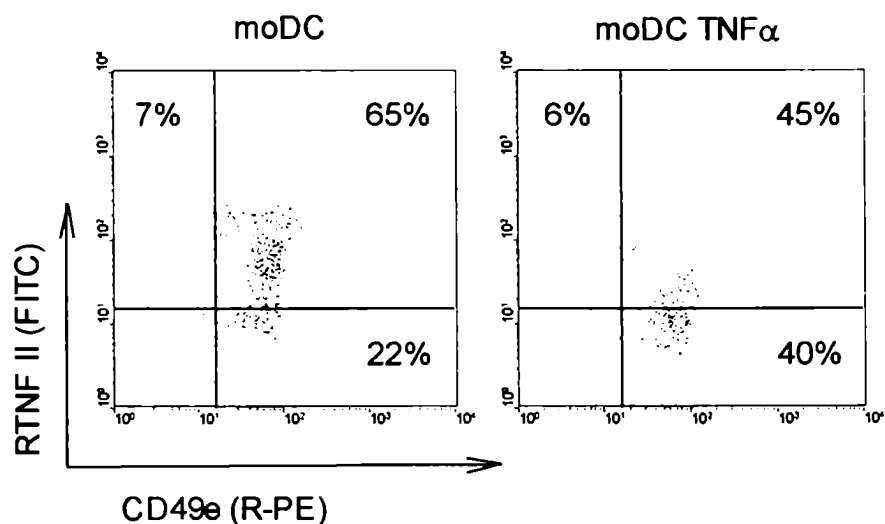


Figura 19: Efecto del TNF α sobre la expresión del RTNF tipo de II y sobre CD49e. Se realizó una inmunofluorescencia doble en moDC tratadas o no con TNF α . Se graficó el dot plot mostrando en cada eje el logaritmo de la IFM para ambos marcadores. Las líneas de los gráficos representan el punto de corte establecido a partir del control doble negativo. La fluorescencia de cada muestra fue analizada por citometría de flujo, excluyendo a las células muertas con yoduro de propidio.

Resultados

El $\text{TNF}\alpha$ puede no sólo modular los niveles de expresión de las integrinas, sino también modificar el estado de activación de las mismas. Dado que no se observaron diferencias en los niveles de expresión de las integrinas CD29 y CD49e en las moDC tratadas con $\text{TNF}\alpha$ (tabla II), se evaluó en forma indirecta el estado de activación de dichas moléculas. Para lo cual se diseñó el siguiente protocolo: luego de un primer ensayo de adhesión a FN realizado con moDC tratadas y no tratadas con $\text{TNF}\alpha$, se recuperaron las células no adheridas. A continuación estas células fueron incubadas o no con "phorbol myristate acetate" (PMA), un activador inespecífico de integrinas (1 ng/ml, 30 minutos a temperatura ambiente) y finalmente se realizó un nuevo ensayo de adhesión a FN. Como se observa en la **figura 20** las moDC no adherentes provenientes de un primer ensayo de adhesión a FN presentaron una menor adhesión a dicha matriz en un segundo ensayo de adhesión cuando las mismas fueron inicialmente tratadas con $\text{TNF}\alpha$. Además, el tratamiento de estas moDC con PMA (previo al segundo ensayo de adhesión) permitió que las células recuperaran su capacidad de adhesión, obteniéndose niveles similares al observado para las células no tratadas con $\text{TNF}\alpha$.

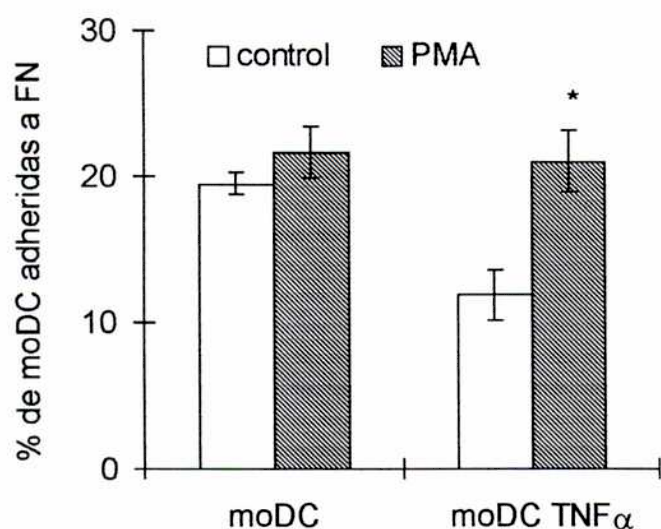


Figura 20: Reversión del efecto inhibitorio del $\text{TNF}\alpha$ sobre la adhesión a fibronectina. Las células no adheridas luego de un primer ensayo de adhesión a FN fueron incubadas con PMA (1 ng/ml, 30 minutos) y utilizadas en un segundo ensayo de adhesión. Luego de 45 minutos se recuperaron las moDC adheridas. Se graficó la media \pm DS de un experimento representativo de dos. * $p < 0,05$ comparado con las células no tratadas con PMA, utilizando el test de Student para muestras pareadas.

Resultados

II. 3. b. El $\text{TNF}\alpha$: señalización a través del AMPc

La transducción de señales del medio externo depende de la presencia de moléculas especializadas presentes en el interior celular. Entre ellas el AMPc participa como segundo mensajero en la decodificación de señales desencadenadas por la interacción entre un ligando y su receptor de membrana. Existen evidencias que demuestran una relación entre los niveles de AMPc intracelulares y diversos efectos mediados por el $\text{TNF}\alpha$ [68, 71]. En base a estas evidencias, se analizó la posible relación entre el contenido de AMPc y la adhesión a proteínas de MEC en las moDC. En la **figura 21** se observa que el tratamiento de las moDC con 10 y 100 U/ml de $\text{TNF}\alpha$ disminuyó la adhesión a FN (como se mostró previamente en la figura 15) y el contenido de AMPc. Tanto para la adhesión como para el contenido de AMPc, el efecto del $\text{TNF}\alpha$ fue mayor a concentraciones menores (10 U/ml). Sin embargo, a concentraciones mayores (1000 U/ml) no se observaron diferencias en ambos parámetros examinados comparado con las células no tratadas. En síntesis se observa que las concentraciones de $\text{TNF}\alpha$ capaces de inhibir la adhesión, también disminuyen los niveles de AMPc intracelulares.

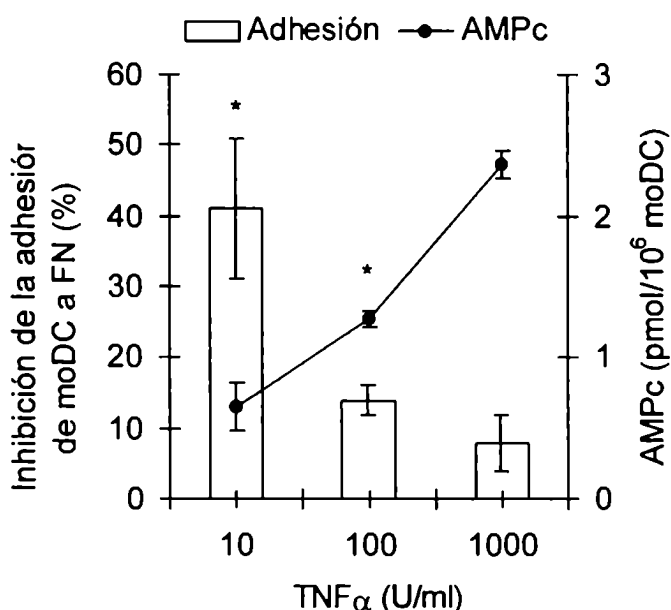


Figura 21: Efecto del $\text{TNF}\alpha$ sobre el contenido intracelular de AMPc y sobre la adhesión a fibronectina de moDC. Las células tratadas con $\text{TNF}\alpha$ (10-1000 U/ml) fueron colocadas sobre FN o procesadas para la medición de AMPc por RIA. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la adhesión a FN y picomoles de AMPc/ 10^6 moDC (nivel basal de AMPc: $2,46 \pm 0,06$ pmol/ 10^6 células). Se graficó la media \pm ES de 4 experimentos. * $p < 0,05$ comparado con las células no tratadas con $\text{TNF}\alpha$, tanto para la adhesión como para el AMPc. El análisis de los datos se realizó mediante un ANOVA y el test *post hoc* Student Newman Kules.

Para confirmar la relación entre el contenido de AMPc y la capacidad de adhesión de las moDC a FN, se trató de revertir el efecto observado aumentando los niveles de AMPc mediante la utilización de un inhibidor de la fosfodiesterasa (IBMX). En la **figura 22a** se observa que el IBMX aumentó la capacidad de las moDC tratadas con $TNF\alpha$ para adherirse a FN. Es importante mencionar que el inhibidor no tiene efecto *per se* sobre la adhesión de las células no tratadas con $TNF\alpha$. Sin embargo, como se observa en la **figura 22b** el IBMX aumentó los niveles de AMPc tanto en las células no tratadas con $TNF\alpha$ como en las tratadas. Estos resultados muestran que el aumento de AMPc fue capaz de revertir el efecto inhibitorio del $TNF\alpha$ sobre la adhesión de las moDC a FN.

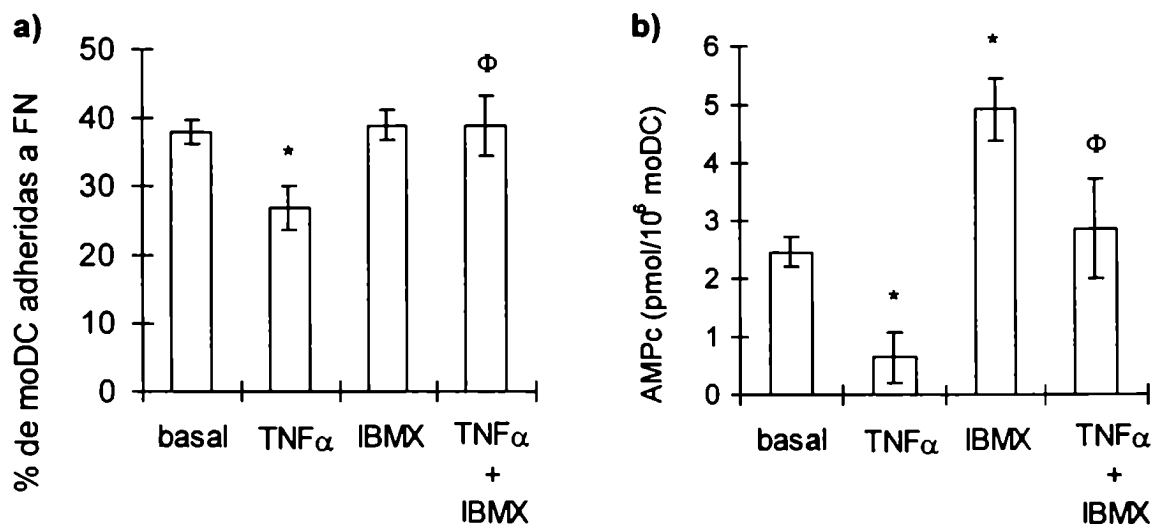


Figura 22: Efecto de la inhibición de la fosfodiesterasa sobre la adhesión a fibronectina y sobre el contenido intracelular de AMPc en moDC. Las células tratadas o no con $TNF\alpha$ se incubaron con un inhibidor de la PDE (IBMX, 0,5 mM) y se colocaron sobre FN o se procesaron para la medición de AMPc. Los resultados se expresan como: (a) porcentaje de moDC adheridas a FN y (b) picomoles de AMPc/10⁶ moDC. Se graficó la media \pm ES de tres experimentos. El análisis de los datos se realizó mediante un ANOVA y el test de Student Newman Kules, * $p < 0,05$ comparado con las células no tratadas con $TNF\alpha$, $\Phi p < 0,05$ comparado con las células tratadas con $TNF\alpha$.

A partir de los resultados obtenidos, en los que el $TNF\alpha$ disminuyó la adhesión de las moDC a FN, como así también su contenido de AMPc, se decidió examinar los niveles de AMPc en las células adheridas y no adheridas a FN. Para lo cual, luego

Resultados

de realizar un ensayo de adhesión empleando moDC tratadas con $\text{TNF}\alpha$, se recuperaron las células adheridas y no adheridas y se determinó en las mismas el contenido de AMPc. En la **figura 23** se observa que las moDC que no se adherieron a FN presentaron un menor contenido de AMPc comparadas con las células que permanecieron adheridas a dicha proteína de MEC. Este experimento no se pudo realizar con las células no tratadas con $\text{TNF}\alpha$ dado el bajo número de células no adherentes recuperadas luego del ensayo de adhesión.

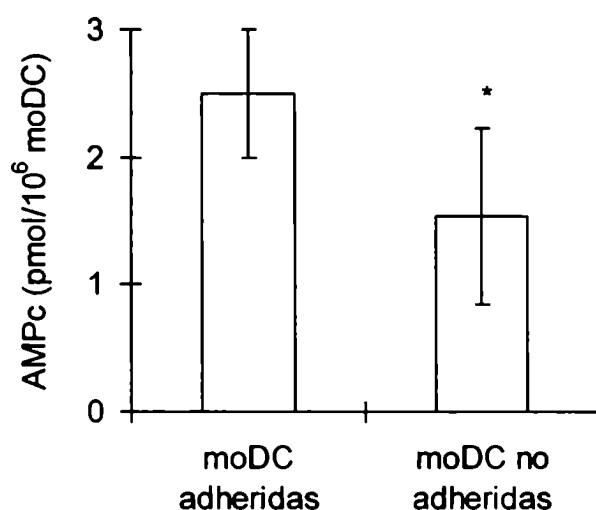


Figura 23: Contenido de AMPc intracelular en moDC tratadas con $\text{TNF}\alpha$ adheridas y no adheridas a fibronectina. Las células tratadas con $\text{TNF}\alpha$ (10 U/ml, 30 minutos a 37°C) fueron colocadas sobre FN. Luego de 45 minutos se recuperaron las moDC adheridas y no adheridas y se las procesó para la medición de AMPc. Se graficó la media \pm DS de un experimento representativo de dos. * $p < 0,01$, empleando el test de Student.

El rol del AMPc en la adhesión de moDC a FN fue también confirmado utilizando análogos de AMPc como el 8Br-AMPc. Para estos experimentos se utilizaron las células no adherentes recuperadas luego de un primer ensayo de adhesión a FN. De este modo se estaría trabajando con las células que respondieron al $\text{TNF}\alpha$ y que por lo tanto presentan niveles bajos de AMPc, tal como se mostró en la figura 23. Las células no adherentes recuperadas luego del ensayo de adhesión fueron tratadas con 8Br-AMPc y posteriormente sometidas a un segundo ensayo de adhesión a FN. En la **figura 24** se observa que las moDC no adherentes obtenidas en el primer ensayo de adhesión, aumentan su capacidad de adherirse a FN cuando son tratadas con 8Br-AMPc, efecto que no pudo observarse con las células adherentes.

Resultados

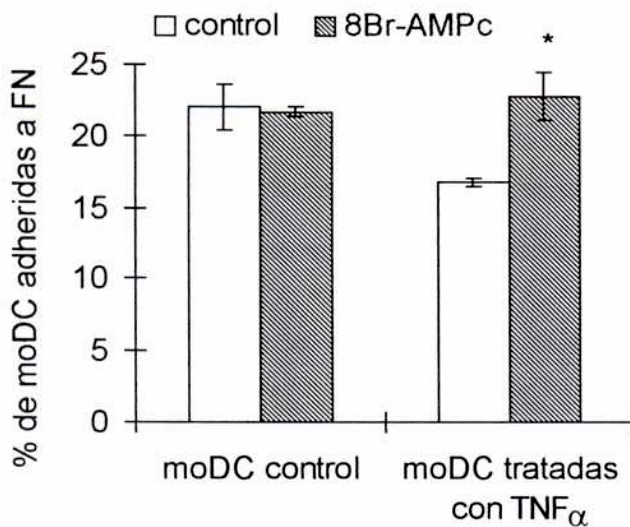


Figura 24: Reversión del efecto del TNF α sobre la adhesión de moDC a FN por 8Br-AMPc. Las células no adheridas luego de un primer ensayo de adhesión a FN fueron incubadas con 8Br-AMPc (1 mM, 30 minutos) y utilizadas en un segundo ensayo de adhesión. Se graficó la media \pm ES, n=3.

* $p < 0,05$ comparado con las células no tratadas con 8Br-AMPc. El análisis de los datos se realizó mediante un ANOVA y el test de Student Newman Kules.

