Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Papel crítico de galectina-1 en la diferenciación de células dendríticas tolerogénicas: relevancia fisiopatológica in vivo en la interfase de inflamación crónica y cáncer

Ilarregui, Juan Martín

2009

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:
Ilarregui, Juan Martín. (2009). Papel crítico de galectina-1 en la diferenciación de células dendríticas tolerogénicas: relevancia fisiopatológica in vivo en la interfase de inflamación crónica y cáncer. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Ilarregui, Juan Martín. "Papel crítico de galectina-1 en la diferenciación de células dendríticas tolerogénicas: relevancia fisiopatológica in vivo en la interfase de inflamación crónica y cáncer". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

PAPEL CRÍTICO DE GALECTINA-1 EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS TOLEROGÉNICAS: RELEVANCIA FISIOPATOLÓGICA *IN VIVO* EN LA INTERFASE DE INFLAMACIÓN CRÓNICA Y CÁNCER

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Juan Martín Ilarregui

Director: Dr. Gabriel A. Rabinovich.

Consejero de Estudios: Dr. Jorge P. Muschieti

Lugares de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental.
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas.

Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas "José de San Martín", Facultad de medicina, UBA.

Buenos Aires, 2009.

RESUMEN

PAPEL CRÍTICO DE GALECTINA-1 EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS TOLEROGÉNICAS: RELEVANCIA FISIOPATOLÓGICA *IN VIVO* EN LA INTERFASE DE INFLAMACIÓN CRÓNICA Y CÁNCER

Las células dendríticas son células altamente especializadas en captar, procesar y presentar antígenos a linfocitos T vírgenes a los fines de inducir una respuesta inmune específica. A pesar de su papel crítico en iniciar la inmunidad adaptativa, estas células pueden redireccionarse hacia un perfil tolerogénico. En el presente trabajo de tesis, determinamos el papel de galectina-1, una lectina endógena con propiedades antiinflamatorias, sobre la fisiología de células dendríticas humanas y de ratón. Células dendríticas diferenciadas en presencia de galectina-1 exhibieron un perfil regulatorio dependiente de la producción de IL-27 y de la activación del factor de transcripción STAT3, favorecieron la inducción de tolerancia en el microambiente tumoral y suprimieron las respuestas patogénicas Th1 y Th17 en un modelo de inflamación autoinmune desmielinizante. De acuerdo con su función regulatoria, la expresión endógena de galectina-1 fue elevada en células dendríticas expuestas a estímulos tolerogénicos y durante el pico y la resolución de la patología autoinmune, instancia en la cual contribuyó a la resolución de la enfermedad. Asimismo, células dendríticas deficientes en el gen de galectina-1 presentaron un mayor potencial inmunogénico y capacidad disminuida de suprimir fenómenos inflamatorios. Los resultados expuestos demuestran el papel crítico de galectina-1, tanto exógena como endógena, en la inducción de DC tolerogénicas productoras de IL-27 con profundas implicancias en el control de procesos inflamatorios y neoplásicos.

Palabras clave: Galectina-1, Células dendríticas, Células T regulatorias, Tolerancia, Autoinmunidad, Cáncer, Inflamación.

SUMMARY

CRITICAL ROLE OF GALECTIN-1 IN THE DIFFERENTIATION OF TOLEROGENIC DENDRITIC CELLS: PATHOPHYSIOLOGIC RELEVANCE *IN VIVO* AT THE CROSSROAD OF CHRONIC INFLAMMATION AND CANCER

Dendritic cells are highly specialized antigen-presenting cells that recognize, process and present antigens to naïve T cells. In spite of their pivotal role in orchestrating immunity, dendritic cells may be licensed by inhibitory signals to become tolerogenic. Here we show that galectin-1, an endogenous glycan-binding protein, can endow dendritic cells with tolerogenic potential *in vivo*. Galectin-1-differentiated dendritic cells acquired an IL-27-dependent 'regulatory signature', promoted T cell tolerance in neoplastic settings and suppressed T_H-17-mediated autoimmune neuroinflammation in wild-type, but not IL-27 receptor α-deficient mice. Consistent with its regulatory function, expression of galectin-1 was elevated on dendritic cells exposed to tolerogenic stimuli and during the peak and resolution of autoimmune pathology, where it contributed to disease recovery. Accordingly, dendritic cells lacking galectin-1 had greater immunogenic potential and impaired capacity to halt inflammatory disease. Our findings identify an essential role for galectin-1 in driving the differentiation of IL-27-producing tolerogenic dendritic cells with broad therapeutic implications in immunopathology.

Keywords: Galectin-1, Dendritic cells, Regulatory T cells, Tolerance, Autoimmunity, Cancer, Inflammation.

ESTA TESIS ESTA DEDICADA A MIS VIEJOS

ÍNDICE

RESUMEN —

SUMMARY —

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1 Sistema inmune: breve introducción a una red compleja y sofisticada 1

1.2 Células dendríticas como nexos entre la respuesta inmune innata y adaptativa 4

1.3 Células dendríticas: pivotales en el desarrollo de la respuesta inmune 10

1.4 Galectinas 17

1.5 Galectina-1: proteína de unión a carbohidratos con propiedades inmunoregulatorias 20

2. OBJETIVOS 26

3. RESULTADOS 27

3.1 Impacto de galectina-1 en la fisiología de DCs humanas 27

3.1.1 Galectina-1 inhibe la diferenciación de DCs humanas 27

3.1.2 Galectina-1 activa mecanismos tolerogénicos en DCs humanas 30

3.1.3 Mecanismos involucrados en la actividad tolerogénica de DC_{Gal1} 33

3.1.4 Galectina-1 imparte un programa regulatorio en DCs humanas maduras 35

3.2 Impacto de galectina-1 en la fisiología de DCs de ratón 36

3.2.1 Galectina-1 genera DCs tolerogénicas productoras de IL-27 36

3.2.2 DC_{Gal1} inducen tolerancia específica de antígeno *in vivo* 41

3.2.3 DC_{Gal1} favorecen la inducción de tolerancia en el microambiente tumoral 42

3.2.4 Efecto terapéutico de DC_{Gal1} sobre la enfermedad autoinmune desmielinizante 44

3.2.5 DC_{Gal1} suprimen la respuesta inflamatoria a través de mecanismos dependientes de IL-27 48

3.2.6 Estímulos tolerogénicos o inflamatorios regulan en forma diferencial la expresión de galectina-1 en DCs 50

3.2.7 La expresión endógena de galectina-1 regula las funciones tolerogénicas de DCs *in vitro* e *in vivo* 54

3.2.8 DCs con alta expresión de galectina-1 promueven la resolución de la EAE 57

4. DISCUSIÓN 61

5. CONCLUSIÓN FINAL 74

6. MATERIALES Y METODOS 75

6.1 Materiales y métodos generales 75

6.2 Materiales y métodos relacionados con DCs humanas 82

6.3 Materiales y métodos relacionados con DCs de ratón 85

6.4 Análisis estadístico 94

7. REFERENCIAS 95

8. ABREVIATURAS 111

9. PUBLICACIONES 114

10. AGRADECIMIENTOS 118

1. INTRODUCCIÓN

1.1 SISTEMA INMUNE: BREVE INTRODUCCIÓN A UNA RED COMPLEJA Y SOFISTICADA

A lo largo de millones de años, el sistema inmune de los mamíferos ha evolucionado como un sofisticado mecanismo de defensa, dotado de exquisita especificidad en cuanto a los mecanismos de reconocimiento que posee y a la diversidad de mecanismos efectores que despliega, lo cual nos permite habitar en un mundo poblado de microorganismos potencialmente patógenos y eliminar células que pudiesen experimentar transformación maligna. Por este motivo, sólo en ciertas circunstancias detectamos las manifestaciones clínicas de un proceso patológico y, cuando éstas ocurren, por lo menos en el caso de las infecciones, suelen resolverse rápidamente.

El sistema inmune se encuentra tradicionalmente compartamentalizado en sistema inmune innato y adaptativo. Esta clasificación se ha realizado a los fines de facilitar el estudio de la inmunología, basada en diferencias en el reconocimiento de patógenos y en los mecanismos efectores involucrados. La inmunidad innata es la primera barrera de defensa del organismo, no requiere sensibilización previa y por lo tanto se manifiesta con rapidez (Janeway & Medzhitov, 2002). Se halla compuesta básicamente por barreras físicas y anatómicas como la piel y los epitelios de las mucosas. Entre los componentes celulares se destacan los neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células asesinas naturales (*natural killers*; NK), y células dendríticas. Además posee componentes humorales como el sistema de complemento, las

proteínas de fase aguda y los interferones (IFN)-α y β (Fainboim & Geffner, 2005). Las células de la inmunidad innata basan su estrategia para reconocer al patógeno en el empleo de un número limitado de receptores cuya especificidad no involucra procesos de recombinación de segmentos génicos. Los diferentes tipos celulares que participan en la inmunidad innata exhiben los mismos receptores, los cuales median el reconocimiento de unas pocas estructuras moleculares, conservadas en grupos muy amplios de microorganismos. A estas estructuras moleculares se las denomina patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs) y a los receptores que evolucionaron para reconocerlas se los llama receptores de reconocimiento de patrones (RRPs).

Por lo tanto, aún cuando el sistema inmune innato carece de la exquisita especificidad del adaptativo, es capaz de discriminar lo propio respecto de lo no propio, peligroso o extraño (Janeway, 2005). También pueden reconocer a los microorganismos en forma indirecta, sin la participación de los PRRs. Esto ocurre a través de receptores que permiten la unión del fragmento Fc de las inmunoglobulinas o de componentes activados del sistema del complemento (Fainboim & Geffner, 2005).