II. 3. c. La IL1 β : modulación de la interacción de moDC con proteínas de matriz extracelular y contenido de AMPc

Al igual que el TNF α , la IL1 β es requerida para iniciar la migración de las DC. Por tal motivo se evaluó la posibilidad de un efecto sinérgico de la IL1 con el TNF α sobre la adhesión de las moDC a FN y sobre los niveles de AMPc. En la **figura 25a** se observa que las células tratadas con IL1 β presentaron una menor adhesión a FN (porcentaje de inhibición: 32 ± 9 %, n=3), de igual magnitud a la inhibición obtenida con el TNF α . El tratamiento simultáneo de las moDC con ambas citoquinas, produjo un porcentaje de inhibición similar al obtenido con las citoquinas por separado (33 ± 13 %, n=3). En la **figura 25b** se observa que de forma similar a lo observado con TNF α , el tratamiento con IL1 β provocó una disminución en el contenido de AMPc de las moDC. Estos resultados sugieren que tanto el TNF α como la IL1 β actuarían sobre la misma población celular y usarían el mismo camino de señalización intracelular.

Resultados

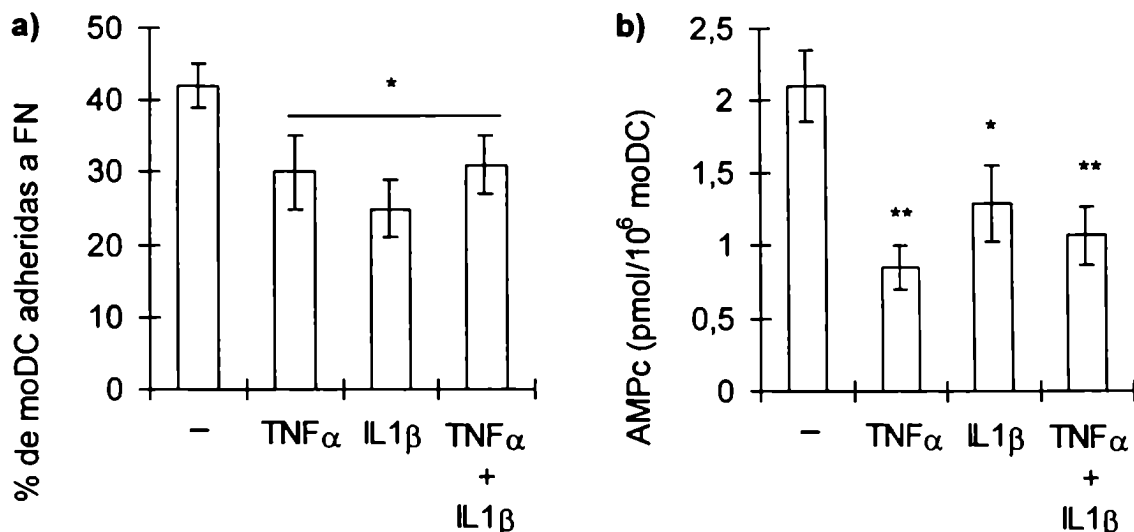


Figura 25: Efecto de la IL1 β sobre la adhesión de moDC a fibronectina y sobre el contenido de AMPc. MoDC incubadas 60 minutos con TNF α (100 U/ml) o IL1 β (1 ng/ml) fueron (a) colocadas sobre FN o (b) procesadas para la medición de AMPc por RIA. Los resultados se expresan como porcentaje de adhesión a FN y picomoles de AMPc/10⁶ moDC. Se graficó la media \pm ES de tres experimentos. * p <0,05 y ** p <0,01 comparado con las células no tratadas con las citoquinas. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA y el test de Student Newman Kules.

II. 3. d. La osmolaridad extracelular

Como pudo observarse previamente, los cambios en la osmolaridad extracelular alteran una de las propiedades de las moDC, como es la capacidad para incorporar antígenos (figura 11). Adicionalmente, la hiperosmolaridad podría tener consecuencias sobre las propiedades adhesivas de estas células. Para probar esta hipótesis, las moDC adheridas a FN, LM y Col tipo IV fueron sometidas a un aumento de la osmolaridad, recuperándose al final del período de incubación las células no adheridas. En la **figura 26a** se observa que en presencia de medios hiperosmolares (460, 520 y 580 mOsm), un número importante de células se despegaron de las proteínas de MEC, siendo más notable el efecto a mayor tiempo de exposición (**figura 26b**). Además, el efecto de los medios hiperosmolares fue independiente de la proteína de MEC estudiada, ya que se obtuvieron resultados similares para FN, Col tipo IV (**figura 27a**) y LM (**figura 27b**). Este efecto no se debió a la menor viabilidad celular observada previamente en condiciones

Resultados

hiperosmolares, ya que a diferencia de lo observado para la adhesión de las moDC, la apoptosis no fue concentración dependiente.

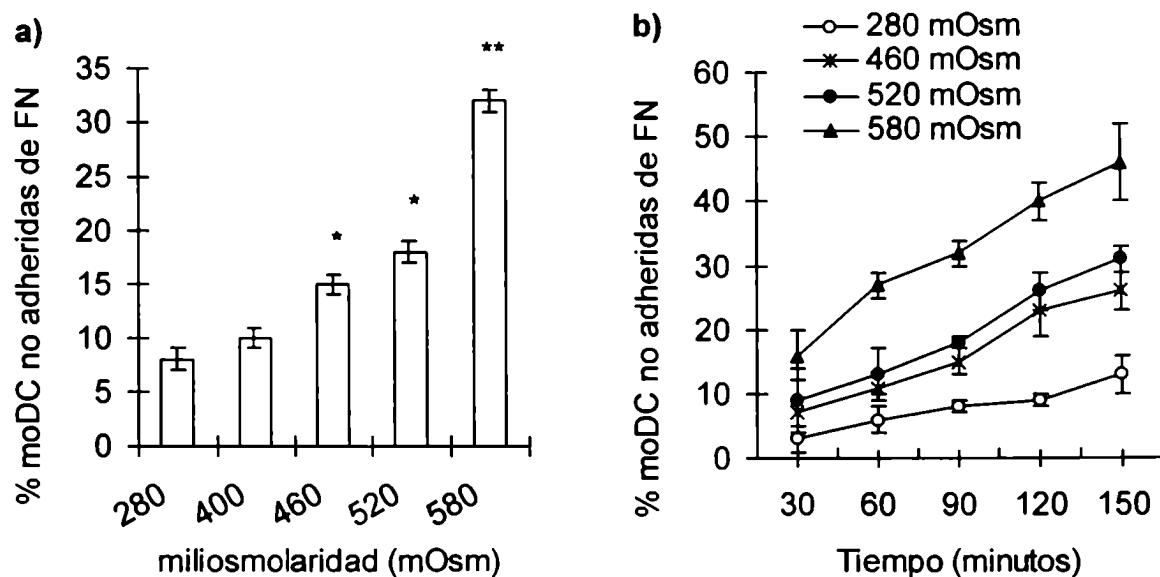


Figura 26: Efecto de la osmolaridad sobre la adhesión de moDC a fibronectina. Se colocaron 2×10^4 células sobre microplacas cubiertos con FN. Luego de 30 minutos se descartaron las células no adheridas y sobre las adheridas se agregaron medios hiperosmolares. (a) Curva dosis-efecto: transcurridos 90 minutos se recuperaron las células no adheridas para cada concentración osmolar. (b) Curva de tiempo: cada 30 minutos se recuperaron las moDC no adheridas para cada osmolaridad. Los resultados se expresan como la media del porcentaje de células desadheridas obtenidas luego del tratamiento hiperosmolar \pm DS de un experimento representativo de tres. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ comparado con las células sometidas a un tratamiento iso-osmolar. El análisis de los datos se realizó mediante un ANOVA y el test Student Newman Kules.

Resultados

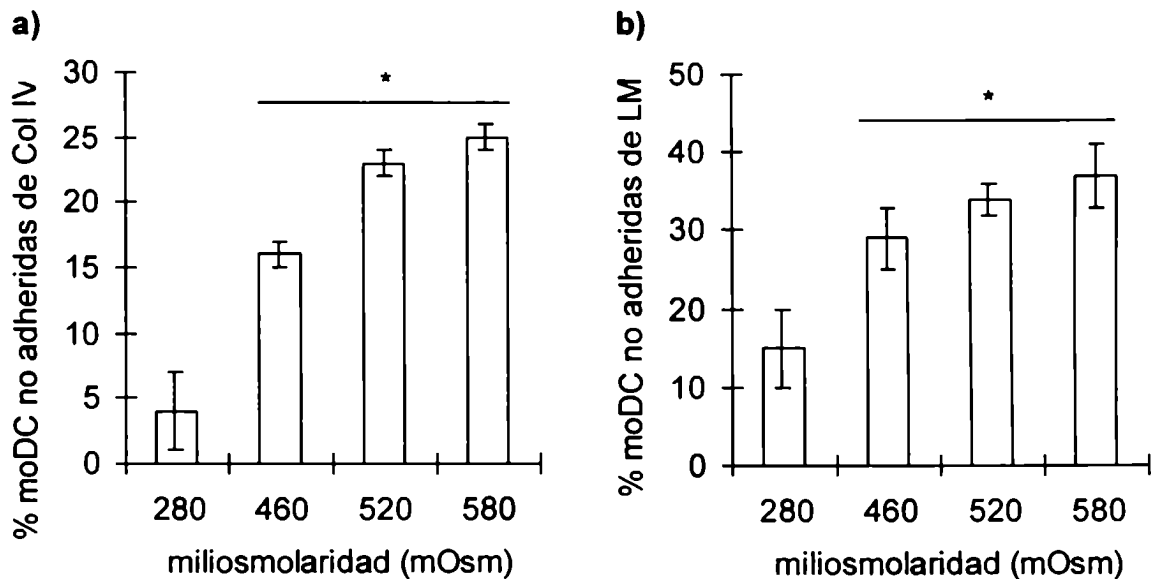


Figura 27: Efecto de la osmolaridad sobre la adhesión de moDC a laminina y colágeno. Se colocaron 2×10^4 células sobre microplacas cubiertas con Col tipo IV (a) o LM (b). Luego de 30 minutos se descartaron las células no adheridas y sobre las adheridas se agregaron medios hiperosmolares. Los resultados se expresan como el porcentaje de células desadheridas obtenidas luego del tratamiento hiperosmolar. * $p < 0,05$ comparado con las células sometidas a un tratamiento iso-osmolar (280 mOsm). El análisis de los datos se realizó empleando el test de Dunnett.

Como quedó establecido, la adhesión de las moDC a proteínas de MEC es dependiente de integrinas (figura 14) y todas ellas comparten la cadena beta CD29. Dado que la adhesión a FN, LM y Col tipo IV fue parcialmente inhibida en presencia de un medio hiperosmolar, se decidió evaluar el efecto del dicho tratamiento sobre la expresión de CD29, molécula que participa en la interacción con todas las proteínas estudiadas. En la **figura 28** puede observarse que el aumento de la osmolaridad no modificó la expresión de CD29 en moDC.

Resultados

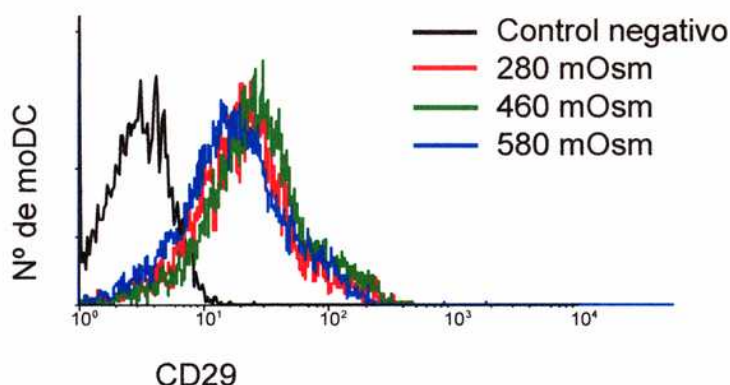


Figura 28: Efecto de la hiperosmolaridad sobre la expresión de CD29 en moDC. Se analizó la expresión de CD29 en células sometidas a un aumento de la osmolaridad (460 y 580 mOsm, 60 minutos a 37°C) mediante una inmunofluorescencia indirecta. La fluorescencia de cada muestra fue analizada por citometría de flujo, excluyendo a las células muertas con yoduro de propidio.

II. 4. Presentación de antígenos por células dendríticas a linfocitos T

Las DC que migran desde los tejidos periféricos hacia los ganglios linfáticos secundarios, en respuesta a estímulos inflamatorios, podrán activar a los linfocitos T específicos. En esta sección se evaluó el efecto del $\text{TNF}\alpha$ y de los cambios de la osmolaridad extracelular sobre la capacidad de las moDC para inducir la proliferación de linfocitos T.

II. 4. a. Efecto del $\text{TNF}\alpha$

Como se mencionó en la introducción, las citoquinas IL1 y $\text{TNF}\alpha$ inducen la maduración de las DC aumentando la expresión de las moléculas coestimuladoras y MHC, y generando células con gran capacidad inmunoestimuladora. La mayoría de los trabajos en la bibliografía evalúan los efectos de estos estímulos inflamatorios luego de 24 horas. Sin embargo, los estudios de cinética de migración de DC muestran la llegada de las mismas a los ganglios linfáticos periféricos dentro de las primeras 4 horas. En el presente trabajo se evaluó la capacidad del $\text{TNF}\alpha$ para inducir cambios tempranos sobre las moDC que pudieran llevar a la generación de células con mayor poder inmunoestimulador. Para ello, las células fueron tratadas

Resultados

durante 1 hora con $\text{TNF}\alpha$ y luego cultivadas con linfocitos T alogeneicos. En la **figura 29** se observa que en estas condiciones el tratamiento de las moDC con $\text{TNF}\alpha$ no modificó la capacidad inmunoestimuladora de las células.

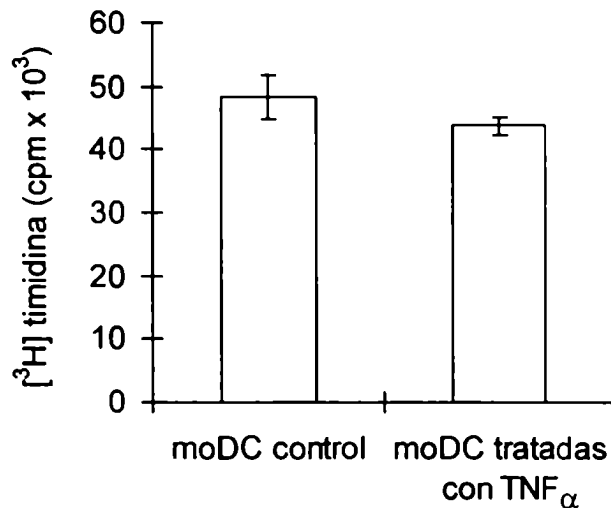


Figura 29: Efecto del $\text{TNF}\alpha$ sobre la capacidad inmunoestimuladora de moDC. Las células tratadas con $\text{TNF}\alpha$ (100 U/ml, 60 minutos) se utilizaron en un cultivo mixto leucocitario. La proliferación se cuantificó por incorporación de [³H]timidina. Se graficó $\text{cpm} \pm \text{DS}$ de un experimento representativo de tres.

Es importante señalar que a pesar de no observarse cambios en el cultivo mixto, el $\text{TNF}\alpha$ a tiempos cortos fue capaz de modificar otros parámetros de las moDC como la adhesión a proteínas de MEC y el contenido de cAMP (figura 15 y 21). Una posible explicación para la ausencia de cambios en el cultivo mixto, podría ser que sólo una población minoritaria de moDC fuera capaz de responder al $\text{TNF}\alpha$ ya que no todas las células expresan el receptor para dicha citoquina (figura 17). Para probar esta hipótesis, se decidió evaluar la capacidad inmunoestimuladora de las células que hubieran respondido al $\text{TNF}\alpha$. Para ello, luego de realizar un ensayo de adhesión a FN empleando moDC tratadas con dicha citoquina, se recuperaron las células adheridas y no adheridas. Es importante recordar que estas células presentaron diferencias en el contenido de AMPc (figura 23). Las moDC obtenidas fueron enfrentadas con linfocitos T alogeneicos. En la **figura 30** se observa que las células no adherentes indujeron una mayor proliferación linfocitaria, comparadas con las moDC adherentes a FN. Es importante señalar que estas últimas también han estado en contacto con el $\text{TNF}\alpha$, pero no se desadherieron, probablemente por ausencia del receptor específico para la citoquina.