Por el contrario, la inmunidad adaptativa emplea como sistema de reconocimiento un repertorio amplio y variado de receptores antigénicos, distribuidos clonalmente en células T y B (Janeway, 2005). En el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa participan fundamentalmente los linfocitos y mediadores solubles liberados por los mismos como citoquinas. A diferencia de los elementos celulares de la inmunidad innata, que reconocen un pequeño número de motivos conservados, los

linfocitos T y B reconocen motivos particulares presentes en los patógenos. Cada clon B o T reconocerá epitopes antigénicos través de sus receptores antigénicos B (BCR) o T (TCR). La existencia de centenares de millones de clones diferentes brinda un repertorio adecuado para el reconocimiento de los diferentes antígenos microbianos (Fainboim & Geffner, 2005). El linfocito T ($CD4^+$ ó $CD8^+$) que reconoció a su antígeno se activa, sufre un proceso denominado expansión clonal y genera una progenie compuesta de células con idéntica especificidad antigénica (clonotipo). Al dividirse, una fracción mayoritaria de los integrantes del clon expandido mediarán funciones efectoras que harán frente al patógeno. Una fracción menor se diferenciará a células de memoria, las cuales pueden permanecer por años en nuestro organismo y permitir en el futuro una respuesta rápida y eficiente frente a una reexposición al mismo patógeno. Por lo tanto, la expansión clonal y la memoria inmunitaria representan dos propiedades esenciales de la inmunidad adaptativa, no compartidas por la inmunidad innata.

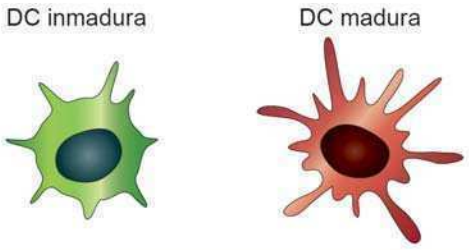
Generalmente el sistema inmune responde de forma unificada y bidireccional, por lo que la división en respuesta innata y adaptativa es más bien teórica que real. Lo que sí ocurre es que, dependiendo de la naturaleza y magnitud del proceso patológico, en unos casos predominará una u otra de estas modalidades (Abbas & Lichtman, 2004). No obstante, cualquiera sea la circunstancia, la inmunidad innata orientará el perfil que desarrollará posteriormente la inmunidad adaptativa, y en este contexto, cobran especial relevancia las células dendríticas.

1.2 CÉLULAS DENDRÍTICAS COMO NEXOS ENTRE LA RESPUESTA INMUNE INNATA Y ADAPTATIVA

Las células dendríticas (DCs), del griego *dendron* (árbol) (Steinman & Cohn, 1973), son células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales que cumplen una función crítica en la inducción y regulación de la respuesta inmune adaptativa, ya que son las únicas células con la capacidad de estimular linfocitos T vírgenes e iniciar una respuesta inmune primaria (Steinman, 1991). Residen en la mayoría de tejidos periféricos, particularmente en sitios de interfase con el medio ambiente (piel y mucosas) (Guermonprez y col., 2002). Constituyen una población heterogénea de células, cuya característica común es su capacidad de captar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T, orientando luego el desarrollo de respuestas inmunes efectoras (Banchereau y col., 2000).

Las DCs presentan dos estadios en los cuales difieren sustancialmente en su fenotipo y funcionalidad, DCs inmaduras y DCs maduras (**Fig. 1**). Las células que se encuentran en su estado inmaduro, en ausencia de procesos inflamatorios y de respuesta inmune, se encuentran recorriendo y sensando los tejidos periféricos, el sistema circulatorio sanguíneo y linfático y los órganos linfoides secundarios (Guermonprez y col., 2002). En periferia estas células captan antígenos a través de dos mecanismos: macropinocitosis o endocitosis mediada por receptores. La macropinocitosis es un mecanismo de endocitosis que no involucra receptores y permite la internalización eficiente de antígenos solubles del medio extracelular circundante, a través de la proyección de pseudópodos y la formación de vesículas endocíticas de gran tamaño. La endocitosis mediada por receptores, es en cambio, un

proceso dependiente de clatrina, a través del cual se internalizan antígenos particulados (Guermonprez y col., 2002).



Ubicación	Tejidos periféricos	Organos linfáticos secundarios
Capacidad endocítica	++	+/–
Capacidad de procesamiento	++	+/–
Expresión de moléculas coestimulatorias y de presentación	+	++
Capacidad estimulatoria de linfocitos T vírgenes	+/–	++

FIGURA 1: **Características generales de las DCs.**

Un gran número de receptores endocíticos se hallan expresados selectivamente por diferentes subpoblaciones de DCs inmaduras. Estas células expresan receptores para el fragmento Fc (FcR) de las inmunoglobulinas (Ig): RFcγI (CD64), RFcγII (CD32), RFcγIII (CD16), RFcα (CD89) y RFcεI (CD23), los cuales permiten la endocitosis de antígenos que hayan interactuado con anticuerpos específicos. También expresan receptores para componentes del complemento como CR3 (CD11b/CD18) y CR4 (CD11c/CD18) que permiten el reconocimiento de microrganismos opsonizados y la internalización de células apoptóticas (Steinman y col., 2003). Las proteínas de shock térmico Hsp70, Hsp90, Gp96 y calreticulina provenientes de células apoptóticas o necróticas son endocitadas por CD91 (Basu y col., 2001). Los receptores "*scavenger*" (RSs) SR-A, SR-B (CD36) y LOX-1 reconocen cuerpos apoptóticos (junto a las integrinas

$\alpha_V\beta_3$ o $\alpha_V\beta_5$) y lipoproteínas propias, así como diversos componentes presentes en bacterias y parásitos (Guermonprez y col., 2002).

Las DCs inmaduras expresan, además, receptores lectina de tipo C (RLCs) los cuales constituyen una gran familia de proteínas que reconocen antígenos glicosilados, presentes en células eucariotas y procariotas. Los distintos tipos de RLCs difieren no sólo en la naturaleza de los residuos sacarídicos que reconocen sino también en los tipos particulares de configuraciones que pueden reconocer (van Kooyk & Rabinovich, 2008). Según su localización y el linaje particular, las DCs presentarán diferentes patrones de expresión de RLCs. Los RLCs mejor caracterizados incluyen el receptor de manosa (RM; CD206), DEC-205 (*dendritic cell receptor for endocitosis*, CD205), DC-SIGN (*dendritic cell–specific ICAM3-grabbing nonintegrin*, CD209), BDCA-2 (*blood DC antigen-2*), DECTIN-1 (*dendritic cell-associated C-type lectin-1*), DCIR (*dendritic cell immunoreceptor*), DCAL-1 (*dendritic cell-associated lectin-1*), C-LEC (*C-type lectin-like receptor*), langerina (CD207) y MGL-1 (*macrophage galactose/N-acetylgalactosamine-specific C-type lectin-1*) (Geijtenbeek y col., 2004).

A diferencia de los RLCs, los receptores tipo Toll (TLRs) no transducen señales de internalización, sin embargo, al reconocer un PMAP activan vías de señalización intracelular que determinan la maduración de DCs y posterior inducción de una respuesta T (Janeway & Medzhitov, 2002). Los TLRs son una familia compuesta por once receptores de membrana, que reconocen distintos PMAP en diferentes compartimentos celulares. Aunque se los identifica a nivel general como RRPs, recientemente, algunos miembros de esta familia han sido asociados al reconocimiento de autoantígenos (Marshak-Rothstein & Rifkin, 2007).

Las DCs inmaduras responderán incrementando su maquinaria de endocitosis y procesamiento frente al reconocimiento directo de PMAPs o a través del reconocimiento vía RFc y/o receptores del complemento. También se activarán indirectamente al reconocer señales de alerta en el microambiente, tales como mediadores de la respuesta inflamatoria (TNF-α, IL-1β, PGE-2, etc.) o moléculas intracelulares (señales de alerta) provenientes de células necróticas o dañadas (HSP, ATP, UTP, ácido úrico) (Gallucci & Matzinger, 2001). En respuesta a estas señales, las DCs inician un programa de diferenciación llamado "maduración" a través del cual se convertirán en CPA profesionales capaces de activar linfocitos T vírgenes.

Durante el proceso de maduración, las DCs reducirán su capacidad endocítica a través de una disminución en la expresión de receptores antigénicos y menor capacidad fagocítica y macropinocítica. Contrariamente a las demás células fagocíticas (monocitos y neutrófilos) que degradan totalmente las moléculas endocitadas, las DCs preservan parcialmente el producto de la endocitosis, mediante la regulación del pH en los compartimentos fagosomales/endosomales (Savina & Amigorena, 2007) . Dichos mecanismos son utilizados a los fines de limitar el rango de antígenos que serán presentados y de "preservar" la información endocitada (Savina & Amigorena, 2007). A su vez, incrementan la expresión del receptor de quimioquinas CCR7, ligando de CCL19 y CCL21, las cuales son expresadas por células endoteliales linfáticas y venas del endotelio alto (HEV) de las zonas T de los órganos linfáticos secundarios, sitios a los cuales se dirigirán las DCs que han iniciado su proceso de maduración. Células dendríticas maduras expresan niveles superiores de las moléculas coestimulatorias CD40, CD80 y CD86 y muestran un aumento marcado en la expresión de complejos péptido antigénico/molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (**Fig.**

1). Este incremento se asocia con una mayor síntesis de las moléculas CMH clase II pero es fundamentalmente, debido a la relocalización de las moléculas de clase II desde el compartimeinto endosomal a la superficie celular (Banchereau y col., 2000; Guermonprez y col., 2002).

Los linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ expresan receptores que reconocerán péptidos antigénicos asociados a moléculas del CMH de clase II y clase I respectivamente. El CMH está codificado por un grupo de genes caracterizados por ser poligénicos, polimórficos y codominantes, lo cual asegura que, al menos un péptido derivado de cualquier patógeno será presentado por alguna molécula del CMH (Janeway, 2005). Hasta el momento se conocen tres vías intracelulares de procesamiento antigénico, la vía exógena o endocítica, la vía endógena o biosintética y la presentación cruzada. En la vía exógena, se procesan los antígenos endocitados. Un conjunto de proteasas se activa a medida que los endosomas disminuyen su pH, las cuales van degradando las proteínas hasta obtener péptidos apropiados para ser ubicados en las moléculas de clase II del CMH. Luego de este proceso, el complejo péptido-CMH II puede ser transportado hacia la membrana celular, sitio donde podrá presentar el péptido antigénico a células T $CD4^+$ (Banchereau y col., 2000). La vía exógena es la utilizada, preferentemente, para la presentación de antígenos provenientes de microorganismos extracelulares, intravesiculares y también para virus con envoltura, que ingresan en el citoplasma luego de transitar por el compartimiento endosomal. Por otra parte, varias proteínas de membrana, sean propias de la célula o codificadas por patógenos intracelulares, también serán procesadas y presentadas por esta vía, al igual que cuerpos apoptóticos y necróticos.