Resultados

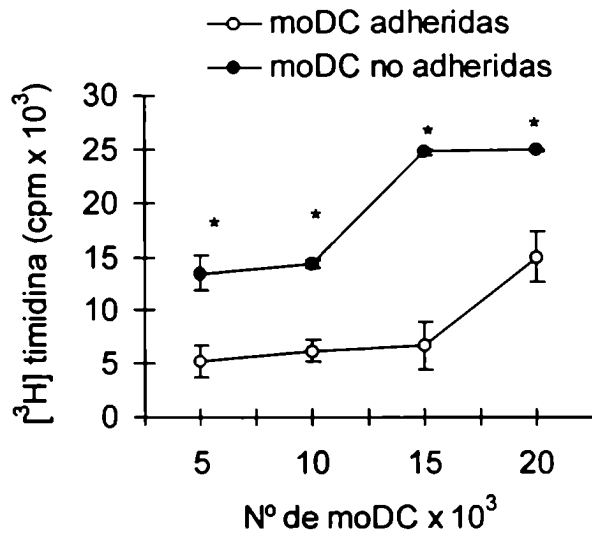


Figura 30: Capacidad inmunoestimuladora de moDC adherentes y no adherentes a fibronectina estimuladas con $TNF\alpha$. Las células tratadas con $TNF\alpha$ (10 U/ml, 30 minutos) se colocaron sobre FN. Luego de 45 minutos se recuperaron las moDC adheridas y no adheridas y se utilizaron como células presentadoras en un cultivo mixto leucocitario. La proliferación se cuantificó por incorporación de $[^3H]$ timidina. Se graficó $cpm \pm DS$ de un experimento representativo de tres. $*p < 0,01$ comparado con las moDC adherentes, utilizando el t test para muestras pareadas.

Como queda establecido, éstas células no adherentes con mayor capacidad inmunoestimuladora, tienen un menor contenido de AMPc (figura 23). El siguiente paso, fue establecer la capacidad de los análogos de AMPc de revertir, no sólo el efecto del $TNF\alpha$ sobre la adhesión, sino también la mayor capacidad inmunoestimuladora de las moDC no adherentes. Al igual que para la adhesión, los análogos de AMPc revirtieron la mayor capacidad inmunoestimuladora de las células no adherentes, observándose niveles de proliferación de células T similares a los obtenidos con las células adherentes. Este efecto de los análogos de AMPc no se observó sobre las moDC adherentes (figura 31).

Resultados

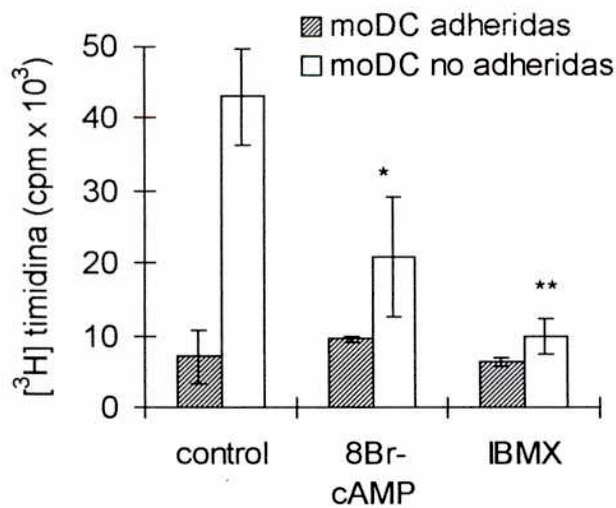


Figura 31: Reversión del efecto del $TNF\alpha$ sobre la capacidad inmunoestimuladora de moDC. Las células tratadas con $TNF\alpha$ (10 U/ml, 30 minutos) recuperadas luego de un ensayo de adhesión a FN, fueron incubadas 30 minutos con 8Br-AMPC (1 mM) o IBMX (0,5 mM) y utilizadas en un cultivo mixto leucocitario. Los resultados se expresan como $cpm \pm DS$ de un experimento representativo de tres. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ comparado con las moDC no adheridas control, utilizando el test de Student Newman Kules.

La capacidad inmunoestimuladora de las DC esta relacionada con el estado de maduración celular, lo que se traduce en cambios en la expresión de moléculas coestimuladoras, de receptores para quimoquinas y en la producción de diversas citoquinas. Dada la diferente capacidad inmunoestimuladora de las células adherentes y no adherentes, se examinó posibles diferencias en la expresión de moléculas de superficie sobre estas dos poblaciones celulares. En la **figura 32a** se observa que las células adherentes y no adherentes tratadas con $TNF\alpha$, durante 1 hora, no expresan CD83 ni CCR7, en tanto que los niveles de expresión de HLA-DR y de CD86 fueron similares en ambas poblaciones celulares. La expresión de CD18 fue levemente mayor en las moDC no adherentes comparadas con las adherentes y hubo una leve disminución en la expresión de CCR5. Sin embargo, a tiempos prolongados (16 horas) el $TNF\alpha$ indujo un aumento más pronunciado en la expresión de las moléculas HLA-DR, CD86, CD83 y CD18, tal como fuera previamente descrito por otros autores (**figura 32b**).

Resultados

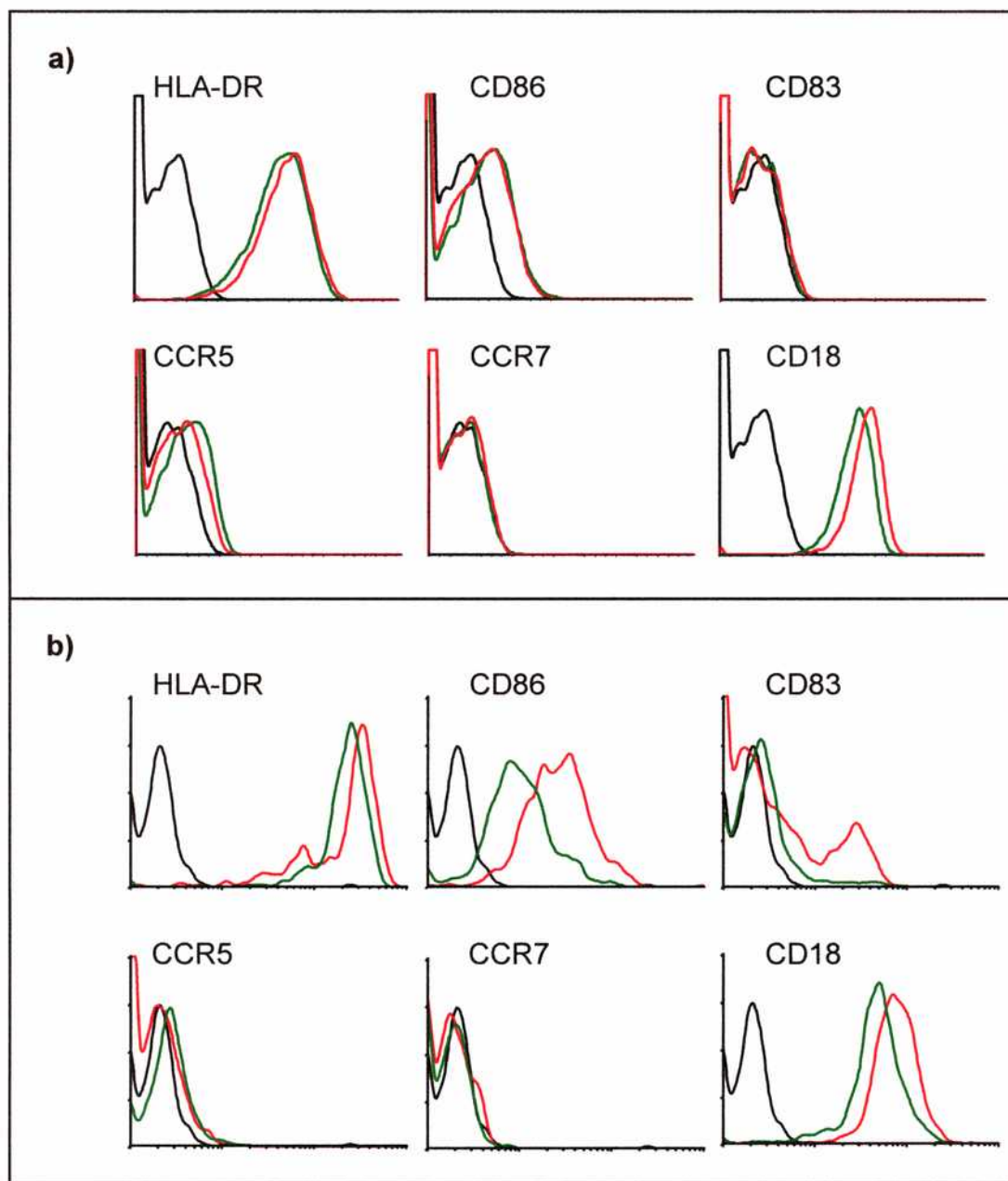


Figura 32: Expresión de moléculas de superficie en moDC adherentes y no adherentes a fibronectina. Las células recuperadas luego de un ensayo de adhesión a FN fueron inmunomarcadas (a) inmediatamente o (b) luego de 16 horas. Cada gráfico muestra la expresión en moDC adherentes (línea verde) superpuesta con el mismo marcador presente en moDC no adherentes (línea roja) y el control isotípico correspondiente (línea negra). En los histogramas se representa en el eje "x" el logaritmo de la intensidad de fluorescencia y en el eje "y" el número de células. La fluorescencia de cada muestra fue analizada por citometría de flujo, excluyendo a las células muertas con yoduro de propidio.

Resultados

También se examinó la presencia de diferencias en la producción de citoquinas entre estas dos poblaciones celulares. En la **figura 33** se observa que los niveles de expresión intracitoplasmáticos de IL12 fueron mayores en las moDC no adherentes comparadas con las adheridas a FN.

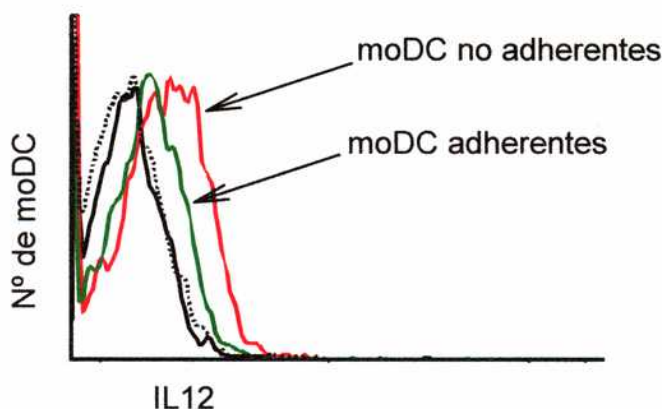


Figura 33: Contenido de IL12 en moDC adherentes y no adherentes a fibronectina. Las células tratadas con $TNF\alpha$ fueron utilizadas en un ensayo de adhesión. Luego de 45 minutos se recuperaron las moDC adherentes y no adherentes y se sometieron a una marcación intracitoplasmática para IL12. En el gráfico se representa la expresión de IL12 en moDC no adherentes a FN (histograma rojo) superpuesta con la expresión en células adherentes (histograma verde) y con el control isotípico (línea negra continua y discontinua). La fluorescencia de cada muestra fue analizada por citometría de flujo. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos adicionales.

II. 4. b. Efecto de la hiperosmolaridad

Además de las citoquinas, otros factores del microambiente celular pueden modular la fisiología de las DC. A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de adhesión celular a proteínas de MEC en presencia de medios hiperosmolares, se decidió evaluar la capacidad inmunoestimuladora de las moDC sometidas a un aumento en la osmolaridad extracelular (460 mOsm, 1 hora). En la **figura 34** se observa que a diferencia de lo observado para el $TNF\alpha$, el aumento de la osmolaridad extracelular inhibe la capacidad de las moDC para estimular la proliferación de linfocitos T alogeneicos.

Resultados

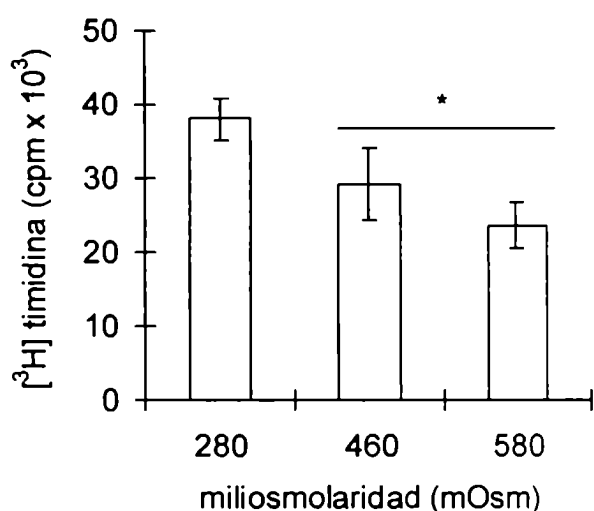


Figura 34: Efecto de la hiperosmolaridad sobre la capacidad inmunostimuladora de moDC. Las células sometidas a un aumento de la osmolaridad (460 y 580 mOsm, 60 minutos a 37°C) fueron empleadas como células estimuladoras en un cultivo mixto leucocitario. La proliferación se cuantificó por incorporación de [³H]timidina. Los resultados se expresan en cpm y se graficó la media \pm DS de un experimento representativo de tres. * $p < 0,05$ comparado con el tratamiento iso-osmolar (280 mOsm), empleando el test de Dunnett.

Los cambios responsables de la inhibición de la proliferación en el cultivo mixto leucocitario también fueron examinados analizando la expresión de algunas de las moléculas de superficie y la producción de citoquinas. En la **tabla III** se observa que el tratamiento hiperosmolar no modificó la expresión de ninguna de las moléculas analizadas, no se alteró ni la intensidad de fluorescencia ni el porcentaje de expresión (no mostrado).

	miliosmolaridad (mOsm)		
	280	460	580
HLA-DR (n=7)	2090 \pm 146	1724 \pm 252	1912 \pm 187
HLA-I (n=5)	2109 \pm 207	1717 \pm 208	1786 \pm 170
CD18 (n=4)	1116 \pm 42	1190 \pm 59	1122 \pm 102
CD54 (n=2)	1424 \pm 101	1518 \pm 19	1411 \pm 163
CD86 (n=6)	1003 \pm 90	951 \pm 100	920 \pm 114

Tabla III: Efecto de la hiperosmolaridad sobre la expresión de moléculas de superficie. Se realizó una inmunofluorescencia indirecta en moDC sometidas a un tratamiento hiperosmolar (460 y 580 mOsm, 60 minutos a 37°C). En la tabla se representan el promedio de la IFM \pm ES para los distintos marcadores de cuatro experimentos.

Resultados

La menor proliferación también podría ser consecuencia de la expresión de citoquinas inhibitorias o la inhibición de citoquinas inductoras de la proliferación linfocitaria. Para discriminar cual de estos mecanismos tiene lugar, se evaluó la producción de TGF β , IL10 e IL12 por moDC previamente sometidas a un aumento de la osmolaridad extracelular (460 y 580 mOsm, 1 hora). Los niveles de TGF β fueron indetectables en todos los tratamientos, mientras que para IL10 no se encontraron diferencias significativas (**figura 35**).

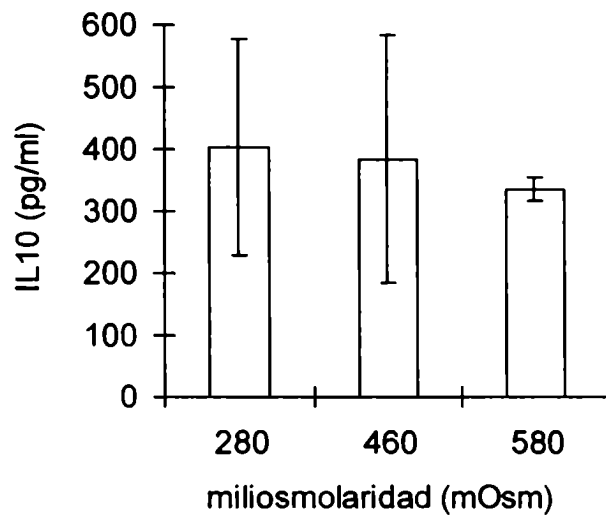


Figura 35: Efecto de la hiperosmolaridad sobre la producción de IL10 en moDC. Las células fueron tratadas con medios hiperosmolares (60 minutos a 37°C) y luego cultivadas durante 48 horas en medio adecuado para el crecimiento de moDC. Transcurrido este período se recuperó el sobrenadante de dichos cultivos y se lo utilizó para la medición de IL10 por ELISA. Se graficó la media \pm ES de dos experimentos. Los datos se analizaron mediante un ANOVA y el test de Dunnett.

En cuanto a la IL12, se observó una disminución en su producción cuando las células fueron sometidas a un aumento de la osmolaridad extracelular. Los niveles de IL12 producidos fueron cuantificados por ELISA (**figura 36a**) y el resultado fue confirmado por *Western blot* (**figura 36b**). Es importante señalar que para inducir la producción de esta citoquina fue necesario la estimulación previa de las moDC con LPS.