Por otro lado, la mayoría de los péptidos a ser presentados en el contexto de las moléculas de clase I del CMH a las células T $CD8^+$, son generados por el proteosoma, el cual degrada proteínas ubiquitinadas; esto significa que tanto proteínas propias localizadas a nivel intracelular como provenientes de patógenos que se replican en el citosol, son sometidas a esta forma de procesamiento. Los péptidos resultantes se transfieren al lumen del retículo endoplásmico (RE) mediante transportadores especializados y unidos, con la ayuda de chaperonas (ej. calnexina y calreticulina), a moléculas CMH clase I. Una vez que el péptido se halla asociado al CMH I, el complejo migra a través del aparato de Golgi hacia la membrana plasmática (Abbas & Lichtman, 2004).

La tercera vía conocida, la presentación cruzada, surge de la intersección de las vías endógena y exógena. Esta vía se requiere a los fines de iniciar una respuesta inmune citotóxica contra bacterias intravesiculares, virus, tumores, como también para mantener la tolerancia hacia autoantígenos (Guermonprez y col., 2002; Steinman y col., 2003). Este mecanismo consiste en la presentación de antígenos exógenos por moléculas del CMH de clase I. Luego de la internalización, los antígenos proteicos son parcialmente degradados en fragmentos grandes, exportados al citosol y procesados por el proteosoma (Savina & Amigorena, 2007). Aún se halla en discusión la vía por la cual los péptidos son unidos al CMH I, si es que estos son transportados al lumen del RE ó si existen fagosomas con moléculas CMH I y las proteínas necesarias para la translocación del péptido, o ambas (Savina & Amigorena, 2007). Existen subpoblaciones de DCs con mayor capacidad de realizar presentación cruzada. Además, la fagocitosis y especialmente la endocitosis mediada por receptores son las vías más eficientes a los fines de inducir esta forma de presentación (Guermonprez y

col., 2002). En este contexto, existen inmunoterapias en las cuales, mediante anticuerpos anti-DEC-205 unidos a un antígeno específico se logra un efecto adyuvante en la inducción de una respuesta citotóxica (Bonifaz y col., 2004).

Finalmente, otra vía de presentación antigénica es la mediada por las moléculas CD1, estas moléculas presentan lípidos y glicolípidos propios y de patógenos, especialmente a linfocitos Tγδ y células NKT (Moody & Porcelli, 2003). Las moléculas CD1 no son polimórficas y están asociadas a β2-microglobulina, por lo que conservan una estructura típica de moléculas de clase I del CMH (Moody & Porcelli, 2003).

1.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS: PIVOTALES EN EL DESARROLLO DE LA RESPUESTA INMUNE

La interacción de DCs con linfocitos T vírgenes puede perfilar la respuesta inmune hacia diferentes fenotipos o incluso inducir tolerancia de linfocitos T. Esto dependerá de: a) el subtipo de DCs, b) los receptores estimulados, c) el tipo y la dosis del antígeno, d) la vía de inmunización y e) el microambiente circundante a la CPA (Guermonprez y col., 2002). La activación del linfocito T, que se encuentra en contacto cercano con la DC, requiere dos señales: señal 1, dada por el reconocimiento del péptido antigénico presentado por las moléculas del CMH, a través del TCR. Involucra, además, el reconocimiento de sitios no polimórficos de las moléculas CMH I y II por parte de los receptores CD8 y CD4, respectivamente. La señal 2, por otro lado, es provista por moléculas coestimulatorias expresadas en la DC (CD80, CD86), que interactúan con sus ligandos, expresados en el linfocito T (CD28) (Banchereau y col., 2000).

Si durante el proceso de maduración la DC resulta ser inmunogénica, los clones T se diferenciarán a linfocitos T cooperadores o *helper* (Th) en el caso de una célula T $CD4^+$ y a linfocitos T citotóxicos (LTC) en el caso de una célula T $CD8^+$. Los LTC desempeñan un papel central en la erradicación o control de infecciones virales y en la respuesta inmune anti-tumoral. Los linfocitos Th, a su vez no constituyen una población homogénea sino que luego de la activación pueden diferenciarse en diversas subpoblaciones efectoras, entre las cuales pueden mencionarse los linfocitos Th1, Th2 y Th17 a las cuales recientemente se ha sumado la población Th9. Estas subpoblaciones difieren en la forma de inducción, los patrones de circulación, el perfil de citoquinas que producen y los mecanismos efectores que activan (Janeway, 2005). Además, las citoquinas características de cada perfil promueven la diferenciación de la propia subpoblación y en algunos casos pueden inhibir el desarrollo de otras subpoblaciones (O'Garra & Arai, 2000).

Si la DC produce IL-12 en ausencia de IL-4 o citoquinas inmunosupresoras, la célula T $CD4^+$ se diferenciará hacia un perfil Th1. Los linfocitos Th1 se describen como células productoras de IFN-γ, IL-2 y linfotoxina-β y son esenciales en la activación de una respuesta inmune mediada por células fagocíticas, especialmente frente a patógenos intravesiculares. El IFN-γ producido por los linfocitos Th1 estimula la actividad microbicida de las células fagocíticas, lo cual favorece la destrucción intracelular de los microorganismos fagocitados. El IFN-γ también estimula la síntesis de anticuerpos IgG opsonizantes y fijadores de complemento, que facilitan la fagocitosis. Asimismo, las células Th1, a través de la interacción CD40-CD40 ligando, aumentan la capacidad de las DCs de estimular células T $CD8^+$ facilitando la respuesta citotóxica (Abbas & Lichtman, 2004; Janeway, 2005). A su vez, estas células han sido

tradicionalmente asociadas al desarrollo de patologías autoinmunes órgano-específicas (Abbas & Lichtman, 2004).

Por el contrario, en la diferenciación hacia un perfil Th2 es importante la presencia de IL-4 (producidas por células NKT y en menor grado mastocitos) y en este caso las DCs estimulan al linfocito T $CD4^+$ en ausencia de IL-12. Esta respuesta emerge luego del desafío con helmintos y alergenos, que generalmente producen una estimulación crónica de los linfocitos T. Los mecanismos efectores asociados a este perfil linfocitario se hallan principalmente asociados a las reacciones inmunes mediadas por IgE, eosinófilos y mastocitos. A su vez, los linfocitos Th2 colaboran con las células B a los fines de promover la diferenciación a células plasmáticas involucradas en la síntesis de anticuerpos y son importantes en la erradicación de parásitos helmintos y otros patógenos extracelulares. Estas células se encuentran implicadas en el desarrollo de patologías alérgicas (Abbas & Lichtman, 2004; Janeway, 2005).

Recientemente se ha descripto un nuevo linaje de células $CD4^+$ que poseen un alto potencial patogénico en enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes (Weaver y col., 2006). Estas células se caracterizan por producir IL-17 y se denominan linfocitos Th17 (Steinman, 2007). Actualmente estas células son objeto de numerosos estudios y al momento la literatura indica que la diferenciación hacia el perfil Th17, depende de la producción de IL-23 e IL-6 por parte de las DCs (Weaver y col., 2006). De este modo, la IL-6 junto con el factor de crecimiento transformante-β (TGF-β) promueven la inducción de células Th17 mientras que la IL-23 favorece la diferenciación terminal. Las células Th17 actúan ante infecciones por hongos y

bacterias extracelulares y son las responsables de perpetuar procesos autoinmunes e inflamatorios crónicos (McGeachy & Cua, 2008). Muy recientemente ha surgido una nueva población potencial denominada Th9 con gran capacidad patogénica durante la respuesta inflamatoria generada en presencia de IL-4 y TGF-β y productora de altos niveles de IL-9 e IL-10 (Dardalhon y col., 2008). Finalmente, las DCs pueden inducir la diferenciación a células T de memoria de una parte de los clones activados. Estas células persistirán por prolongados períodos de tiempo, permitiendo responder rápidamente a una futura exposición al antígeno (Janeway, 2005). En este sentido, en ausencia de colaboración de células T $CD4^+$ con DCs, el establecimiento de memoria en las respuestas T $CD8^+$ se halla severamente comprometido (Badovinac y col., 2005; Trumpfheller y col., 2006).

Además del papel fundamental que poseen las DCs en el inicio de la respuesta inmune y la generación de memoria inmunológica, también cumplen un papel crítico en la inducción y mantenimiento de tolerancia, tanto central como periférica. En la tolerancia central, las DCs de la médula del timo, junto a las células del epitelio tímico, cumplen un papel central en la selección negativa, presentando antígenos propios a timocitos en desarrollo (Brocker y col., 1997). La tolerancia central es eficiente, pero aún así células T autorreactivas son capaces de evadir la selección negativa, especialmente aquéllas que poseen baja afinidad por antígenos propios ó en aquellos casos en los cuales los autoantígenos no se expresen en el timo (Steinman y col., 2003). Por lo tanto, la tolerancia periférica es necesaria a los fines de complementar a la tolerancia central. Mecanismos eficaces de tolerancia son importantes especialmente en los focos infecciosos y tejidos inflamados, sitios en los cuales las DCs

captarán y procesarán antígenos propios y extraños para luego ser presentados en órganos linfáticos secundarios.

Por otro lado, la tolerancia periférica implica procesos como: (a) la ignorancia inmunológica en la cual el antígeno no alcanza una concentración suficiente o no permanece por el tiempo debido como para ser eficientemente presentado por las CPAs; (b) la apoptosis inducida por activación, proceso a través del cual los clones linfocitarios mueren luego de una activación sostenida en el tiempo; (c) la anergia clonal, proceso a través del cual la presentación del antígeno en el contexto de moléculas CMH induce una eficiente estimulación del TCR (señal 1), pero en ausencia de una coestimulación suficiente (señal 2) por parte de DCs, este efecto tendrá como resultado la inhibición de la proliferación y de las funciones efectoras; (d) células T regulatorias con actividad supresora, las cuales pueden generarse en el microambiente tímico dando lugar a células T regulatorias naturales (Treg; $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$), ó en periferia inducidas por DCs tolerogénicas (Adler & Steinbrink, 2007; Greenwald y col., 2005; Steinman & Banchereau, 2007; Szabo y col., 2003).

Hoy sabemos que las DCs inmaduras residentes en los tejidos periféricos migran constantemente hacia los ganglios linfáticos en ausencia de señales inflamatorias; tradicionalmente estas células se han caracterizado por presentarse en forma inmadura, semimadura o en estado estacionario. Las DCs semimaduras expresan niveles reducidos de CD40, de CD80 y CD86, una capacidad limitada para producir IL-12 y un aumento en la producción de IL-10. La presentación antigénica por parte de estas CD conduce al silenciamiento del clon activado (anergia clonal) (Rutella y col., 2006b). En este sentido, recientemente se ha demostrado que DCs semimaduras

son capaces de inducir la expresión de las moléculas inhibitorias PD-1 (*programmed death-1*) y CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4*) a los fines de promover tolerancia periférica en células T $CD8^+$ (Probst y col., 2005).

Las células Tregs son capaces de impedir una respuesta producida por células T efectoras por medio de citoquinas supresoras como IL-10 y TGF-β o por contacto célula-célula a través de moléculas como CTLA-4 (Sakaguchi, 2005). A su vez, actuando sobre las DCs, las Tregs pueden inhibir la expresión de las moléculas coestimulatorias CD80 y CD86 vía CTLA-4 y LFA-1 (*lymphocyte-function associated antigen*-1) (Onishi y col., 2008). De manera similar, vía CTLA-4, las Tregs aumentan la actividad de la enzima IDO (indoleamina 2,3-dioxigenasa) en DCs (von Boehmer, 2005). La disminución del triptófano, junto al aumento de su metabolito kinurenina, causa en células T $CD4^+$ un aumento en la producción de IL-10 y TGF-β (Fallarino y col., 2006; von Boehmer, 2005) y consecuente supresión de la respuesta inmune.

Las DCs tolerogénicas son células que pueden encontrarse en diferentes estadios de maduración y activación y pueden inhibir la polarización de la respuesta inmune hacia perfiles inflamatorios, a la vez que facilitan la proliferación de Treg naturales ó generan células T regulatorias como las Treg inducibles $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (iTreg), los linfocitos Th3 productores de TGF-β a nivel de mucosas y las células Tr1 productoras de IL-10 (Dubsky y col., 2005; Morelli & Thomson, 2007; Rutella y col., 2006b; Steinman & Banchereau, 2007).

Debido a su destacada plasticidad, las DCs tolerogénicas se originan como resultado de las distintas interacciones de las células con el medio ambiente. Por ejemplo, el reconocimiento por RLC de antígenos propios en ausencia de inflamación

conduce a la diferenciación de DCs tolerogénicas. Por el contrario, en una situación en la que tanto los RLCs como los TLRs son estimulados, se iniciará una respuesta inmune de tipo Th1, Th2 o Th17 dependiendo de los receptores activados (Geijtenbeek y col., 2004). Asimismo, estudios recientes demuestran que diferentes factores de crecimiento, neuropéptidos y citoquinas son capaces de originar DCs tolerogénicas. Estos incluyen IL-10 (Steinbrink y col., 1997; Steinbrink y col., 2002; Wakkach y col., 2003), TGF-β (Faunce y col., 2004), péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Chorny y col., 2005), 1,25-dihidroxivitamina D3 (vitamina D3) (Penna y col., 2007), curcumina (Kim y col., 2005) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Rutella y col., 2006a), entre otros (Rutella y col., 2006b).

Las DCs tolerogénicas inducen tolerancia periférica a través de la modulación de células T regulatorias utilizando diferentes mecanismos. Las DCs pueden estimular la proliferación de Tregs a través de TGF-β (Ghiringhelli y col., 2005), a través del contacto célula-célula o por una combinación de ambos mecanismos (Walker y col., 2003). Por otro lado, DCs deficientes en moléculas coestimulatorias ó que expresan niveles incrementados del ligando de PD-1 (PD-L1) favorecen la diferenciación de iTregs (Benson y col., 2007; Wang y col., 2008). Asimismo, DCs que endocitaron cuerpos apoptóticos producen altos niveles de TGF-β los cuales favorecen la diferenciación de iTregs (Perruche y col., 2008). En este sentido, se ha demostrado que diferentes subpoblaciones de DCs en diferentes compartimentos generan iTregs a través de TGF-β (Belkaid & Oldenhove, 2008).

Por otro lado, las células Tr1 constituyen una de las poblaciones de células T regulatorias más relevantes y estudiadas en autoinmunidad, cáncer e infecciones

(Roncarolo y col., 2006). Los linfocitos Tr1 ejercen su acción inmunosupresora fundamentalmente mediante la liberación de IL-10 inhibiendo tanto a las DCs como a las células T vírgenes y de memoria. Esta citoquina disminuye la expresión de moléculas coestimulatorias y de citoquinas proinflamatorias en CPAs, e inhibe la producción de IL-2 y TNF-α en células T $CD4^+$ (Roncarolo y col., 2006). En los últimos años se ha asignado un papel central a la IL-10 producida por DCs en la diferenciación de células Tr1; sin embargo, recientemente se ha demostrado que esta citoquina no cumpliría estrictamente este papel (Maynard y col., 2007). Por el contrario, recientes estudios sugieren que la IL-27, junto a IL-6 tendrían un papel determinante en la inducción de esta población regulatoria en ratones (Awasthi y col., 2007; Fitzgerald y col., 2007; Stumhofer y col., 2007).

A través de los mecanismos mencionados en esta Sección, el sistema inmune logra promover una eficiente estimulación antigénica que conducirá a la eliminación de organismos patógenos y tumores, o por el contrario permitirá mantener la tolerancia periférica a los fines de evitar respuestas autoinmunes. Sin embargo, estos mecanismos ocasionalmente fallan, generando diversas patologías. Por lo tanto, la posibilidad de descifrar los mecanismos implicados en la generación de una respuesta antígeno-específica o en la inducción de tolerancia inmunológica, permitirá diseñar nuevas estrategias terapéuticas tendientes a potenciar el sistema inmune frente a desafíos microbianos y cáncer o inhibir una respuesta no deseada en procesos alérgicos y enfermedades autoinmunes.

1.4 GALECTINAS

Las galectinas constituyen una familia de proteínas que poseen la capacidad de unirse a residuos sacarídicos presentes en diferentes glicoproteínas de la membrana plasmática y la matriz extracelular. Estas proteínas reconocen en forma específica unidades repetitivas [Galβ1-4-NAcGlc] presentes en *N*- y *O*-glicanos, a través de un dominio altamente conservado, de 135 aminoácidos, denominado dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC)(Cooper, 2002). Se han identificado 15 galectinas en mamíferos, las cuales se clasifican de acuerdo a su estructura en galectinas "prototipo", "quimera" y "repeticiones en tándem" (**Fig. 2**) (Yang y col., 2008). Las galectinas "prototipo" (galectinas-1, -2, -5, -7, -10, -13, -14 y -15) poseen un único DRC y pueden formar homodímeros generando de este modo lectinas funcionalmente bivalentes. Galectina-3 es la única galectina tipo "quimera" descripta y posee un DRC en el extremo C-terminal y un dominio N-terminal no relacionado que facilita su oligomerización (Rabinovich y col., 2007). Las galectinas del tipo "repeticiones en *tandem*" (galectinas-4, -6, -8, -9 y -12) poseen dos DRCs en una misma cadena polipeptídica, por lo cual son naturalmente bivalentes aunque cada DRC pueda reconocer estructuras sacarídicas sutilmente diferentes (Cooper, 2002).

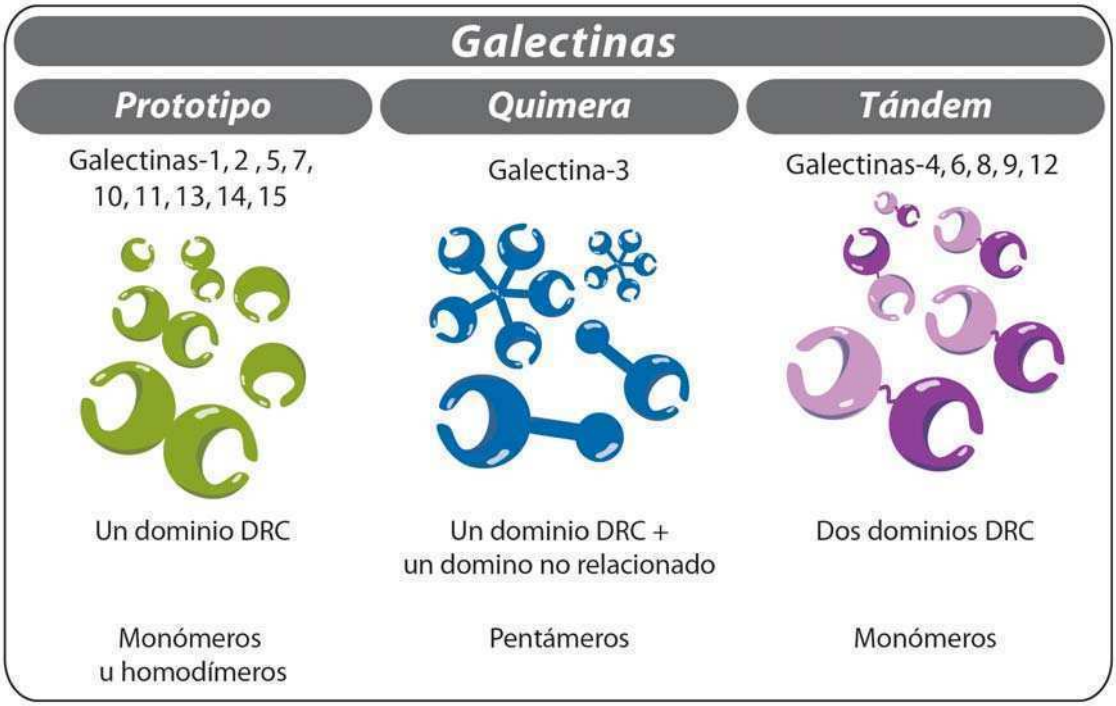


FIGURA 2: **Clasificación estructural de las galectinas.**

En el contexto del sistema inmune la expresión de galectinas es baja en células vírgenes y en reposo pero aumenta considerablemente luego de un estímulo de activación y/o diferenciación, como en el caso de linfocitos T, linfocitos B y macrófagos activados (Rabinovich y col., 1998; Rabinovich y col., 2004). Las galectinas pueden localizarse en diferentes compartimientos y se han descripto diversas funciones intracelulares y extracelulares para las mismas (**Fig. 3**) (Liu y col., 2002; Rabinovich y col., 2007). Si bien estas proteínas se encuentran en el medio extracelular, en su secuencia primaria no poseen péptido lider lo cual impide su secreción por la vía clásica dependiente del RE y el aparato de Golgi; en cambio estas proteínas son liberadas al medio extracelular por un mecanismo atípico denominado ectocitosis (Yang y col., 2008).