Resultados

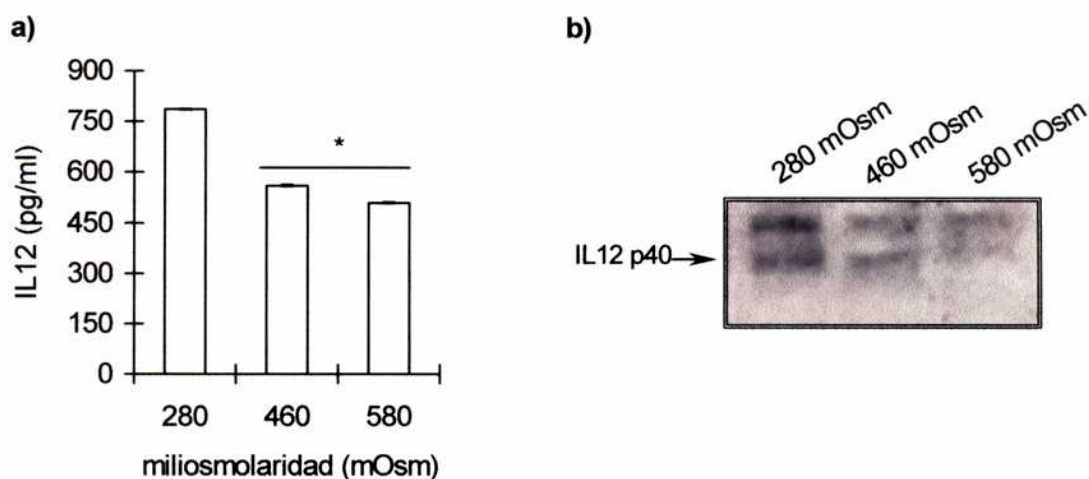


Figura 36: Efecto de la hiperosmolaridad sobre la producción de IL12 por moDC. Las células previamente estimuladas con LPS (100ng/ml, 2 horas a 37°C) fueron sometidas a un aumento de la osmolaridad (60 minutos a 37°C) y luego cultivadas en un medio adecuado para el crecimiento de moDC suplementado con LPS e IFN γ . Un grupo se cultivó durante 48 horas, tras lo cual se recuperó el medio condicionado por las células y se lo utilizó para la cuantificación de IL12 por ELISA (a). Otro grupo de células fue cultivado durante 6 horas previas a su procesamiento para la obtención de extractos proteicos para *Western blot* (b), según se describe en materiales y métodos. * $p < 0,05$ comparado con el tratamiento iso-osmolar (280 mOsm). Los datos se analizaron mediante un ANOVA y el test de Dunnett.

II. 4. c. Rol de CD80 en la capacidad inmunoestimuladora de moDC

Las moléculas coestimuladoras clásicas pertenecientes a la familia de las moléculas B7 son CD80 y CD86. Actualmente existe un número creciente de nuevas moléculas a las que se les atribuye un papel relevante en la activación de células T. Aunque estos nuevos hallazgos muestran la redundancia del sistema inmune, las moléculas B7 no dejan de tener un rol clave en la regulación de la capacidad inmunoestimuladora de las DC. Las diversas poblaciones de DC caracterizadas en diferentes publicaciones, normalmente expresan CD80 y CD86. Sin embargo, las moDC utilizadas en el presente trabajo carecen o presentan muy bajos niveles de expresión de la molécula CD80. Una de las diferencias principales entre el protocolo empleado para la generación de DC en este trabajo y los publicados por otros autores, es la utilización de suero humano (SH) en lugar de suero bovino fetal (SBF).

Resultados

Para verificar si las diferencias observadas pudiesen deberse al suero empleado, se generaron DC en presencia de SH o de SBF y luego se comparó la expresión de las moléculas coestimuladoras. En la **figura 37** se observa que las moDC cultivadas en presencia de SBF (moDC-SBF) expresaron CD80 a diferencia de las moDC cultivadas con SH (moDC-SH). Sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión de CD86, la cual fue elevada en ambos tipos celulares.

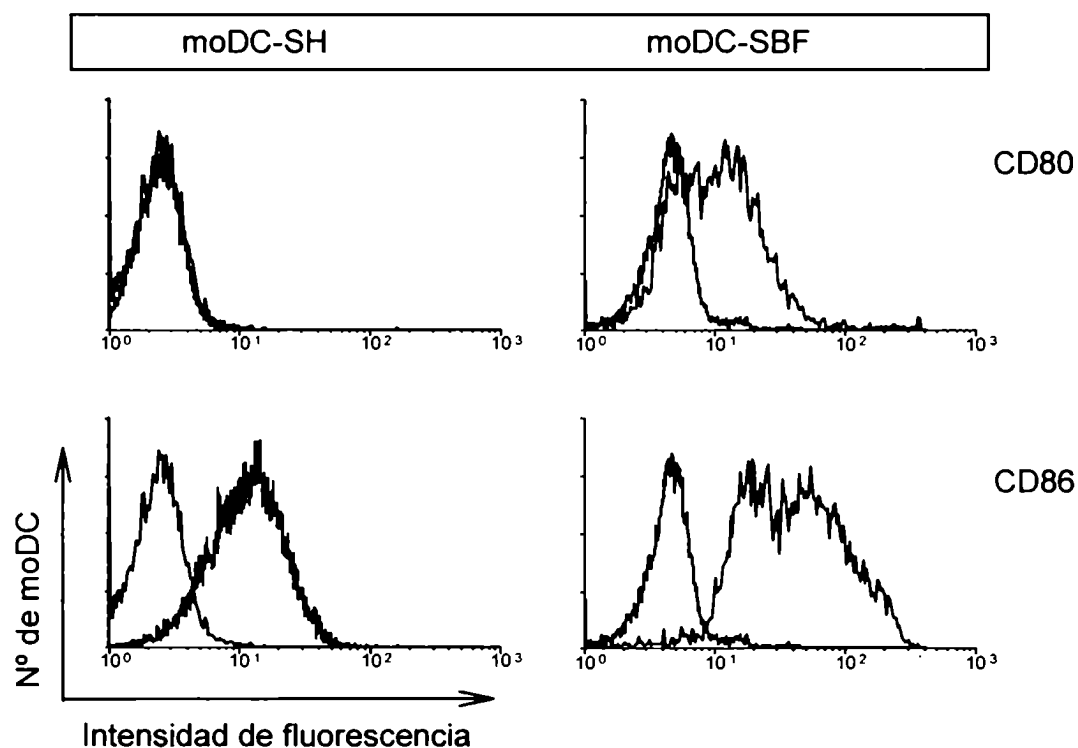


Figura 37: Expresión de moléculas coestimuladoras en moDC. Se realizó una inmunofluorescencia para CD80 y CD86. En cada histograma se representa el marcador analizado (línea azul para CD80 y verde para CD86) superpuesto con el control negativo (línea negra) correspondiente. La fluorescencia de cada muestra fue analizada por citometría de flujo, excluyendo a las células muertas con yoduro de propidio.

A partir de la diferencia obtenida en la expresión de CD80 entre ambas poblaciones celulares, se evaluó la capacidad inmunoestimuladora de estas moDC. Se analizó la inducción de una respuesta inmune alogeneica, realizando un cultivo mixto leucocitario y la generación de una respuesta inmune secundaria frente a un antígeno específico empleando toxoide tetánico (TT). A pesar de la distinta

Resultados

expresión de CD80, no se observaron diferencias significativas en la inducción de la respuesta proliferativa de células T alogeneicas entre las moDC-SBF y las moDC-SH (figura 38).

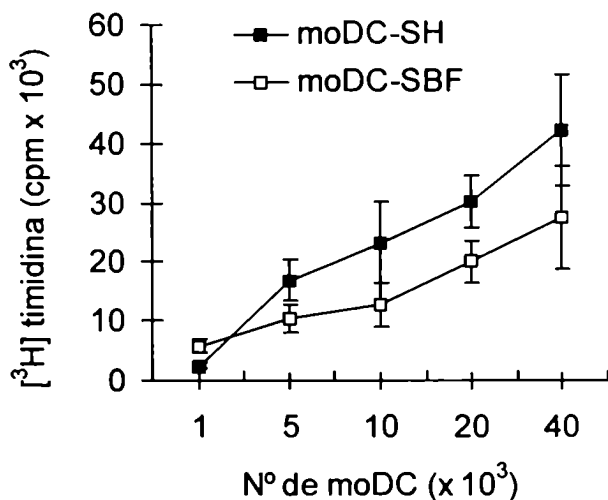


Figura 38: Capacidad inmuno-estimuladoras de poblaciones diferentes de moDC. Las células generadas en presencia de SH (moDC-SH) o SBF (moDC-SBF) fueron empleadas como células estimuladoras en un cultivo mixto leucocitario. La proliferación se cuantificó por incorporación de [^3H]timidina. Se graficaron las cpm \pm DS de un experimento representativo de tres.

En cambio fue posible observar que las moDC-SBF preincubadas con TT indujeron una mayor proliferación de células T singeneicas comparadas con las moDC-SH (figura 39a) en siete de nueve donantes de precursores de moDC. Como medida adicional de proliferación celular se cuantificó la producción de IFN γ por los linfocitos T respondedores. En forma similar a lo observado para la incorporación de [^3H]timidina, se detectaron mayores niveles de IFN γ (figura 39b) en las respuestas inducidas por moDC-SBF comparadas con las moDC-SH (moDC-SBF: 919 ± 150 pg/ml vs moDC-SH: 336 ± 53 pg/ml, $n=4$, * $p<0,05$).

Resultados

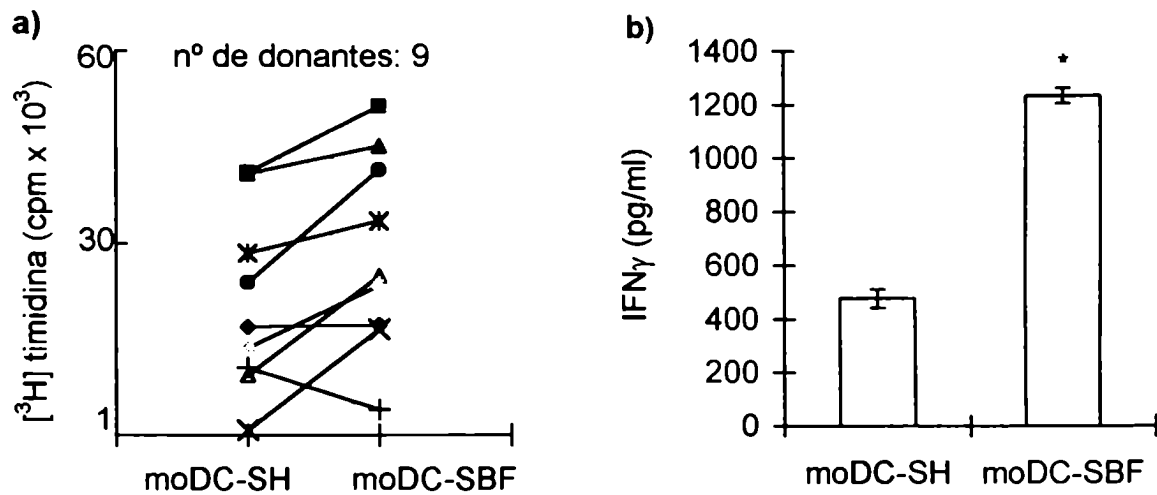


Figura 39: Inducción de respuesta secundaria frente a toxoide tetánico inducida por dos poblaciones diferentes de moDC. Las moDC-SH y moDC-SBF fueron preincubadas con TT (1 μ g/ml, 4 horas a 37°C) y luego utilizadas como células estimuladoras en un ensayo de respuesta antígeno específica. La proliferación se cuantificó por (a) incorporación de [³H]timidina, (b) medición por ELISA de los niveles de IFN γ producidos por los linfocitos respondedores se muestra un experimento representativo de cuatro. * p <0,05, los datos se analizaron utilizando el test de Student para muestras pareadas.

Para confirmar el rol de CD80 en la proliferación de linfocitos T antígeno específica, se realizaron experimentos de bloqueo utilizando anticuerpos monoclonales bloqueantes específicos para CD80 y CD86. En la **figura 40a** puede observarse que la proliferación inducida por moDC-SBF expuestas al TT fue parcialmente bloqueada por el anticuerpo contra CD80. Sin embargo, el mismo fue incapaz de inhibir la respuesta inducida por moDC-SH. El bloqueo fue total en presencia de un anticuerpo contra CD86 en ambos tipos celulares. Los niveles de IFN γ producido en estos medios de cultivo tuvieron un patrón similar al observado para la proliferación celular medido por incorporación de [³H]timidina (**figura 40b**).

Resultados

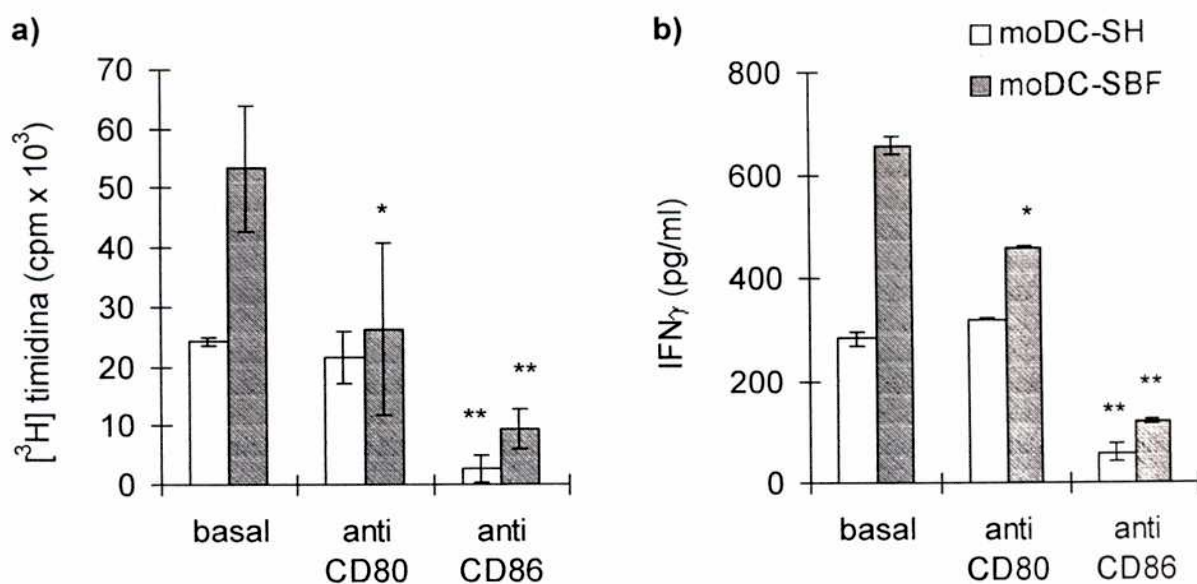


Figura 40: Bloqueo de la respuesta secundaria inducida por moDC. Las moDC-SH y moDC-SBF preincubadas con TT (1 $\mu\text{g/ml}$, 4 horas a 37°C), fueron tratadas con anticuerpos bloqueantes para CD80 y CD86 (20 $\mu\text{g/ml}$, 30 minutos a temperatura ambiente) y luego utilizadas como células estimuladoras en un ensayo de respuesta antigénica específica. La proliferación se cuantificó por: (a) incorporación de [³H]timidina, y (b) medición por ELISA de los niveles de IFN γ producidos por los linfocitos respondedores. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ comparado con la proliferación basal. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA y el test de Student Newman Kules.

Con el objeto de determinar la existencia de expresión citoplasmática de CD80 en las moDC-SH, se realizó una inmunofluorescencia intracitoplasmática para dicha molécula, analizando su expresión por microscopía confocal. Mediante esta técnica, al permeabilizar las células, es posible observar la expresión en la membrana y en el citoplasma celular. En la **figura 41** se observa que las moDC-SH permeabilizadas presentan reservorios intracelulares de CD80. Por otro lado, las moDC-SBF expresaron CD80 en membrana y en el citoplasma (no mostrado).

Resultados

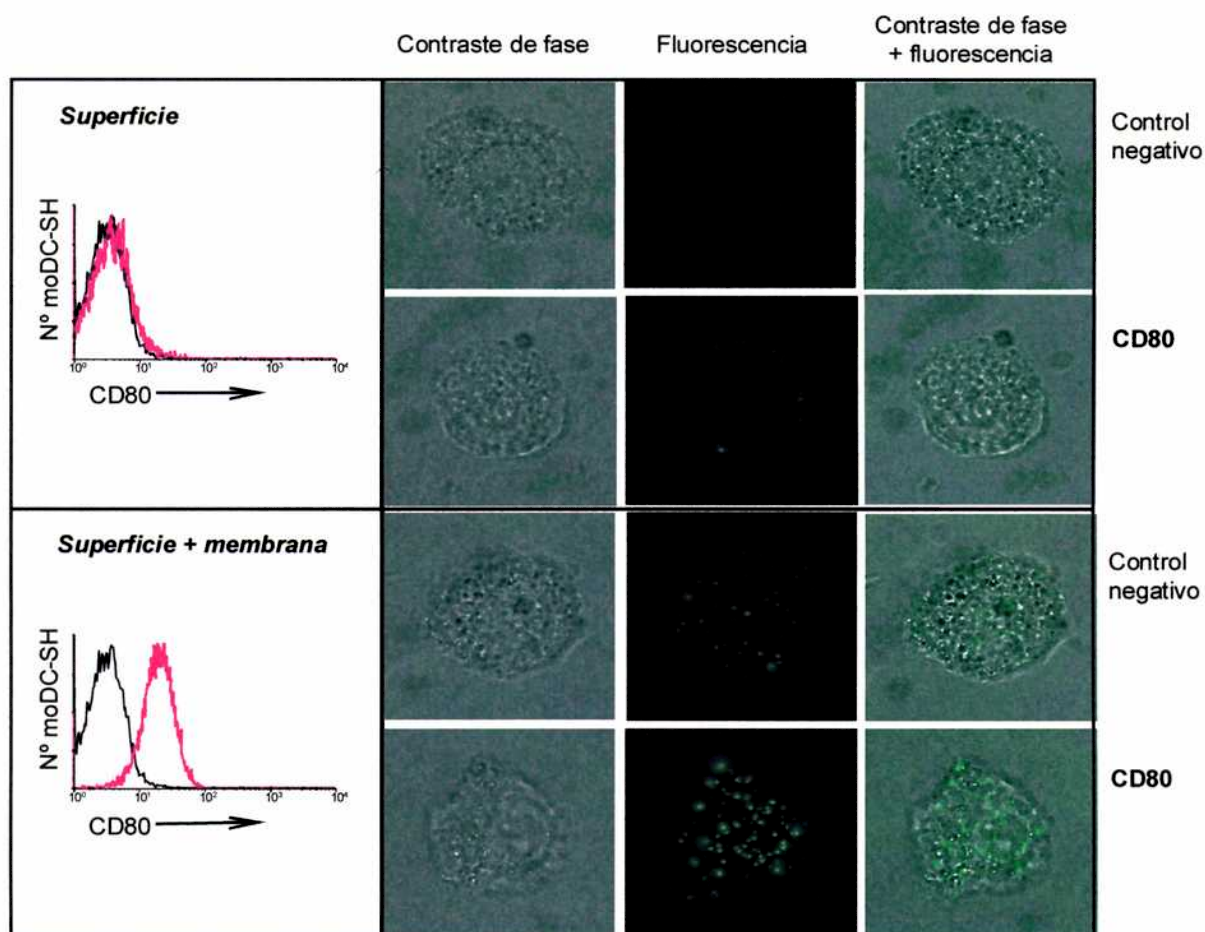


Figura 41: Expresión intracelular de CD80 en moDC-SH. Se realizó una marcación de superficie para CD80 y en forma paralela un grupo de células fue fijado y permeabilizado previo a la marcación. En los histogramas se representa el nivel de expresión de CD80 (línea roja) superpuesto con el control negativo (línea negra). En los paneles de la derecha se muestran las imágenes obtenidas por microscopía confocal, en contraste de fase, fluorescencia y la suma de ambas.

La mayor expresión de CD80 en moDC-SBF podría explicar en parte la alta eficiencia de estas células para inducir la proliferación de los linfocitos T singéneos en una respuesta inmune secundaria. Sin embargo, es posible que exista más de un factor responsable de dicho aumento. Por lo tanto, a continuación se comparó la producción de IL12 por parte de estas dos poblaciones celulares. En la **figura 42** se observa que los niveles de expresión intracitoplasmáticos de IL12 fueron mayores en las moDC-SBF comparadas con las moDC-SH. Este resultado es congruente con los

Resultados

niveles de proliferación observados para ambos tipos celulares en la respuesta antígeno específica.

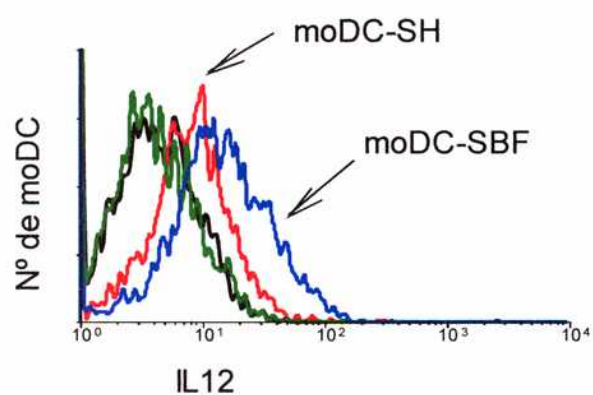


Figura 42: Contenido de IL12 en moDC-SH y moDC-SBF. En ambas poblaciones celulares se realizó una marcación intracitoplasmática para IL12. En el histograma se representa el nivel de expresión para IL12 (rojo: moDC-SH y azul: moDC-SBF) superpuesto con el control negativo (negro: moDC-SH y verde: moDC-SBF). La fluorescencia de cada muestra fue analizada por citometría de flujo.

Resultados

Discusión

Las DC inicialmente descritas por Steinman y Cohn [89] como células presentadoras de antígenos, actualmente son consideradas dentro de una familia de células con características fenotípicas y funcionales particulares. Esto se debe a la enorme heterogeneidad fenotípica y funcional y a la identificación de nuevos precursores y subpoblaciones de DC. Estas células son las más eficientes inductoras de la respuesta inmune, pero también bajo determinadas condiciones pueden generar tolerancia. El papel central de estas células en la respuesta inmune despertó un gran interés en su estudio y en su posible utilización como herramienta para el tratamiento de enfermedades que involucren alteraciones del sistema inmune. Para lograr dicho objetivo era necesario disponer de una cantidad importante de DC, para lo cual se diseñaron técnicas y protocolos con la finalidad de obtener un número considerable de estas células *in vitro*. Algunos de estos protocolos se basaban en la combinación de citoquinas que llevaban a la expansión de precursores mieloides de DC [40, 42]. A partir de las técnicas previamente descritas, en el presente trabajo de tesis se utilizó la combinación de IL4 y GM-CSF para la generación de DC a partir de monocitos de sangre periférica (moDC) [38]. La caracterización de las células obtenidas *in vitro* permitió concluir que las mismas presentan características morfológicas, fenotípicas y funcionales (figuras 1, 2, 3) compatibles con las observadas en las DC inicialmente descritas por Steinmann y Cohn [89].

Desde su generación en médula ósea hasta su interacción con linfocitos T en los ganglios linfáticos, las DC deben atravesar por distintos microambientes. Esto involucra su interacción con las diversas matrices extracelulares, con células y citoquinas presentes en los tejidos. Por ejemplo, una vez que los precursores salen de la médula ósea y entran a la circulación general, pueden colonizar los tejidos no linfáticos periféricos; durante este proceso hay adhesión y migración a través de las células endoteliales. La interacción entre las DC y el endotelio fue evaluada en el presente trabajo utilizando las moDC y células endoteliales obtenidas a partir de vena de cordón umbilical humano (HUVEC). Los resultados revelan que al igual que para otros leucocitos, en esta interacción participan las moléculas CD18, CD29 y CD31 expresadas sobre las moDC (figura 5). Sin embargo, también fue posible bloquear parcialmente esta adhesión con un anticuerpo dirigido contra CD49e. A

Discusión

partir de trabajos previos donde se demuestra la presencia de FN sobre ciertos tipos celulares[90], es posible postular una interacción entre la molécula CD49e expresada por las moDC y la FN presente sobre el endotelio. Dado que fue imposible obtener un bloqueo total de la adhesión, es probable que otras moléculas estén involucradas en el proceso. Otros autores también han examinado estos mecanismos utilizando otros tipos de DC. Brown y colaboradores [91] observaron la participación de las integrinas CD18 y CD49d en la adhesión de DC (obtenidas directamente de sangre periférica) a HUVEC. En este caso, a diferencia de los resultados obtenidos con las moDC, el bloqueo de dichas moléculas se tradujo en una disminución de la adhesión del 70 %. Sin embargo, otros autores han demostrado que la interacción de DC derivadas de monocitos (diferenciadas en presencia de IL13 y GM-CSF) con células endoteliales esta mediada por CD11a y CD11b [92]. Esto refuerza la idea que las moléculas involucradas en la adhesión de las DC a endotelio probablemente depende del tipo y estado de maduración de las células utilizadas. Pero también es importante tener en cuenta que para los experimentos de bloqueo realizados en este trabajo se utilizó un anticuerpo contra CD29. Esta molécula corresponde a la cadena $\beta 1$ común a la mayoría de las cadenas α de las integrinas y su bloqueo lleva al boqueo de todas las cadenas α que se combinan con CD29, entre ellas CD49d ($\alpha 4$ integrina) y CD49e ($\alpha 5$ integrina). Sin embargo, recientemente también se ha descripto que CD49d puede asociarse a la cadena $\beta 7$ integrina. Por lo tanto, es más factible que la ausencia de bloqueo total se deba a la participación de otras moléculas. Además, estos resultados confirman la redundancia del sistema, donde varios receptores cumplen el mismo rol.

La adhesión de leucocitos al endotelio vascular se exagera en un foco inflamatorio, debido a la liberación de citoquinas como el $TNF\alpha$ e IL1, que al actuar sobre las células endoteliales inducen la expresión de algunas moléculas de adhesión [16, 93]. Para el caso de las DC, también ocurre un fenómeno similar (figura 6). La estimulación del endotelio con $TNF\alpha$ aumentó la adhesión de moDC al mismo. A pesar de no examinar las moléculas involucradas en este mecanismo, es posible que los ligandos de CD18 y CD29 estén involucrados. Por ejemplo, una de las moléculas neoexpresadas por el endotelio activado es VCAM-1, cuyo ligando

Discusión

leucocitario es CD29/CD49d y β 7/CD49d [94, 95]. Otra molécula que podría ser importante en la adhesión de moDC al endotelio activado es ICAM-1. Esta molécula aumenta su expresión sobre el endotelio activado siendo CD18 el ligando leucocitario presente sobre las moDC. En general, los resultados obtenidos sugieren que, al igual que para otros leucocitos las moDC serían capaces de adherirse con mayor eficiencia al endotelio activado.

Posteriormente a la adhesión de las moDC a las células endoteliales tiene lugar un proceso de migración a través de las mismas. En forma similar a lo observado en la adhesión, la activación de las células endoteliales con $\text{TNF}\alpha$ aumentó la migración transendotelial (figura 7). Sin embargo, el resultado es distinto cuando se analiza el efecto del $\text{TNF}\alpha$ sobre las moDC (figura 8). En general el tratamiento de polimorfonucleares y monocitos con citoquinas proinflamatorias aumentan la capacidad de adhesión de estas poblaciones leucocitarias. Paradójicamente, el tratamiento de las moDC con $\text{TNF}\alpha$ disminuyó la capacidad adhesiva de estas células al endotelio. Esto puede entenderse en el contexto fisiológico de las moDC, en el cual la maduración celular inducida con citoquinas inicia el mecanismo de migración hacia el ganglio linfático regional. Pero también se puede considerar desde el punto de vista fisiopatológico, en donde una prematura maduración de los precursores de DC en sangre periférica por acción del $\text{TNF}\alpha$, impediría la adhesión y migración transendotelial y la colonización de los tejidos periféricos. La caracterización de las moléculas que participan en este fenómeno resulta difícil ya que dos de las moléculas involucradas en la adhesión de las moDC a endotelio (CD31 y CD18) presentan cambios opuestos en los niveles de expresión; en tanto CD31 disminuye, CD18 aumenta su expresión sobre las moDC tratadas con $\text{TNF}\alpha$ (figura 9). Es posible especular que el efecto inhibitorio del $\text{TNF}\alpha$ sobre la adhesión de moDC a endotelio, es mediado por la disminución en la expresión de CD31 y que CD18 no cumple un rol relevante, ya que a pesar del aumento en su expresión no se observó mayor adhesión a células endoteliales. Sin embargo, como se mencionó previamente existe un porcentaje importante de adhesión de moDC que no está mediado por CD18 ni CD31. Las otras moléculas que presentan un rol en la adhesión de las moDC a endotelio son CD29 y CD49e, pero éstas no modificaron

Discusión

su expresión por acción del $\text{TNF}\alpha$. Sin embargo, es importante señalar que muchas de las integrinas modifican su función alterando el estado de activación sin modificar su nivel de expresión. Este mecanismo parecería factible, ya que como se vio en el caso de la adhesión a FN, es posible revertir el efecto inhibitorio del $\text{TNF}\alpha$, utilizando activadores de integrinas como el PMA (figura 20).

A partir de estos resultados se puede establecer una relación entre el estado de maduración y la distribución celular en los diferentes órganos y tejidos. Por ejemplo, en un tejido inflamado es necesaria la presencia de DC inmaduras capaces de captar y procesar antígenos. Si durante su circulación las células inician en forma prematura el proceso de maduración, éstas no llegarían al tejido o al foco inflamatorio, pero en el caso que sí lo hicieran, éstas no podrían incorporar eficientemente antígenos. Hotchkiss y colaboradores observaron que en pacientes sépticos, con altos niveles séricos de $\text{TNF}\alpha$, ocurre una depleción de las DC residentes en bazo. Esto podría tener un impacto sobre el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa y podría explicar en parte la inmunodepresión observada en estos pacientes [96]. Esta depleción se podría deber a una mayor emigración desde los tejidos periféricos y a la ausencia de reclutamiento.

En los tejidos periféricos las moDC interactúan con las proteínas constituyentes de la MEC. En este trabajo se pudo comprobar la capacidad de adhesión de las moDC a FN, LM y Col tipo IV (figura 13). La interacción con FN fue totalmente dependiente de la expresión de CD29 y CD49e (figura 14a). El otro ligando para FN, CD49d no parece tener un rol en la adhesión de la moDC a esta proteína. En tanto que CD49e se une a través de la secuencia Arg-Gly-Asp, CD49d se asocia a los dominios CS-1 y CS-5 de la FN [97]. Es importante señalar que se ha descrito la neoexpresión de CD49d en moDC recién a las 48 horas de haber sido estimulada con $\text{TNF}\alpha$ o LPS [98]. Esta expresión no sería relevante en la emigración de las DC desde los tejidos periféricos hacia el ganglio linfático, ya que este proceso comienza aproximadamente a las 4 horas de estimulada la DC. La adhesión a LM es mediada principalmente por las moléculas CD49c y CD49f (figura 14b). Además, existen evidencias sobre el rol de CD49f en la migración de células de Langerhans a través de proteínas de MEC [99]. Sin embargo, en el presente trabajo, no fue posible bloquear la adhesión de las moDC a LM con anticuerpos bloqueantes para CD49f.

Discusión

En cambio se obtuvo un bloqueo parcial cuando se utilizó el anticuerpo para CD49c. Sin embargo el rol de estas moléculas queda en evidencia cuando se bloquean simultáneamente, sugiriendo un rol para ambas integrinas en la unión de las moDC a LM. Este fenómeno ha sido descrito para otras moléculas como por ejemplo CD18 y CD49d [82] y se debería a la disponibilidad de receptores y sus ligandos. Otra explicación posible sería a través de mecanismos de transducción de señales intracelulares [100] capaces de regular la afinidad de las integrinas por sus ligandos [101]. En el caso de las integrinas estos mecanismos han sido bien estudiados, describiéndose la modulación de la actividad de integrinas por señales originadas desde el interior celular (inside-out) o desde el exterior (outside-in).

Como se ha mencionado, la señalización a través de citoquinas como el $\text{TNF}\alpha$ modifica la adhesión de las moDC al endotelio. Este fenómeno también se observa en la adhesión a FN y LM, pero no a Col tipo IV (figura 15). Estas diferencias dependientes de la proteína de MEC analizada, evidencian la especificidad de la acción del $\text{TNF}\alpha$, modulando selectivamente la adhesión celular a FN y LM pero no a COL tipo IV. Aparentemente, esta citoquina estaría modulando el estado de actividad de los receptores de LM y FN y no la intensidad de fluorescencia media o el porcentaje de expresión de las mismas (tabla II) ya que en las moDC tratadas con $\text{TNF}\alpha$ no se observan cambios en estos dos parámetros. En el caso de modificarse la actividad de las integrinas, podría alterarse la afinidad de las mismas por sus ligandos. Dos posibles modelos para la modificación de la afinidad son: cambios conformacionales en la porción extracelular de las subunidades de integrinas; o disociación de la interacción de las integrinas con el citoesqueleto. Se postula que la fosforilación de residuos de tirosina y serina/treonina sería el mecanismo involucrado en ambos [102]. Para la adhesión de moDC, estos mecanismos parecen ser responsables de la menor adhesión a FN y LM ya que un activador inespecífico como es el PMA revierte el fenómeno (figura 20). El PMA induce fosforilación de proteínas intracelulares y estimula la asociación de los dominios citoplasmáticos de las integrinas a la actina del citoesqueleto, lo cual favorece cambios en la conformación de los dominios extracelulares de las mismas [103, 104]. La nueva conformación de la integrina permite la asociación de las mismas a sus ligandos [97]. El efecto del PMA sobre las moDC no adherentes a FN tratadas con $\text{TNF}\alpha$,
Discusión

sugiere que la citoquina podría modificar la capacidad de adhesión celular a FN por inactivación de las integrinas involucradas en dicha interacción (CD49e). Sin embargo, su acción inespecífica impide descartar la activación de otras integrinas capaces de reemplazar la acción de CD49e, en la interacción moDC-FN.