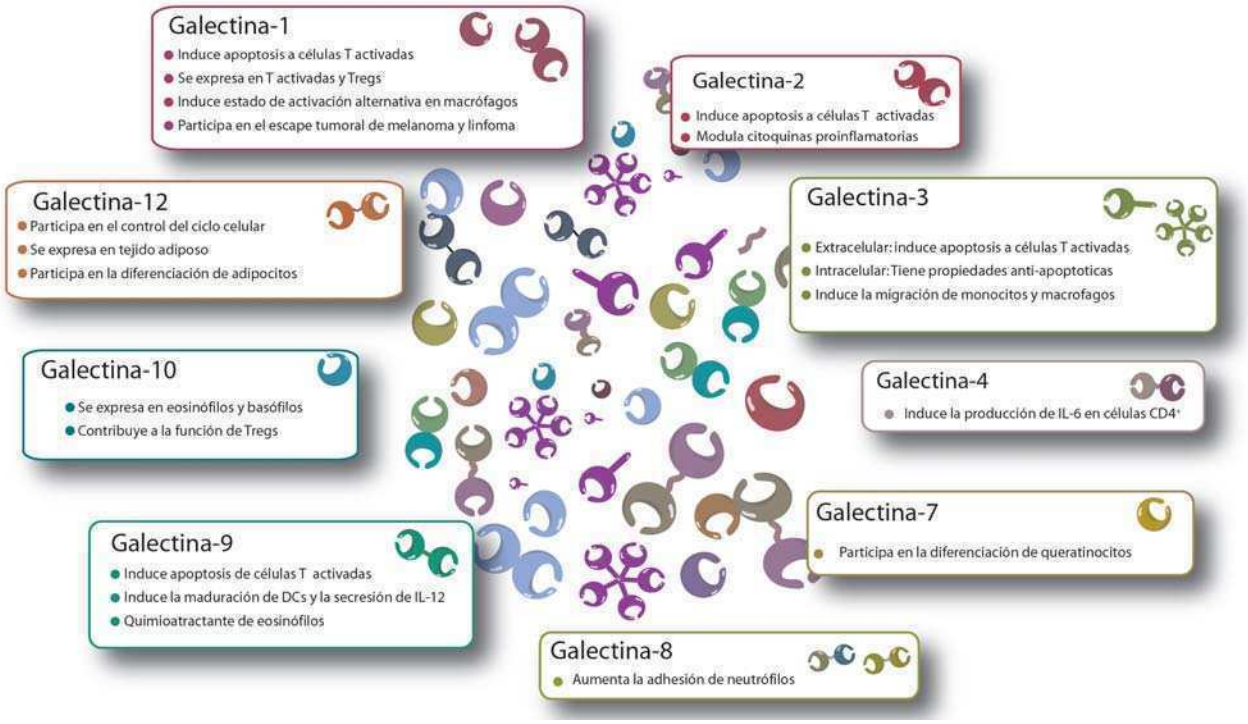


FIGURA 3: **Efectos de diversas galectinas sobre la regulación del ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis.**

1.5 GALECTINA-1: PROTEÍNA DE UNIÓN A CARBOHIDRATOS CON PROPIEDADES INMUNOREGULATORIAS

Durante los últimos años se ha asignado a las galectinas un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune (Rabinovich y col., 2007; Sato & Nieminen, 2004). En particular, galectina-1 ha sido implicada en la regulación de la maduración, migración, activación y sobrevida de los linfocitos T tanto a nivel central (estroma tímico) como periférico (**Fig. 3**). Se ha demostrado que esta proteína inhibe la proliferación y expansión clonal de linfocitos T activados, mediante mecanismos que involucran bloqueo de la activación celular (Chung y col., 2000), arresto del ciclo celular (Blaser y col., 1998; Rabinovich y col., 1997) e inducción de apoptosis (Perillo y col., 1995; Rabinovich y col., 1998; Rabinovich y col., 2002). A su vez se ha demostrado que esta proteína, a bajas concentraciones, posee propiedades inmunosupresoras

independientes de su efecto proapoptótico ya que es capaz de inhibir la adhesión de linfocitos T activados a diferentes proteínas de la matriz extracelular, tales como laminina y fibronectina, y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF-α e IFN-γ (Rabinovich y col., 1999a).

Las propiedades antiinflamatorias de galectina-1 han sido ampliamente demostradas en diferentes modelos de inflamación crónica y autoinmunidad (**Fig. 4**). Particularmente, se ha demostrado que la administración de galectina-1, por terapia génica o proteica, disminuye la respuesta inflamatoria y las manifestaciones clínicas de la artritis inducida por colágeno (AIC), un modelo experimental de artritis reumatoidea en ratón (Rabinovich y col., 1999b). En este modelo el tratamiento provoca un aumento en la susceptibilidad de los linfocitos T autorreactivos a la apoptosis y un desvío de la respuesta hacia un perfil Th2 caracterizado por una disminución en la producción de IFN-γ y un aumento de la expresión de IL-5. Estos resultados han sido reproducidos en numerosos modelos de autoinmunidad órgano-específica como la colitis inducida por ácido sulfónico trinitrobenzeno (TNBS), hepatitis inducida por concanavalina A, diabetes autoinmune y uveítis autoinmune experimental, entre otros (Baum y col., 2003; Perone y col., 2006; Santucci y col., 2000; Santucci y col., 2003; Toscano y col., 2006). Asimismo, en un modelo experimental de rechazo fetal inducido por *stress*, observamos que la administración de galectina-1 restaura la tolerancia mediante el desvío de la respuesta inmune hacia un perfil Th2 y la expansión de células T regulatorias (Blois y col., 2007). Recientes evidencias de nuestro laboratorio indican que galectina-1 en conjunción con sus glicanos específicos, actúan como reguladores homeostáticos selectivos de respuestas Th1 y Th17 al inducir la apoptosis de estas

células sin afectar las células Th2, debido a que los receptores para galectina-1 en estas células se encuentran decorados con ácido siálico en posición α2-6, lo cual impide la unión de esta lectina. La administración de galectina-1 inhibe la inflamación mediada por células Th1 y Th17 durante la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) (Toscano y col., 2007). En este contexto, ratones deficientes en galectina-1 desarrollan patologías autoinmunes con mayor severidad y presentan rechazo fetal en cruzas alogénicas (Blois y col., 2007; Toscano y col., 2007).

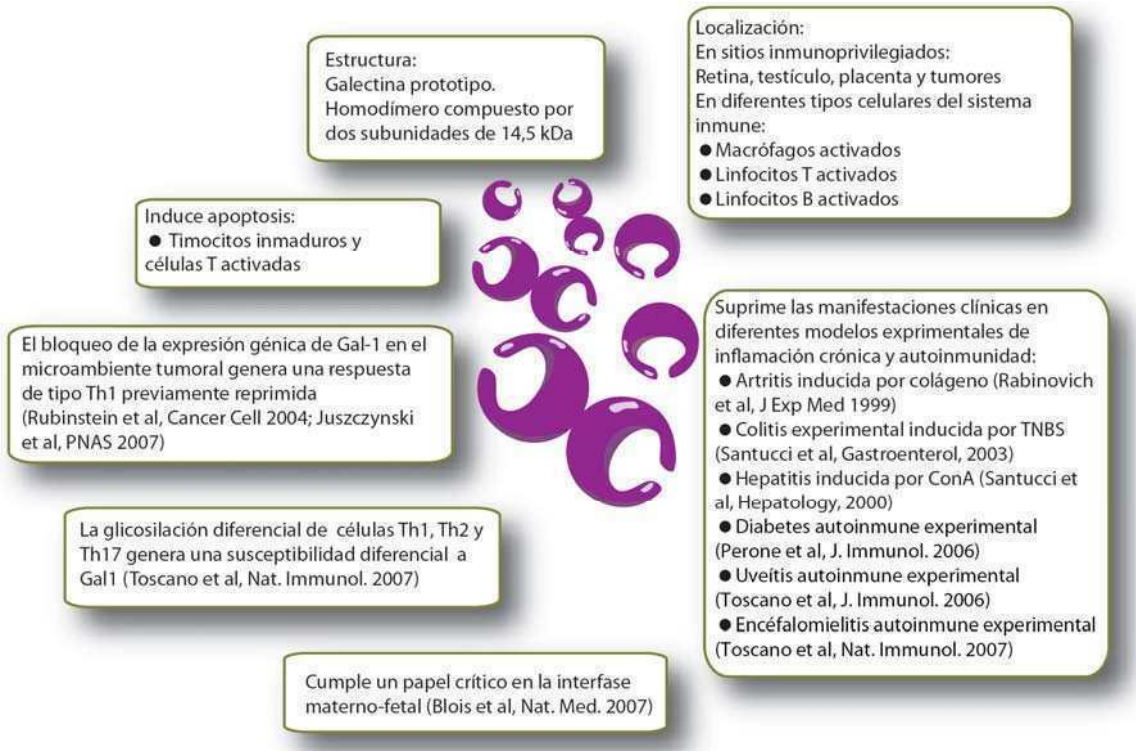


FIGURA 4: **Propiedades inmunosupresoras de galectina-1**

Galectina-1 se expresa en numerosos tipos celulares y se ha demostrado que en determinadas condiciones inflamatorias, linfocitos T estimulados con antígenos (Blaser y col., 1998), células B activadas (Zuniga y col., 2001) y células T aloreactivas son capaces de secretar niveles considerables de esta proteína (Rabinovich y col., 2002). A su vez, recientemente se ha a descripto que células Treg expresan niveles superiores

de galectina-1 respecto a linfocitos T efectores demostrando en ensayos *in vitro* que esta proteína actuaría como un mediador clave para la función inmunosupresora de estas células (Garin y col., 2007).