En general los resultados obtenidos con $\text{TNF}\alpha$ sobre la adhesión y la migración (figuras 15 y 16) de las moDC a través de proteínas de MEC están de acuerdo con otros resultados obtenidos *in vivo*, donde se demuestra que el $\text{TNF}\alpha$ favorece la migración de las células de Langerhans desde la epidermis hacia los ganglios linfáticos periféricos [87, 88]. Este fenómeno es compartido por otras citoquinas proinflamatorias como la $\text{IL1}\beta$. Aparentemente, el efecto de estas citoquinas sobre la adhesión de moDC a FN, no sería sinérgico ya que el tratamiento simultáneo con ambas citoquinas no incrementa la inhibición en la adhesión de moDC a FN (figura 25), posiblemente porque ambas actúen sobre la misma vía de señalización en las moDC.

El $\text{TNF}\alpha$ no sólo disminuyó la adhesión de las moDC a endotelio y a proteínas de matriz extracelular, sino que también provocó una leve disminución en la interacción con una línea celular tumoral (figura 18). Las células tumorales son capaces de liberar diversos factores entre los que se encuentran las citoquinas [46, 105], es posible que uno de los mecanismos para evadir la respuesta inmune por parte del tumor sea la secreción de moléculas capaces de modificar la función de las células presentadoras de antígenos. De este modo una DC prematuramente activada, por ejemplo por acción del $\text{TNF}\alpha$, será menos eficiente para captar antígenos asociados al tumor.

El $\text{TNF}\alpha$ es una citoquina altamente pleiotrópica que media sus efectos a través de dos receptores diferentes, el receptor de tipo I (RTNF I o p55) y el de tipo II (RTNF II o p75). Ambos son miembros de una superfamilia de receptores que presentan dominios extracelulares similares, pero diferentes porciones intracelulares lo cual sugiere que cada uno de ellos transmite una señal diferente e independiente [63]. Varios de los efectos del $\text{TNF}\alpha$ están mediados a través del RTNF I, siendo uno de los principales la inducción de apoptosis [63, 106]. Muchas células expresan tanto el RTNF I como el RTNF II, pero su nivel de expresión varía dependiendo del tipo

Discusión

celular. En células hematopoyéticas como macrófagos y linfocitos hay expresión predominante del RTNF II, mientras que las células no hematopoyéticas como fibroblastos y endotelio expresan el RTNF I [107]. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que las células de Langerhans expresan sólo el RTNF II disminuyendo luego de 72 horas de cultivo [108, 109]. Sólo un porcentaje variable de moDC expresaron el RTNF II (figura 18) al igual que las células de Langerhans. Esto explicaría, en parte, los débiles efectos del $TNF\alpha$ sobre la moDC. Para la adhesión, sólo las moDC que expresan el TNFR II serían capaces de desadherirse de FN y LM en respuesta al estímulo con $TNF\alpha$. De esta manera las células que no llegan a adherirse a FN se encontrarían en un estado de maduración mayor al de las moDC adheridas a la matriz. Esta especulación se corrobora dada la mayor capacidad estimuladora de linfocitos T de las células no adheridas comparadas con las adheridas (figura 30).

En las moDC algunos de los efectos del $TNF\alpha$ estarían mediados a través de cambios en los niveles de AMPc. Tanto la adhesión como el contenido de AMPc presentan una curva dosis respuesta invertida (figura 21). Este mecanismo ya descrito en la migración de DC [87] podría ser explicado por la existencia de clivaje del receptor de $TNF\alpha$, que se manifiesta como una menor expresión del mismo luego de la activación celular con la citoquina (figura 19). Los receptores solubles que surgen de este clivaje podrían modular en forma positiva o negativa la actividad del $TNF\alpha$ [110, 111] como fuera descrito para otros tipos celulares.

En otros tipos celulares también se ha descrito una relación entre el efecto del $TNF\alpha$ y los niveles de AMPc intracelulares [68, 71]. En particular, en células endoteliales se observó un aumento en la actividad de la enzima fosfodiesterasa (PDE) en respuesta al tratamiento con dicha citoquina. Es probable que un mecanismo similar opere para las moDC, ya que un inhibidor de la PDE revirtió el efecto inhibitorio del $TNF\alpha$ sobre la adhesión a FN (figura 22).

Las diferencias en los niveles de AMPc se ponen también en evidencia al comparar las moDC tratadas con $TNF\alpha$ que permanecen adheridas versus las que se despegan de la FN, siendo menor en estas últimas (figura 23). Diferentes tratamientos que llevan al aumento del contenido de AMPc permitieron confirmar el

Discusión

papel del mismo en la adhesión. Por ejemplo, el tratamiento de las moDC no adherentes a FN (que presentan menores niveles de AMPc) con análogos del nucleótido cíclico incrementó la adhesión de las células a FN (figura 24). Sin embargo, no fue posible observar un aumento de la adhesión en aquellas moDC que ya presentaban niveles mayores de AMPc (células adheridas o controles). Aparentemente, existe un nivel basal del mismo que sería suficiente para mantener a las integrinas en un estado activado y permitir la adhesión de las células. Estas moDC presentarían un comportamiento opuesto a las DC dérmicas, ya que se ha demostrado que un aumento en el contenido de AMPc promueve la migración de las células desde la piel a las placas de Peyer [112]. La activación de la proteína quinasa A (PKA) por el AMPc regula diversas funciones, entre ellas la adhesión celular, la organización del citoesqueleto y la formación de los puntos de adhesión focal [113]. El contacto de las integrinas con su ligando modula la activación de PKA generando un aumento o una disminución en el contenido intracelular de AMPc [114]. La relación entre los niveles de AMPc y las propiedades de adhesión dependerán de cada tipo celular, del estado de activación y de la localización de PKA en los diferentes compartimentos subcelulares [115].

La relación entre la disminución del contenido de AMPc y la inhibición de la adhesión, ambos inducidos por el $TNF\alpha$, podría tener implicancias fisiológicas. Las DC inmaduras residentes en los tejidos periféricos presentan gran capacidad para adherirse a las proteínas de MEC, bajo o indetectable niveles de IL12 y además, baja actividad de la PDE4 [116]. El $TNF\alpha$ liberado durante un proceso inflamatorio inicia la maduración de las DC. Durante la misma podría aumentar la actividad de la PDE, resultando en una disminución en los niveles de AMPc, en la producción de IL12, en la interacción con proteínas de MEC y en la migración hacia los ganglios linfoides secundarios. De acuerdo con esta hipótesis, se ha reportado que el aumento de los niveles AMPc empleando análogos o inhibiendo a PDE4 inhibe la liberación de $TNF\alpha$ y suprime la presentación antigénica en DC. Estos efectos correlacionan con un aumento en la producción de IL10 [66], citoquina que antagoniza los efectos de la IL12.

Discusión

Hasta aquí, dos son los aspectos más importantes del efecto del $\text{TNF}\alpha$ en este trabajo. En primer lugar, el tiempo de estimulación necesario para observar los cambios inducidos por la citoquina. En la mayoría de los trabajos, estudian los efectos del $\text{TNF}\alpha$ luego de 24-48 horas de estimulación y observan fundamentalmente cambios en la expresión de las moléculas coestimuladoras. En los experimentos presentados en esta tesis, el corto (30-60 minutos) tratamiento con la citoquina no permitió evidenciar cambios en los niveles de expresión de las moléculas coestimuladoras ni en los marcadores de maduración (figura 32a), sin embargo es posible observar disminución de AMPc, desadhesión de proteínas de MEC y aumento de la IL12 (figura 33); citoquina fundamental para el desarrollo de respuestas inmunes inflamatorias. El segundo aspecto a tener en cuenta es la baja concentración de $\text{TNF}\alpha$ necesaria para observar los fenómenos y la pérdida del efecto a concentraciones mayores. Esto último pondría en jaque la relevancia de estos mecanismos en los procesos inflamatorios en donde existe una alta concentración de $\text{TNF}\alpha$. Sin embargo, las bajas concentraciones del mismo podrían ser importantes en la inducción de un flujo continuo de DC hacia el ganglio linfático en los tejidos no inflamados [117].

Los leucocitos pueden responder a estímulos inespecíficos distintos al $\text{TNF}\alpha$ o a los lipopolisacáridos, como son por ejemplo las variaciones en la osmolaridad. Las células de mamíferos suelen estar expuestas a condiciones hiperosmolares en diferentes situaciones, por ejemplo, en los túbulos distales del riñón, o durante aumentos séricos de los niveles de sodio [118]. Las soluciones hipertónicas pueden provocar la activación de varios de los caminos de transducción de señales inflamatorias en respuesta al stress. Rizoli y colaboradores demostraron que los neutrófilos sometidos a un aumento osmolar cambian sus propiedades de adhesión y migración [119]. Por otro lado, Junger y colaboradores mostraron que el tratamiento hiperosmolar de células mononucleares incrementa la capacidad estimuladora de la proliferación de células T [120]. A diferencia de lo observado para las células mononucleares, donde los monocitos constituyen la mayor parte de las células presentadoras de antígenos, las moDC sometidas a medios hiperosmolares presentaron una menor capacidad inmunoestimuladora (figura 34). Este efecto estaría mediado en parte por la menor producción de IL12 (figura 36), ya que no se

Discusión

observaron cambios en la expresión de las moléculas involucradas en la interacción DC-linfocito T (HLA-DR, HLA-I, CD86 y CD54) (tabla III). Sin embargo, es importante mencionar que no fue posible analizar todas las moléculas que participan en la interacción con las células T, entre ellas CD43 y CD48. Por lo tanto resta conocer si el aumento de la osmolaridad ejerce efectos regulatorios sobre la expresión de dichas moléculas. También se debe tener en cuenta que las células fueron menos eficientes en su capacidad para incorporar antígenos (figura 11), medido por captación de dextrán-FITC. Probablemente la pérdida de volumen celular en respuesta al aumento de la osmolaridad ejerce un efecto opuesto a la incorporación de fluidos que tiene lugar durante la endocitosis. Además, se sabe que la hiperosmolaridad provoca cambios en la morfología celular que resultan en rearrreglos del citoesqueleto con implicancias en la distribución espacial de componentes intracelulares, como por ejemplo proteínas de la cascada de señalización celular [121, 122]. La correcta polimerización de las fibras de stress no sólo es importante para la transducción de señales, la transcripción de genes y la translocación de proteínas, sino que también es necesaria para permitir el contacto estable entre las DC y los linfocitos T [54]. Esta interacción se conoce con el nombre de "sinapsis inmunológica" y su formación es crucial para la activación de las células T [123]. Sobre la base de estas evidencias, se podría postular que el tratamiento hiperosmolar de las moDC aumentaría la desorganización del citoesqueleto, impidiendo la formación de agregados viables con las células T, su posterior activación y proliferación. La integridad del citoesqueleto también es crítica para la óptima adhesión y migración celular [124] y la falta de polimerización de las fibras de stress también podría ser responsable de la menor adhesión observada en las moDC sometidas a tratamientos hiperosmolares (figuras 26 y 27).

Tanto la hiperosmolaridad como el $\text{TNF}\alpha$ son estímulos capaces de iniciar el proceso de migración. Sin embargo, mientras el $\text{TNF}\alpha$ desadhiere células con mayor capacidad inmunoestimuladora, aparentemente la hiperosmolaridad genera células con baja capacidad estimuladora de linfocitos T. Este efecto del aumento de la osmolaridad también ha sido descrito para otros leucocitos. El tratamiento hiperosmolar inhibe la respuesta de macrófagos alveolares a endotoxinas [121], e induce el clivaje de CD11b en neutrófilos [125]. Estos efectos moduladores de la

Discusión

respuesta inmune son de importancia terapéutica en diversas patologías como el síndrome de distress respiratorio del adulto y el daño de la isquemia por reperfusión, donde la activación celular exacerbada genera daño tisular [126].

En conjunto, los resultados descritos hasta aquí se pueden integrar en el esquema de tráfico de DC de la siguiente manera (**figura 1**):

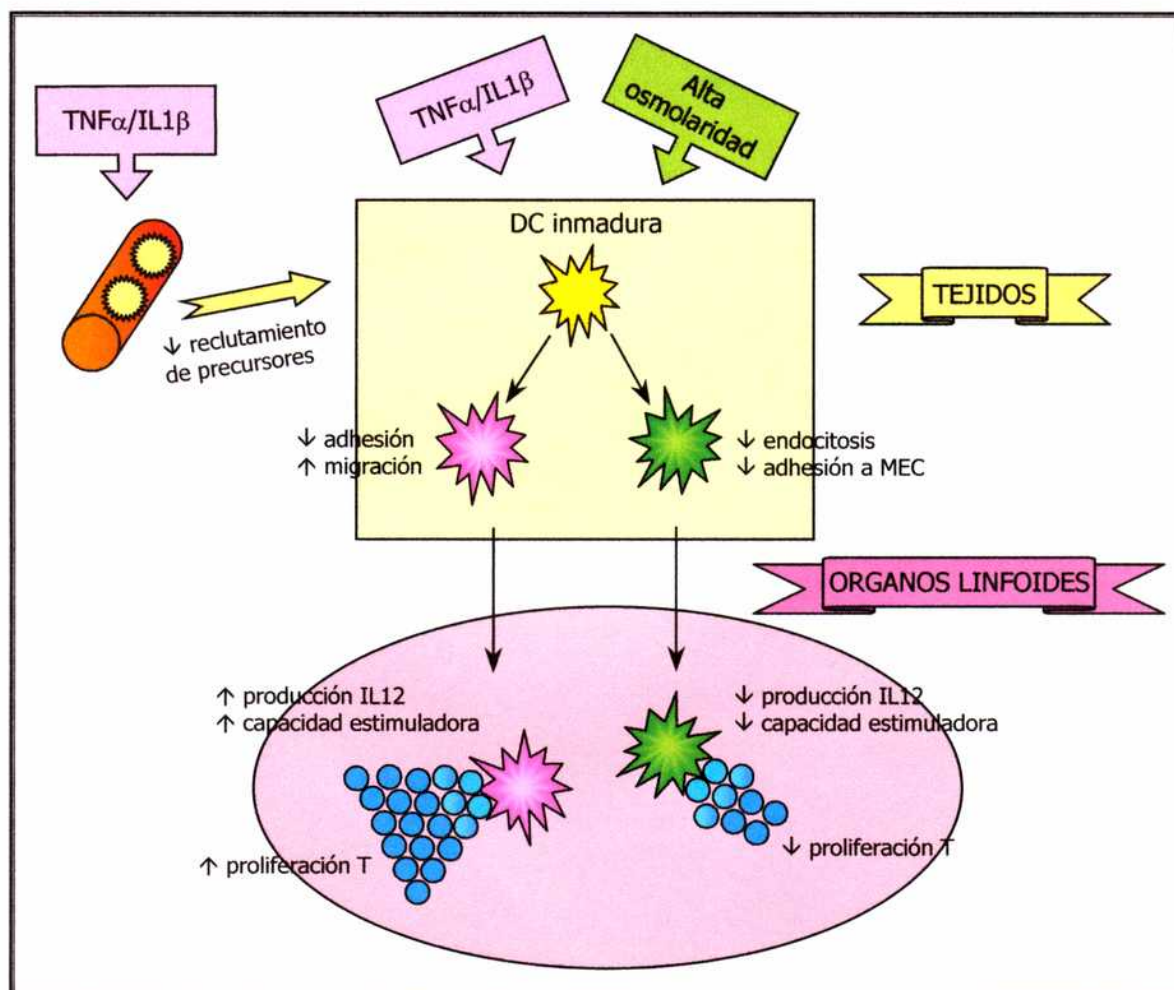


Figura 1: Factores reguladores de las funciones de las moDC. Las citoquinas proinflamatorias modulan la capacidad de las moDC para adherirse y migrar a través del endotelio y de las proteínas de MEC, como así también su habilidad para inducir la proliferación de células T. Por otro lado, y con un efecto opuesto al observado para el TNF α /IL1 β , el aumento de la osmolaridad extracelular regula la endocitosis, la producción de IL12 y la eficiencia inmunoestimuladora en las moDC.

Discusión

Como se mencionó previamente la calidad de la respuesta inmune depende, no sólo de la producción de citoquinas como la IL12, sino también de la presencia de moléculas coestimuladoras. Dentro de las cuales, la familia B7 es una de las más importantes. Integran la misma cuatro miembros, dos de los cuales son CD80 y CD86 [127]. A pesar de cumplir un rol similar en la activación de células T, ambas moléculas presentan diferencias importantes. Con respecto a la unión a sus ligandos (CD28 y CTLA-4), CD86 tiene mayor cinética de disociación que CD80. Además, mientras CD86 se expresa constitutivamente en células B, macrófagos y DC; CD80 esta ausente en células en reposo y su expresión se induce luego de 3-4 días [128]. El modelo utilizado en este trabajo de tesis permitió trabajar con moDC CD80⁺ (moDC-SFB) y moDC CD80⁻ (moDC-SH) (figura 37). La expresión diferencial de CD80 dependió del suero utilizado para la generación de las células. En forma paralela a la mayor expresión de CD80, las moDC-SBF también presentaron una mayor producción de IL12 (figura 42). Ambos factores podrían justificar en parte la alta eficiencia de estas células para inducir la proliferación de linfocitos T en una respuesta secundaria comparadas con las moDC-SH (figura 39). Por otro lado, la ausencia de diferencias en la respuesta alogeneica (figura 38) podría deberse a que en esta, la señal disparada por las moléculas MHC es suficientemente elevada como para gatillar la proliferación linfocitaria de forma independiente a los niveles de moléculas coestimuladoras.

El análisis de las moDC permitió poner en evidencia la existencia de reservorios intracelulares de CD80 en las moDC-SH (figura 41). Posiblemente, CD80 necesite algún factor estabilizador que permita su expresión en la superficie celular. Este factor podría ser inducido por algún componente del suero bovino fetal o podría estar inhibido por el suero humano. Entre los factores que modulan CD80 se encuentra la IL10 [73]. Esta citoquina inhibe el camino de señalización CD28-B7 a diferentes niveles; en macrófagos murinos activados [129] y en monocitos humanos [130] impide el aumento de expresión de CD80. El suero humano contiene una enorme variedad de factores solubles entre los que se pueden encontrar moléculas con funciones similares a la IL10. Determinar los mecanismos responsables de la expresión diferencial de CD80 requiere de mayores estudios. El

Discusión

suero empleado en la generación de DC ha sido un tema de gran estudio. Aparentemente, el empleo de suero humano o plasma autólogo para el cultivo de DC derivadas de monocitos permite obtener células altamente maduras comparadas con las diferenciadas en presencia de suero bovino fetal [83, 131]. Sin embargo, en el presente trabajo, en base a las diferencias encontradas, no se puede determinar con exactitud cual de los dos tipos celulares (moDC-SH o moDC-SBF) es más o menos maduro. Las propiedades que hablan a favor de un grado menor de maduración para las moDC-SH comparadas con las moDC-SBF son: i) menor expresión de CD1a, CD1b y CD1c [132]; ii) mayor capacidad de migración a través del endotelio no activado [132]; iii) ausencia o baja expresión de CD80; y iv) menores niveles de producción de IL12 (figura 42). En cambio, la menor adhesión a las proteínas de matriz extracelular nos indicaría un grado mayor de maduración de las moDC-SH comparadas con las moDC-SBF. Por otro lado, la estimulación de las moDC con $TNF\alpha$ generaría otro tipo celular con un grado mayor de maduración, independientemente del suero utilizado. En la **figura 2** se esquematizan los resultados obtenidos para las poblaciones de moDC generadas en presencia de SH o SBF.

Discusión

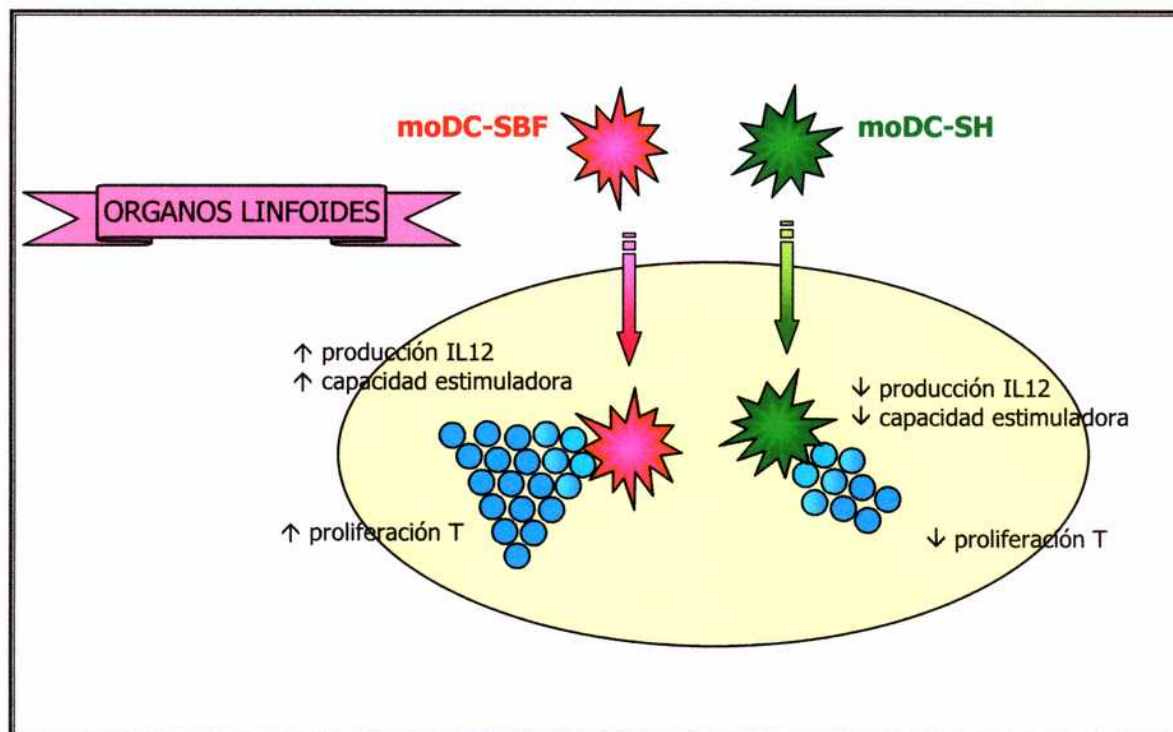


Figura 2: Diferencias en las poblaciones de moDC obtenidas *in vitro*. Bajo diferentes condiciones de cultivo se generan moDC con características particulares y relevantes con respecto a su capacidad estimuladora de células T. El cultivo de las células en presencia de SBF permite obtener moDC capaces de expresar CD80 en membrana, mientras que el empleo de SH genera células que carecen de dicha molécula en su superficie y que son menos eficientes durante la inducción de una respuesta inmune antígeno específica.

A partir de los resultados presentados en el presente trabajo se puede concluir que las DC generadas a partir de monocitos de sangre periférica, constituyen una población heterogénea de células cuyas propiedades esenciales podrían modificarse en función de las condiciones de cultivo y los estímulos utilizados para inducir su maduración. Por lo cual es imprescindible tomar cuidados especiales al momento de utilizar estas células en los protocolos de inmunoterapia.

Discusión

Conclusiones

Las DC generadas a partir de monocitos de sangre periférica (moDC) reúnen las características morfológicas, fenotípicas y funcionales previamente descritas para las DC.

Las moDC se adhieren a células endoteliales y esta adhesión esta parcialmente mediada por CD18, CD29, CD49e y CD31. La activación del endotelio con $TNF\alpha$ aumenta la adhesión y la migración de las moDC a través del mismo.

Las moDC tratadas con $TNF\alpha$ son menos adherentes a endotelio, probablemente por la menor expresión de CD31.

Las moDC se adhieren a FN, LM y Col tipo IV. El tratamiento de las células con $TNF\alpha$ disminuye la adhesión a FN y LM pero no a Col tipo IV. Este efecto esta mediado por cambios en el estado de activación de las integrinas, y no por modificación en el nivel de expresión de las mismas.

El efecto del $TNF\alpha$ es mediado a través del RTNF II, ya que las moDC no expresan el RTNF I.

La señalización a través del RTNF II provoca una disminución en el contenido intracelular de AMPc.

El aumento de los niveles de AMPc en las moDC revierte el efecto del $TNF\alpha$ sobre la adhesión a FN y sobre su capacidad inmunoestimuladora.

Las células no adherentes a FN como consecuencia del tratamiento con $TNF\alpha$ presentan un menor contenido de AMPc y una mayor capacidad estimuladoras de linfocitos T comparadas con las adherentes, posiblemente debido a la mayor producción de IL12.

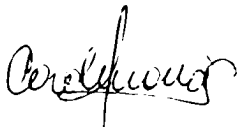
Conclusiones


La IL1 β también inhibe la adhesión de moDC a proteínas de MEC y disminuye los niveles de AMPc celulares, de forma similar a lo observado para TNF α .

El tratamiento hiperosmolar de las moDC disminuye su capacidad para captar antígenos, para adherirse a proteínas de MEC y para inducir la proliferación de células T, probablemente como consecuencia de la menor producción de IL12.

Las moDC generadas en presencia de suero bovino fetal (moDC-SBF) expresan CD80 en membrana a diferencia de las cultivadas con suero humano (moDC-SH) en las cuales se detectaron reservorios intracelulares de CD80. Además, las moDC-SH presentaron menor nivel de IL12 comparadas con las moDC-SBF. Estas dos diferencias podrían explicar la mayor capacidad de estas últimas para estimular la proliferación de linfocitos T en una respuesta secundaria.

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo, permiten concluir que las moDC constituyen una población heterogénea de células cuyas características se modifican en función de las condiciones de cultivo y de los estímulos presentes en su entorno. Por lo cual es importante evaluar en detalle las propiedades de las DC obtenidas *in vitro* al momento de utilizarlas en los diferentes protocolos de inmunoterapia.


CAROLINA JANCIC


H.E. CHULUYAN

Conclusiones

Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas

1. Delves, P.J., Roitt, I.M. (2000). The immune system. Second of two parts. *The New England Journal of Medicine* **343**:108.
2. Pober, J.S., Cotran, R.S. (1990). Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol. Rev.* **70**:427.
3. Mantovani, A., Bussolino, F., Dejana, E. (1992). Cytokines regulation of endothelial cell function. *FASEB J.* **6**:2591.
4. Luscinskas, F.W., Cybulsky, M.Y., Kiely, J.M., Peckins, C.S., Davis, V.M., Gimbrone, M.A. (1991). Cytokine-activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and intracellular molecule-1. *J. Immunol.* **146**:1617.
5. Delves, P.J., Roitt, I.M. (2000). The immune systems. First of two parts. *The New England Journal of Medicine* **343**:37.
6. Janeway Jr, C.A., Travers, P. (1997). Immunobiology. The immune system in health and disease. *Stanford Press, London, UK.*
7. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (1997). Cellular and molecular immunology. *Saunders Company, Philadelphia, United States.*
8. Austyn, J.M., Wood, K.J. (1993). Principles of cellular and molecular immunology. *Oxford University Press Inc., New York, United States.*
9. Ruoslahti, E. (1991). Integrins. *J. Clin. Invest.* **87**:1.
10. Hynes, R.O. (1994). The impact of molecular biology on models for cell adhesion. *BioEssays* **16**:663.
11. van der Merwe, P.A., Barclay, A.N. (1994). Transient intercellular adhesion: the importance of weak protein-protein interactions. *TIBS* **19**:354.
12. Yamada, K.M., Aota, S., Akiyama, S.K., LaFlamme, S.E. (1992). Mechanisms of fibronectin and integrin function during cell adhesion and migration. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **57**:203.
13. Tuckwell, D.S., Humphries, M.J. (1993). Molecular and cellular biology of integrins. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **15**:149.
14. Luscinskas, F.W., Lawler, J. (1994). Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB J.* **8**:929.
15. Potts, J.R., Campbell, I.D. (1994). Fibronectin structure and assembly. *Curr. Op. in cell Biology* **6**:648.

Referencias

16. Carlos, T.M., Harlan, J.M. (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**:2068.
17. Rosen, S.D., Bertozi, C.R. (1994). The selectins and their ligands. *Curr. Op. in Cell Biol.* **6**:663.
18. Lasky, L.A. (1992). Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* **258**:9664.
19. Hogg, N., Berlin, A. (1995). Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking. *Immunol. Today* **16**:327.
20. Srinivas, U., Larsson, M., Lundblad, A., Forsum, U. (1993). E-selectin involvement in *in vitro* adhesion of blood dendritic cells to human umbilical cord endothelial cells. *Scand. J. Immunol.* **38**:273.
21. Dejana, E., Corada, M., Lampugnani, M.G. (1995). Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J.* **9**:910.
22. Koch, P.J., Franke, W.W. (1994). Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr. Op. in Cell Biol.* **6**:682.
23. Tang, A., Amagai, M., Granger, L.G., Stanley, J.R., Udey, M.C. (1993). Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* **361**:82.
24. Bokoch, G.M. (1995). Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* **86**:1649.
25. Horwitz, A.F., Thiery, J.P. (1994). Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Curr. Op. in Cell Biol.* **6**:645.
26. Girard, J.-P., Springer, T.A.S. (1995). High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol. Today* **16**:449.
27. Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**:301.
28. Peters, J.H., Gieseler, R., Thiele, B., Steinbach, F. (1996). Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol. Today* **17**:273.
29. Prickett, T.C.R., McKenzie, J.L., Hart, D.N.J. (1992). Adhesion molecules on human tonsil dendritic cells. *Transplantation* **53**:483.
30. Guery, J.C., Adorini, L. (1995). Dendritic cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to class II-restricted T cells. *J. Immunol.* **154**:536.

Referencias

31. Inaba, K., Steinman, R.M., Pack, M.W., Aya, H., Inaba, M., Sudo, T., Wolpe, S., Schuler, G. (1992). Identification of prolonging dendritic cell precursors in mouse blood. *J. Exp. Med.* **175**:1157.
32. O'Doherty, U., Steinman, R.M., Peng, M., Cameron, P.U., Gezelter, S., Kopeloff, I., Swiggard, W.J., Pope, M., Bharwaj, N. (1993). Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. *J. Exp. Med.* **178**:1067.
33. Rozenawajig, M., Canque, B., Gluckman, J.C. (1996). Human dendritic cells differentiation pathway from CD34+ hematopoietic precursors cells. *Blood* **86**:535.
34. Shortman, K. (2000). Dendritic cells: multiple subtypes, multiple origins, multiple functions. *Immunol. Cell Biol.* **78**:161.
35. Pulendran, B., Maraskovsky, E., Banchereau, J., Maliszewski, C. (2001). Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *TRENDS in Immunol.* **22**:41.
36. Liu, Y.J. (2001). Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**:259.
37. Romani, N. (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* **196**:137.
38. Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P.O., Steinman, R.M., Schuler, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* **180**:83.
39. Mayordomo, J.Y., Zorina, T., Storkus, W.J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L.D., Melief, C.J., Ildstad, S.T., Martin Kast, W., Deleo, A.B., Lotze, M.T. (1995). Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat. Med.* **1**:1297.
40. Ardavin, C., Martinez del Hoyo, G., Martin, P., Anjuère, F., Arias, C.F., Marin, A.R., Ruiz, S., Parrillas, V., Hernandez, H. (2001). Origin and differentiation of dendritic cells. *TRENDS in Immunol.* **22**:691.
41. Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* **179**:1109.
42. Zou, G.M., Tam, Y.K. (2002). Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur. Cytokine Netw.* **12**:186.

Referencias

43. Alijagic, S., Möller, P., Artuc, M., Jurgovsky, K., Czarnetzki, B.M., Schadendorf, D. (1995). Dendritic cell generated from peripheral blood transfected with human tyrosinase induce specific T cell activation. *Eur. J. Immunol.* **25**:3100.
44. Mellman, I., Steinman, R.M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**:255.
45. Turley, S.J., Inaba, K., Garrett, W.S., Ebersold, M., Untermaier, J., Steinman, R.M., Mellman, I. (2000). Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* **288**:522.
46. Girolomoni, G., Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunol. Today* **18**:102.
47. Ibrahim, M.A., Chain, B.M., Katz, D.R. (1995). The injured cell: the role of the dendritic cell system as a sentinel receptor pathway. *Immunol. Today* **16**:181.
48. Stingl, G., Bergstresser, P.R. (1995). Dendritic cells: a major story unfolds. *Immunol. Today* **16**:330.
49. Lanzavecchia, A., Sallusto, F. (2001). Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* **106**:263.
50. Inaba, K., Turley, S., Yamaide, F., Iyoda, T., Mahnke, K.I., M., Pack, M., Subklewe, M., Sauter, B., Sheff, D., et al. (1998). Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **188**:2163.
51. Théry, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Amigorena, S. (1999). Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J. Cell. Biol.* **147**:599.
52. Huang, F.P., Platt, N., Wykes, M.M., J. R., Powell, T.J., Jenkins, C.D., MacPherson, G.G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* **191**:435.
53. Heath, W.R., Carbone, F.R. (2001). Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **19**:47.
54. Lanzavecchia, A., Sallusto, F. (2001). Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat. Immunol.* **2**:487.
55. Schulz, O., Edwards, D.A., Schito, M., Aliberti, J.M., S, Sher, A., Reis e Sousa, C. (2000). CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* **13**:453.