Se ha demostrado que galectina-1 regula en forma diferencial la sobrevida de timocitos $CD4^{-}CD8^{-}$ o $CD4^{+}CD8^{+}$, sugiriendo la posible implicancia de esta lectina en la tolerancia central (Bi y col., 2008; Stillman y col., 2006). Finalmente, en células B, se ha demostrado que galectina-1 participa en la unión del pre-BCR a las células estromales durante el desarrollo de estas células. En periferia, la expresión de galectina-1 se halla regulada por el factor de transcripción Blimp-1 y contribuye a la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas (Rabinovich & Toscano, 2009). Notablemente, Clark y colaboradores, demostraron que el gen de galectina-1 se halla sobreexpresado en células B anérgicas *versus* células B convencionales (Clark y col., 2007).

A su vez, en el modelo experimental de melanoma B16 en ratones, se demostró previamente que galectina-1, sintetizada y secretada por células de melanoma, inhibe el desarrollo de una respuesta inmune Th1 antitumoral efectiva favoreciendo la progresión tumoral (Rubinstein y col., 2004). Recientemente, estudios realizados en linfoma Hodgkin confirmaron el papel de galectina-1 como factor promotor del escape tumoral a través de un mecanismo dependiente del factor de transcripción AP1 (Juszczynski y col., 2007).

Galectina-1 ha demostrado tener preferencias por determinadas glicoproteínas en el sistema inmune, tales como CD2, CD3, CD7, CD43 y CD45 (Baum y col., 1995; Fouillit y col., 2000; Pace y col., 1999; Perillo y col., 1995; Walzel y col., 2000). Con respecto a la transducción de señales a través de sus receptores, se ha descripto que la

unión de galectina-1 induce una redistribución de estos en microdominios o *clusters* en el plano de la membrana plasmática (Walzel y col., 1999). Por ejemplo, la molécula CD45 posee dos dominios fosfatasa en su extremo citoplasmático y se considera que las señales de muerte se desencadenan por una inhibición de la actividad fosfatasa a causa de la proximidad espacial de los receptores en estos microdominios o *clusters* (Majeti y col., 1998). Comprender la relación funcional entre los diferentes receptores para galectina-1 y los eventos intracelulares que conducen a un fenómeno biológico determinado, constituye un gran desafío. Probablemente esto se debe a la capacidad de galectina-1 de interaccionar con numerosos receptores en la membrana celular. De este modo, la composición de los *clusters* formados por galectina-1 varía de acuerdo al nivel de expresión y al estado de glicosilación de cada receptor. En última instancia sería la combinación de dichos receptores y su glicofenotipo lo que determinaría la activación de diferentes cascadas de señalización, y en consecuencia los diferentes efectos biológicos inducidos por galectina-1.

Durante el desarrollo de la respuesta inmune innata, se ha demostrado que galectina-1 contribuye a la resolución de la inflamación aguda. En este sentido, galectina-1 inhibe el reclutamiento y degranulación de mastocitos y eosinófilos (Vasta & Ahmed, 2009). En neutrófilos, esta proteína bloquea el reclutamiento al sitio de la inflamación y promueve la exposición de fosfatidilserina (La y col., 2003; Rabinovich y col., 2000; Stowell y col., 2007). Asimismo, macrófagos activados producen niveles considerables de galectina-1 (Rabinovich y col., 1996), la cual regula el balance entre el estado de activación clásico (proinflamatorio) o alternativo (antiinflamatorio) en estas células (Correa y col., 2003). Galectina-1 en macrófagos inhibe la síntesis de óxido nítrico, ácido araquidónico y PGE_2, incrementa la actividad de arginasa e interfiere en

la capacidad estimulatoria de células T (Correa y col., 2003; Rabinovich y col., 2000; Rabinovich & Toscano, 2009). Finalmente, células NK deciduales regulan negativamente la sobrevida de linfocitos T a través de mecanismos dependientes de galectina-1 (Kopcow y col., 2008).

El patrón de expresión de galectina-1 y la diversidad de funciones antiinflamatorias observadas, sugirieron que esta proteína podría cumplir un papel crítico en la fisiología y homeostasis de DCs.

2. OBJETIVOS

EN FUNCIÓN DE ESTOS ANTECEDENTES PLANTEAMOS LOS SIGUIENTES OBJETIVOS:

- ***Evaluar la posibilidad de que galectina-1 modifique la funcionalidad de células dendríticas humanas y de ratón.***

- ***Investigar las bases celulares y moleculares de los efectos de galectina-1 sobre la fisiología las células dendríticas.***

- ***Estudiar el impacto de la interacción galectina-1-células dendríticas sobre la iniciación, amplificación y resolución de la respuesta inmune.***

- ***Explorar la regulación de la expresión de galectina-1 en células dendríticas frente a estímulos inflamatorios o tolerogénicos.***

- ***Investigar la relevancia de galectina-1 endógena en la resolución de la respuesta inflamatoria.***

3. RESULTADOS

3.1 IMPACTO DE GALECTINA-1 EN LA FISIOLOGÍA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS

3.1.1 Galectina-1 inhibe la diferenciación de DCs humanas

En función de las propiedades antiinflamatorias de galectina-1 en eventos tempranos y tardíos de la respuesta inmune (Perone y col., 2006; Rabinovich y col., 1999; Santucci y col., 2003; Toscano y col., 2006; Toscano y col., 2007), se llevaron a cabo experimentos a los fines de determinar si la exposición a esta proteína durante la diferenciación de DCs humanas podría resultar en cambios fenotípicos y funcionales relevantes. Como una primera aproximación a esta premisa, decidimos explorar si los monocitos humanos exhibían sitios de unión galectina-1 en su superficie. A tal fin, analizamos la unión de galectina-1 biotinilada por citometría de flujo. Observamos que galectina-1 se une a monocitos en forma dosis-dependiente a través de una unión específica a ligandos sacarídicos, ya que la incubación con lactosa (disacárido específico para el DRC), pero no con sacarosa (azúcar sin afinidad por el DRC), inhibe la unión de esta proteína a la superficie de estas células (**Fig. 5A**). Estos resultados indican que la interacción entre galectina-1 y monocitos es específica y dependiente del DRC de esta lectina, permitiéndonos especular que los monocitos humanos podrían ser susceptibles a la acción de galectina-1. A los fines de evaluar esta hipótesis, se diferenciaron monocitos humanos a DCs inmaduras (iDCs) en presencia del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e IL-4 durante 6 días, en ausencia (iDCs) o presencia (iDC_{Gal1}) de galectina-1. Mientras que las iDCs

(diferenciadas en ausencia de galectina-1) mostraron el perfil característico de marcadores de membrana (baja expresión de CD14, alta expresión de CD1a y HLA-DR) (**Fig. 5A**), la exposición a galectina-1 durante el proceso de diferenciación generó DCs con expresión reducida de CD1a y niveles incrementados de CD14 en comparación con iDCs controles (**Fig. 5B**). Este efecto fue inhibido cuando DCs se diferenciaron en presencia de galectina-1 y lactosa (**Fig. 5C**), sugiriendo que galectina-1 interfiere en la diferenciación de monocitos a DCs inmaduras de una manera dependiente de la dosis y del DRC de esta proteína.

Las iDCs se caracterizan fundamentalmente por su alta capacidad endocítica y de procesamiento de antígenos y habilidad moderada para activar células T (Guermonprez y col., 2002). Notablemente, las iDCs diferenciadas en presencia de galectina-1 (iDC_{Gal1}) exhibieron una capacidad significativamente disminuida de endocitar ovoalbúmina (OVA) en comparación con iDCs controles (**Fig. 5D**). Asimismo, las iDC_{Gal1} fueron incapaces de activar una respuesta de células T $CD4^+$ alo-reactivas (**Fig. 5E**) generando una producción significativamente inferior de IFN-γ en dichos cultivos respecto a células T $CD4^+$ estimuladas con iDCs controles (**Fig. 5F**). A la luz de estos resultados, nos propusimos investigar si la magnitud del efecto observado podría deberse a que galectina-1 modularía la sobrevida de estas células, ya que previamente se ha demostrado que esta lectina induce apoptosis en células T activadas (Rabinovich y col., 1998; Rubinstein y col., 2004; Stillman y col., 2006; Toscano y col., 2007). Al evaluar la apoptosis a lo largo de la diferenciación, no observamos diferencias entre las DCs diferencias en presencia de galectina-1 y las DCs controles (**Fig. 5G**), resultado concordante con el número total de células viables durante el tratamiento con galectina-1 (**Fig. 5H**).

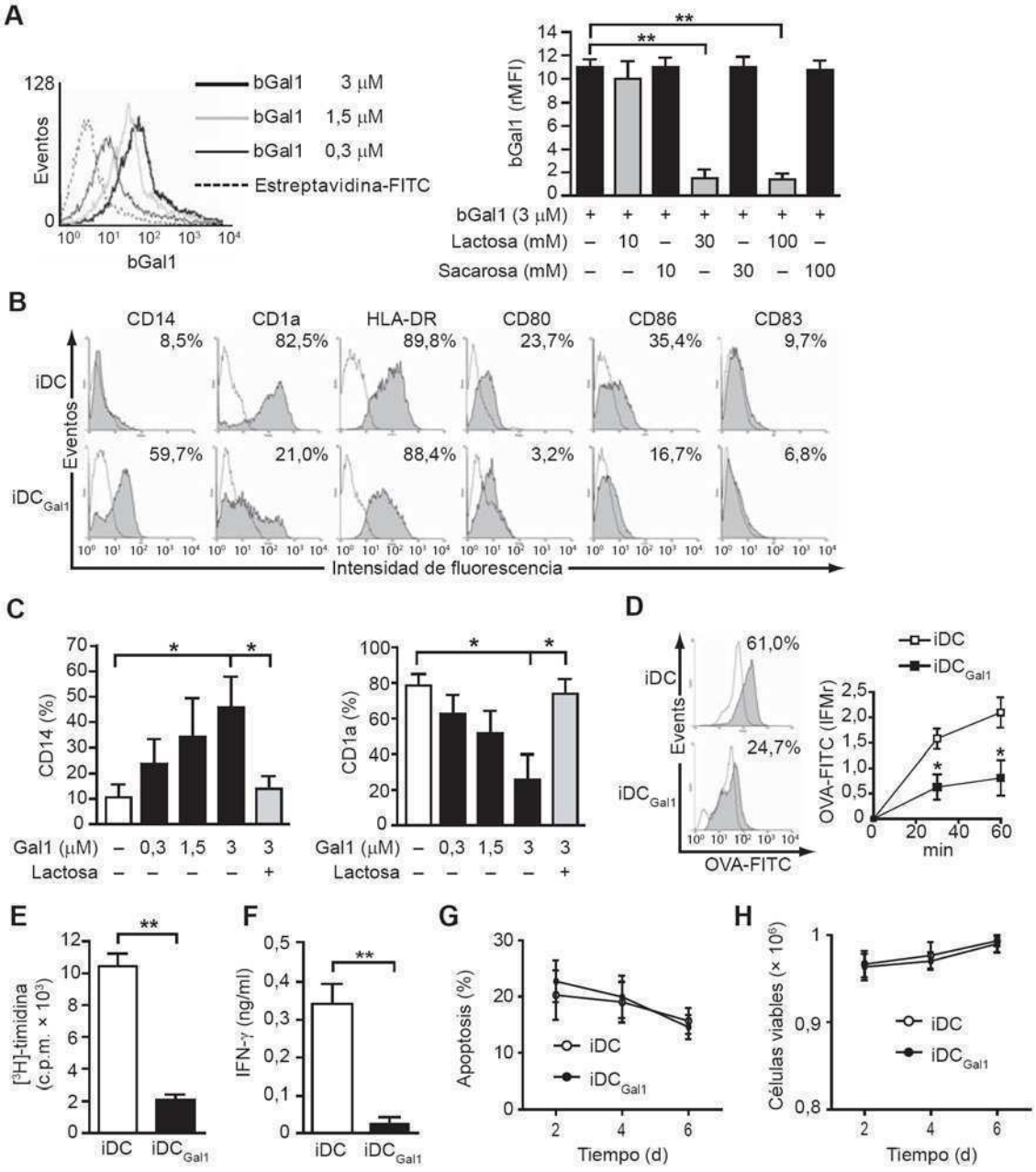


***FIGURA 5*: Galectina-1 interfiere en la diferenciación de DCs humanas**. Análisis de DCs humanas diferenciadas a partir de monocitos en presencia de GM-CSF e IL-4 en ausencia (iDC) o presencia (iDC$_{Gal1}$) de galectina-1 (Gal1) (3 μM a excepción que se indique lo contrario). (**A**) Izquierda: la unión de Gal1 biotinilada (bGal1; 0,3, 1,5, y 3 μM) a monocitos de sangre periférica se detectó utilizando estreptavidina-FITC y citometría de flujo. Derecha: la especificidad de la unión de bGal1 (3 μM) se determinó utilizando un inhibidor específico del DRC (lactosa 10, 30 y 100 mM) y un disacárido no específico (sacarosa 100 mM). Como control negativo se utilizó estreptavidina-FITC solamente. Los resultados se expresan como intensidad de fluorescencia media relativa (IFMr) = [(IFM bGal1 – IFM control negativo)/IFM control negativo]. (**B**) Fenotipo de iDC o iDC$_{Gal1}$ (Izquierda; línea delgada: controles de isotipo; gris: marcadores de diferenciación). (**C**) Modulación de la expresión de CD14 y CD1a en presencia de distintas concentraciones de Gal1 y lactosa (30mM). (**D**) Análisis por citometría de flujo de la endocitosis de OVA-FITC por iDCs e iDC$_{Gal1}$ (izquierda; línea delgada: endocitosis a 4 ºC; sombreado gris: endocitosis 37 ºC). Estudio de endocitosis en función del tiempo (derecha; IFMr: IFM a 37 ºC – IFM a 4 ºC)/IFM a 4 ºC). (**E**) Incorporación de [^{3}H]-timidina por células T CD4$^+$ alogénicas cultivadas por 5 d con iDC o iDC$_{Gal1}$ (proporción DC:T, 1:5). (**F**) Niveles de IFN-γ en sobrenadantes de los cultivos alogénicos medidos por ELISA. (**G**) Susceptibilidad de iDC o iDC$_{Gal1}$ a la apoptosis inducida por Gal1 luego de 2, 4 y 6 d de exposición a esta proteína. El porcentaje de células apoptóticas se determinó por tinción con Anexina V y citometría de flujo. (**H**) Cuantificación del número absoluto iDC o iDC$_{Gal1}$ viables luego de 2, 4 y 6 d de incubación con Gal1. El número de células viables se determinó por exclusión del colorante azul de trypan. Los datos representan la media ± s.e.m. de al menos tres experimentos. **P* < 0,05; ***P* < 0,01.

Los resultados obtenidos demuestran que la exposición a galectina-1 durante el proceso de diferenciación interfiere en las características fenotípicas y propiedades endocíticas y estimulatorias de DCs inmaduras.

3.1.2 Galectina-1 activa mecanismos tolerogénicos en DCs humanas

Las DCs maduras son CPAs especializadas en su capacidad de estimular células T $CD4^+$ vírgenes y promover el inicio de la respuesta inmune adaptativa (Guermonprez y col., 2002; Reis e Sousa, 2006; Steinman y col., 2003). A los fines de evaluar el impacto de galectina-1 en la maduración de DCs, estudiamos la unión de esta proteína a iDCs. De acuerdo al glicofenotipo de estas células enriquecido en poli-N-acetillactosamina (Bax y col., 2007), galectina-1 se une a las iDCs en forma específica y dependiente del DRC (**Fig. 6A**). Al analizar los posibles glico-receptores y señales involucrados en la unión de galectina-1 a DCs, observamos que esta proteína es capaz de inducir segregación en microdominios de CD43 pero no de CD45 a nivel de la superficie celular (**Fig. 6B**). Este efecto es crucial para gatillar señales intracelulares luego de la unión de galectinas a sus receptores tal como se describió para células T (Pace y col., 1999; Toscano y col., 2007; Walzel y col., 1999).

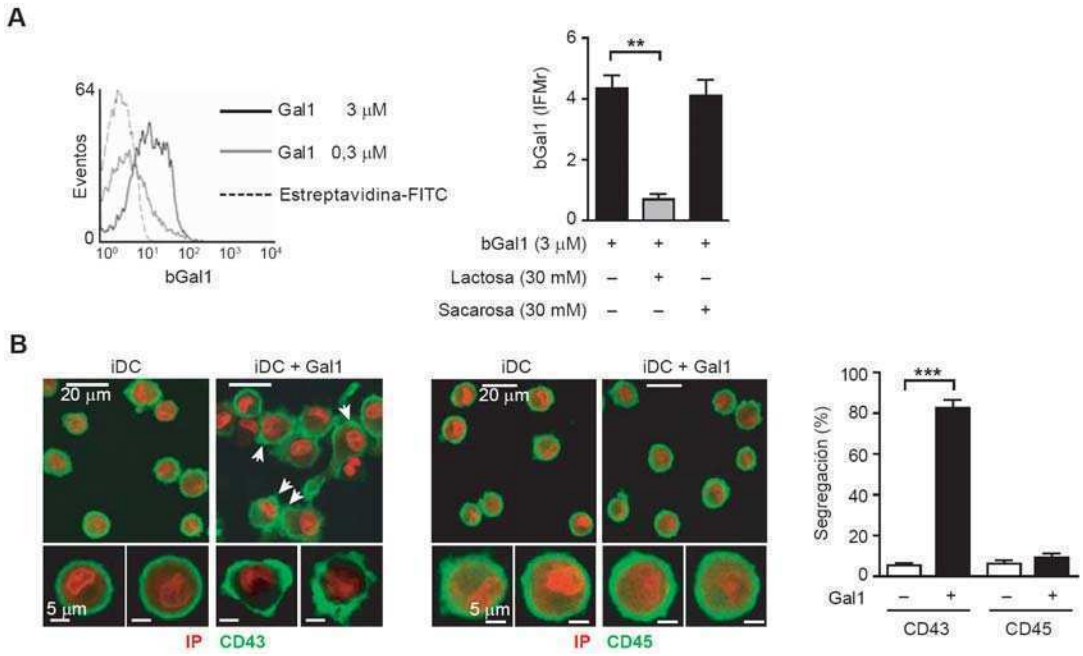


***FIGURA 6*: Galectina-1 se une a DCs inmaduras humanas e induce la segregación de CD43**. Estudio de la unión de galectina-1 (Gal1) a iDCs. (**A**) Izquierda: la unión de Gal1 biotinilada (bGal1; 0,3 y 3 μM) a iDCs se detectó utilizando estreptavidina-FITC y citometría de flujo. Derecha: la especificidad de la unión de bGal1 (3 μM) se determinó utilizando un inhibidor específico del DRC (lactosa) y un disacárido no específico (sacarosa). Como control negativo se utilizó estreptavidina-FITC solamente. Los resultados se expresan como intensidad de fluorescencia media relativa (IFMr) = [(IFM bGal1 – IFM control negativo)/IFM control negativo]. (**B**) Galectina-1 induce la redistribución del receptor CD43 en la membrana plasmática. iDCs se incubaron con Gal1 (3 μM) por 2 h. Las células se fijaron y se incubaron con ioduro de propidio (IP; identifica núcleos) y un anticuerpo monoclonal anti-CD43 o anti-CD45 conjugado a FITC. El grado de segregación se analizó por microscopía confocal. Los resultados se expresan como el ⁄ de células que presentan segregación contadas de aproximadamente 50 células en 6 campos al azar. Los datos representan la media ± s.e.m. de al menos tres experimentos. ***P* < 0,01; ****P* < 0,001.