Referencias

56. Kalinski, P., Schuitmaker, J.H.N., Hilkens, C.M.U., Wierenga, E.A., Kapsenberg, M.L. (1999). Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN- γ and bacterial IL-12 inducers: decreases ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J. Immunol.* **162**:3231.
57. Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* **1**:311.
58. Caux, C., Liu, Y.J., Banchereau, J. (1995). Recent advances in the study of dendritic cells and follicular dendritic cells. *Immunol. Today* **16**:2.
59. Vermaelen, K.Y., Carro-Muino, I., Lambrecht, B.N., Pauwels, R.A. (2001). Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J. Exp. Med.* **193**:51.
60. Banchereau, J., Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245.
61. Baudouin-Legros, M., Brouillard, F., Cougnon, M., Tondelier, D., Leclerc, T., Edelman, A. (2000). Modulation of CFTR gene expression in HT-29 cells by extracellular hyperosmolarity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **278**:C49.
62. Nishina, H., Fischer, K.D., Radvanyi, L., Shahinian, A., Hakem, R., Rubie, E.A., Bernstein, A., Mak, T.W., Woodgett, J.R., Penninger. (1997). Stress-signaling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. *Nature* **385**:350.
63. Bryant, G., Aggarwal, B.B. (1997). Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. *J. Leukoc. Biol.* **61**:559.
64. Heller, R.A., Kronke, M. (1994). Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J. Cell Biol.* **126**:5.
65. Porteu, F., Hieblot, C. (1994). Tumor necrosis factor induces a selective shedding of its p75 receptor from human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **269**:2834.
66. Kambayashi, T., Wallin, R.P., Ljunggren, H.G. (2001). cAMP-elevating agents suppress dendritic cell function. *J. Leukoc. Biol.* **70**:903.
67. Rieser, C., Bock, C., Klocker, H., Barisch, C., Thumher, M. (1997). Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* **186**:1603.

Referencias

68. Nathan, C., Sanchez, E. (1990). Tumor necrosis factor and CD11/CD18 (beta2) integrins act synergistically to lower cAMP in human neutrophils. *J. Cell. Biol.* **111**:2171.
69. Ekholm, D., Hemmer, B., Cao, C., Vergelli, M., Martin, R., Manganiello, V. (1997). Differential expression of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 and 4 activities in human T cell clones specific for myelin basic protein. *J. Immunol.* **159**:1520.
70. Zhang, Y., Lin, J.-X., Yip, Y.K., Vilcek, J. (1988). Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibroblasts: role in the induction of interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**:6802.
71. Koga, S., Morris, S., Ogawa, S., Liao, H., Bilezikian, J.P., Chen, G., Thompson, W.J., Ashikaga, T.J., Brett, J., Stern, D.M., Pinsky, D.J. (1995). TNF modulates endothelial properties by decreasing cAMP. *Am. J. Physiol* **268**:1104.
72. Grabbe, S., Beissert, S., Schwarz, T., Granstein, R.D. (1995). Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy? *Immunol. Today* **16**:117.
73. Buelens, C., Willems, F., Delvaux, A., Pierard, G., Delville, J.-P., Velu, T., Goldman, M. (1995). Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **25**:2668.
74. Beissert, S., Hosoi, J., Grabbe, S., Asahina, A., Granstein, R.D. (1995). IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. *J. Immunol.* **154**:1280.
75. Choudhury, A., Gajewski, J.L., Liang, J.C., Popat, U., Claxton, D.F., Klinche, K.-O., Andreeff, M., Champlin, R.E. (1997). Use of leukemic dendritic cells for the generation of antileukemic cellular cytotoxicity against Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* **89**:1133.
76. Wang, C., Quevedo, M.E., Lannutti, B.J., Gordon, K.B., Guo, D., Sun, W., Paller, A.S. (1999). In vivo gene therapy with interleukin-12 inhibits primary vascular tumor growth and induces apoptosis in a mouse model. *J. Invest. Dermatol.* **112**:775.
77. Adris, S., Chuluyan, E., Bravo, A., Berenstein, M., Klein, S., Jasnis, M., Carbone, C., Chernajovsky, Y., Podhajcer, O. (2000). Mice vaccination with interleukin 12-transduced colon cancer cells potentiates rejection of syngeneic non-organ-related tumor cells. *Cancer Res.* **60**:6696.
78. Yoshida, S., Morii, K., Watanabe, M., Saito, T., Yamamoto, K., Tanaka, R. (2001). The generation of anti-tumoral cells using dendritic cells from the peripheral blood of patients with malignant brain tumors. *Cancer Immunol. Immunother.* **50**:321.

Referencias

79. Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., Minick, C.R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphological and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* **52**:2745.
80. Kairiyama, C., Slavutsky, I., Larripa, I., Marvillo, V., Bravo, A.I., Bover, L., Podhajcer, O.L., Mordoh, J. (1995). Biologic, immunocytochemical and cytogenetic characterization of two new human melanoma cell lines: IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN. *Pigment. Cell Res.* **8**:121.
81. Le Varlet, B., Staquet, M.J., Dezutter-Dambuyant, C., Delorme, P., Schmitt, D. (1992). In vitro adhesion of human epidermal Langerhans cells to laminin and fibronectin occurs through b1 integrin receptors. *J. Leuk. Biol.* **51**:415.
82. Chuluyan, H.E., Issekutz, A.C. (1993). VLA-4 integrin can mediate CD11/CD18-independent transendothelial migration of human monocytes. *J. Clin. Invest.* **92**:2768.
83. Duperrier, K., Eljaafari, A., Dezutter-Dambuyant, C., Bardin, C., Jacquet, C., Yoneda, K., Schmitt, D., Gebuhrer, L., Rigal, D. (2000). Distinct subsets of dendritic cells resembling dermal DCs can be generated in vitro from monocytes, in the presence of different serum supplements. *J. Immunol. Methods* **238**:119.
84. Jaffar, Z.H., Stanciu, L., Pandit, A., Lordan, J., Holgate, S.T., Roberts, K. (1999). Essential role for both CD80 and CD86 costimulation, but not CD40 interactions, in allergen-induced Th2 cytokine production from asthmatic bronchial tissue: role for alpha/beta, but not gamma/delta, T cells. *J. Immunol.* **163**:6283.
85. Labeur, M.S., Roters, B., Pers, B., Mehling, A., Luger, T.A., Schwarz, T., Grabbe, S. (1999). Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J. Immunol.* **162**:168.
86. Krump, E., Nikitas, K., Grinstein, S. (1997). Induction of tyrosine phosphorylation and Na⁺/H⁺ exchanger activation during shrinkage of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **272**:17303.
87. Stoitzner, P., Zanella, M., Ortner, U., Lukas, M., Tagweker, A., Janke, K., Lutz, M.B., Schuler, G., Echtenacher, B., Ryffel, B., Koch, F., Romani, N. (1999). Migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells in skin organ cultures: augmentation by TNF α and IL1 β . *J. Leukoc. Biol.* **66**:462.
88. Cumberbatch, M., Kimber, I. (1995). Tumor necrosis factor- α is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. *Immunol.* **84**:31.

Referencias

89. Steinman, R.M., Kaplan, G., Witmer, M.D., Cohn, Z.A. (1979). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J. Exp. Med.* **149**:1.
90. Pellegatta, F., Radaelli, A., Ferrero, E., Toninelli, E., Vidal, M.J., Chierchia, S.L., Zocchi, M.R. (1994). Inducible nitric oxid synthase modulates fibrinectin production in the EA.hy926 cell line and cultured human umbilical vein endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **24**:1014.
91. Brown, K.A., Bedford, P., Macey, M., McCarthy, D.A., Leroy, F., Vora, A.J., Stagg, A.J., Dumonde, D.C., Knight, S.C. (1997). Human blood dendritic cells: binding to vascular endothelium and expression of adhesion molecules. *Clin. Exp. Immunol.* **107**:601.
92. Bianchi, G., D'Amico, G., Varone, L., Sozzani, S., Mantovani, A., Allavena, P. (2000). In vitro studies on the trafficking of dendritic cells through endothelial cells and extra-cellular matriz. *Dev. Immunol.* **7**:143.
93. Issekutz, T.B. (1995). In vivo blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, IL-1 alpha, TNF-alpha, IFN-gamma, and C5a utilizes LFA-1, Mac-1, and VLA-4. The relative importance of each integrin. *J. Immunol.* **154**:6533.
94. Lobb, R.R., Hemier, M.E. (1994). The pathophysiologic role of a4 integrins in vivo. *J. Clin. Invest.* **94**:1.
95. Elices, M.J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., Hemler, M.E., Lobb, R.R. (1990). VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* **60**:577.
96. Hotchkiss, R.S., Tinsley, K.W., Swanson, P.E., Grayson, M.H., Osborn, D.F., Wagner, T.H., Cobb, J.P., Coopersmith, C., Karl, I.E. (2002). Depletion of dendritic cells, but not macropahages, in patients with sepsis. *J. Immunol.* **168**:2493.
97. Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell* **69**:11.
98. Puig-Kroger, A., Sanz-Rodriguez, F., Longo, N., Sanchez-Mateos, P., Botella, L., Teixido, J., Bernabeu, C., Corbi, A.L. (2000). Maturation-dependent expression and function of the CD49d integrin on monocyte-derived human dendritic cells. *J. Immunol.* **165**:4338.
99. Price, A.A., Cumberbach, M., Kimber, I., Ager, A. (1997). alpha6 Integrins are required for Langerhans cell migration from the epidermis. *J. Exp. Med.* **186**:1725.
100. Miyamoto, S., Teramoto, H., Gutkind, S.J., Yamada, K.M. (1996). Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and

Referencias

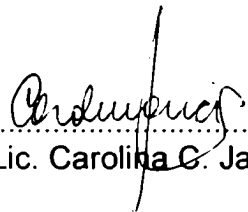
- MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J. Cell Biol.* **135**:1633.
101. van Kooyk, Y., Figdor, C.G. (2000). Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:542.
 102. Chou, D.H.-I., Lee, W.L., McCulloch, C.A. (1996). TNF- α inactivation of collagen receptor. Implications for fibroblast function and fibrosis. *J. Immunol.* **156**:4354.
 103. Wilkins, J.A., Stupack, D., Stewart, S., Shen, C. (1991). β 1 integrin-mediated lymphocyte adherence to ECM is enhanced by phorbol ester treatment. *Eur. J. Immunol.* **21**:517.
 104. Shaw, I.M., Messier, J.M., Mercurio, A.M. (1990). The activation dependent adhesion of macrophages to laminin involves cytoskeletal anchoring and phosphorylation of the α 6 β 1 integrin. *J. Cell Biol.* **110**:2167.
 105. Miki, C., Tonouchi, H., Wakuda, R., Hatada, T., Inoue, Y., Minato, E., Kobayashi, M., Kusunoki, M. (2002). Intra-tumoral interleukin-6 down regulation system and genetic mutations of tumor suppressor genes in colorectal carcinoma. *Cancer* **94**:1584.
 106. Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H., Goeddel, D.V. (1993). A novel domain within the 55kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**:845.
 107. Imamura, K., Spriggs, D., Kufe, D. (1987). Expression of tumor necrosis factor receptors on human monocytes and internalization of receptor bound ligand. *J Immunol* 1987. **139**: 2989-2992. *J. Immunol.* **139**:2989.
 108. Larregina, A., Morelli, A., Kolkowski, E., Fainboim, L. (1996). Flow cytometric analysis of cytokine receptors on human Langerhans' cells. Changes observed after short-term culture. *Immunol.* **87**:317.
 109. Larregina, A.T., Morelli, A.E., Kolkowski, E., Sanjuan, N., Barbosa, M.E., Fainboim, L. (1997). Pattern of cytokine receptors expressed by human dendritic cells migrated from dermal explants. *Immunol.* **91**:303.
 110. Higuchi, M., Aggarwal, B.B. (1994). TNF induces internalization of the p60 receptor and shedding of the p80 receptor. *J. Immunol.* **152**:3550.
 111. Aderka, D., Engelman, H., Maor, Y., Brakebusch, C., Wallach, D. (1992). Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J. Exp. Med.* **175**:323.
 112. Enioutina, E.Y., Visic, D., Daynes, R.A. (2000). The induction of systemic and mucosal immune responses to antigen-adjuvants compositions administrated into the skin: alterations in the migratory properties of dendritic cells appears to be important for stimulating mucosal immunity. *Vaccine* **18**:2753.

Referencias


113. Han, J.D., Rubin, C.S. (1996). Regulation of cytoskeleton organization and paxillin dephosphorylation by cAMP. Studies on murine Y1 adrenal cells. *J. Biol. Chem.* **271**:29211.
114. Whittard, J.D., Akiyama, S.K. (2001). Positive regulation of cell-cell and cell-substrate adhesion by protein kinase A. *J. Cell. Sci.* **114**:3265.
115. Verghese, M.W., McConnell, R.T., Lenhard, J.M., Mamacher, L., Jin, S.L. (1995). Regulation of distinct cyclic AMP-specific phosphodiesterase (phosphodiesterase type 4) isozymes in human monocytic cells. *Mol. Pharmacol.* **47**:1164.
116. Gantner, F., Schudt, C., Wendel, A., Hatzelmann, A. (1999). Characterization of phosphodiesterase (PDE) pattern of in vitro-generated human dendritic cells (DC) and the influence of PDE inhibitors on DC function. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **12**:377.
117. Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (1999). Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming and chronic inflammation. *J. Exp. Med.* **189**:611.
118. Shapiro, L., Dinarello, C.A. (1995). Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**:12230.
119. Rizoli, S., Kapus, A., Fan, J., Li, Y.H., Marshall, J.C., Rotstein, O.D. (1998). Immunomodulatory effects of hypertonic resuscitation on the development of lung inflammatory following hemorrhagic shock. *J. Immunol.* **161**:6288.
120. Junger, W.G., Coimbra, R., Liu, F.C., Herdon-Remelius, C., Junger, W., Junger, H., Loomis, W., Hoyt, D.B., Altman, A. (1997). Hypertonic saline resuscitation: a tool to modulate immune function in trauma patients? *Shock* **8**:235.
121. Cuschieri, J., Gourlay, D., García, I., Jelacic, S., Maier, R.V. (2002). Hypertonic preconditioning inhibits macrophage responsiveness to endotoxin. *J. Immunol.* **168**:1389.
122. Kapus, A., Di Ciano, C., Sun, J., Zhan, X., Kim, L., Wong, T.W., Rotstein, O.D. (2000). Cell volume-dependent phosphorylation of proteins of the cortical cytoskeleton and cell-cell contact sites. The role of Fyn and FER kinases. *J. Biol. Chem.* **275**:32289.
123. Al-Alwan, M.M., Rowden, G., Lee, T.D.G., West, K.A. (2001). Cutting edge: The dendritic cell cytoskeleton is critical for the formation of the immunological synapse. *J. Immunol.* **166**:1452.
124. Howard, T.H., Watts, R.G. (1994). Actin polymerization and leukocyte function. *Curr. Opin. Hematol.* **1**:61.

Referencias

125. Rizoli, S., Kapus, A., Parodo, J., Fan, J., Rotstein, O.D. (1999). Hypertonic immunomodulation is reversible and accompanied by changes in CD11b expression. *J. Surg. Res.* **82**:130.
126. Rizoli, S.B., Rotstein, O.D., Kapus, A. (1999). Cell volume-dependent regulation of L-selectin shedding in neutrophils. A role for p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **274**:22072.
127. Tseng, S.-Y., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J.E., Pai, S.I., Shalabi, A., Shin, T., Pardoll, D.M., Tsuchiya, H. (2001). B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J. Exp. Med.* **193**:839.
128. Coyle, A.J., Gutierrez-Ramos, J.C. (2001). The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat. Immunol.* **2**:203.
129. Ding, L., Linsley, P.S., Huang, L.Y., Germain, R.N., Shevach, E.M. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J. Immunol.* **151**:1224.
130. Willems, F., Marchant, A., Delville, J.P., Gerard, C., Delvaux, A., Velu, T., de Boer, M., Goldman, M. (1994). Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* **24**:1007.
131. Mannering, S.I., McKenzie, J.L., Hart, D.N.J. (1998). Optimisation of the conditions for generating human DC initiated antigen specific T lymphocytes lines in vitro. *J. Immunol. Methods* **219**:69.
132. Jancic, C.C., Chuluyan, H.E., Morelli, A., Larregina, A., Kolkowski, E., Saracco, M., Barboza, M., Leiva, W., Fainboim, L. (1998). Interactions of dendritic cells with fibronectin and endothelial cells. *Immunology* **95**:283.



 Lic. Carolina C. Jancic



 Dr. H. Eduardo Chuluyan