Sorpresivamente, la maduración de iDCs con lipopolisacáridos (LPS) de *E. coli* (1 μg/ml) en presencia o ausencia de galectina-1 no reveló diferencias en cuanto al fenotipo de superficie de estas células, las cuales exhibieron altos niveles de expresión de marcadores de maduración tales CD83, HLA-DR y la molécula coestimulatoria CD86 (**Fig. 7A**). Sin embargo, DCs maduradas en presencia de LPS y galectina-1 produjeron niveles significativamente incrementados de IL-10 (citoquina asociada a funciones tolerogénicas) y niveles considerablemente inferiores de IL-12p70 (principal citoquina

implicada en el inicio de una respuesta Th1; O'Garra & Arai, 2000) comparadas a DCs expuestas sólamente a la acción de LPS (**Fig. 7B,C**).

De acuerdo con estos resultados células T $CD4^+$ estimuladas con DC_{Gal1} mostraron menor capacidad proliferativa en cultivos mixtos leucocitarios (**Fig. 7D**) y sintetizaron niveles significativamente inferiores de IFN-γ y superiores de IL-10 en comparación con células T $CD4^+$ alogénicas estimuladas con DCs controles (**Fig. 7E**). Es importante destacar que no se observaron variaciones considerables en la frecuencia de células apoptóticas y/o viables durante la diferenciación o maduración de DCs en presencia o ausencia de galectina-1 (datos no mostrados).

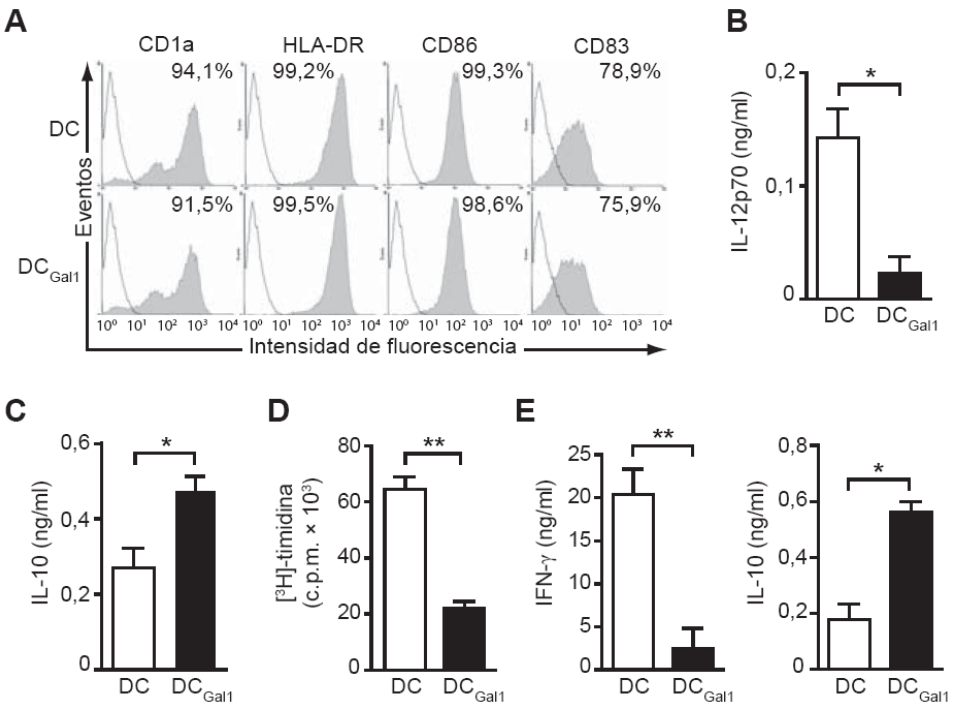


***FIGURA 7*: Galectina-1 genera DCs maduras con fenotipo regulatorio**. Análisis de DCs maduras: DCs inmaduras se estimularon con LPS (1 μg/ml) por 24 h en ausencia (DCs) o presencia (DC_{Gal1}) de galectina-1. (**A**) Citometría de flujo de marcadores fenotípicos de DCs o DC_{Gal1} maduras (izquierda; línea delgada:control de isotipo; sombreado gris: marcadores de diferenciación). Resultados representativos de seis experimentos independientes. (**B,C**) Niveles de IL-12p70 e IL-10 en sobrenadantes determinados por ELISA. (**D**) Incorporación de [^{3}H]-Timidina por células T $CD4^+$ alogénicas cultivadas por 4 d con DC o DC_{Gal1} (proporción DC:T, 1:5). (**E**) Niveles de IFN-γ (izquierda) e IL-10 (derecha) en sobrenadantes de cultivo determinados por ELISA. Los datos representan la media ± s.e.m. de al menos tres experimentos. **P* < 0,05; ***P* < 0,01.

Por lo tanto, es posible concluir que, independientemente del fenotipo indicado por marcadores de superficie, la exposición a galectina-1 inhibe la capacidad de LPS de inducir DCs inmunogénicas productoras de IL-12, promoviendo por el contrario un perfil de DCs tolerogénicas productoras de IL-10.

3.1.3 Mecanismos involucrados en la actividad tolerogénica de DC_{Gal1}

Dado el papel crítico de la vía de señalización JAK2/STAT3 en la maduración y funcionalidad de DCs (Nefedova y col., 2005; Rabinovich y col., 2007; Rutella y col., 2006b), exploramos la capacidad de galectina-1 de modular dichas señales intracelulares durante la transición a DCs tolerogénicas. La maduración de DCs en presencia de LPS y galectina-1 condujo a un incremento marcado en la fosforilación del factor de transcripción STAT3 en comparación a DCs expuestas sólo a LPS (**Fig. 8A**). De acuerdo con estos hallazgos, la adición de AG490, un inhibidor farmacológico específico de la vía JAK2/STAT3, durante el proceso de maduración logró reducir la capacidad regulatoria de DC_{Gal1} en forma dosis-dependiente (**Fig. 8B**). Por el contrario, no se observaron diferencias en la vía del factor de transcripción NF-κB, ya que la degradación de IκBα, o la unión de NF-κB a secuencias consenso resultaron similares en DC_{Gal1} y DC controles (**Fig. 8C,D**). A su vez, determinamos que células T $CD4^+$ estimuladas con DC_{Gal1} no mostraron variaciones en la frecuencia de células $CD25^+FoxP3^+$ respecto a células T $CD4^+$ activadas por DC controles (**Fig. 8E**). A la luz de este resultado, nos propusimos investigar el papel regulatorio de células T CD4 estimuladas con DC_{Gal1}. Linfocitos T $CD4^+$ provenientes de cultivos alogénicos

estimulados con DC_{Gal1} fueron capaces de inhibir en forma dosis-dependiente la proliferación de un nuevo cultivo alogénico estimulado con DCs controles. Estos resultados sugieren que las DC_{Gal1} inducen la diferenciación de células T $CD4^+FoxP3^-$ con capacidad regulatoria (**Fig. 8F**).

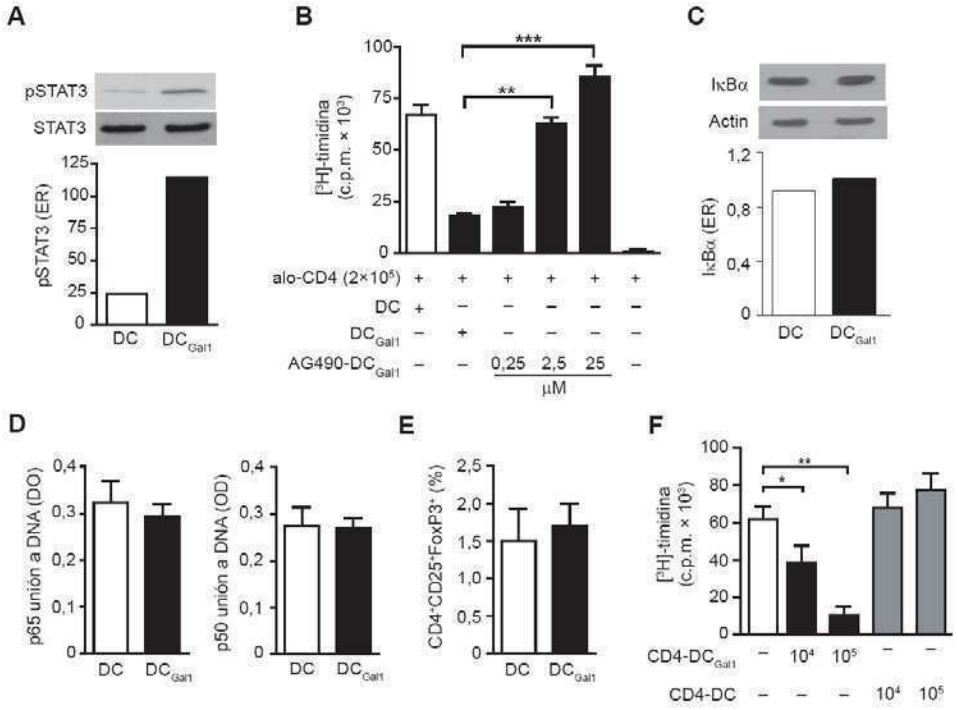


FIGURA 8: **DC_{Gal1} genera células Tr1 a través de un mecanismo dependiente de STAT3.** Análisis de los mecanismos regulados por galectina-1 en DCs humanas: DCs inmaduras se estimularon con LPS (1 μg/ml) por 24 h en ausencia (DCs) o presencia (DC_{Gal1}) de galectina-1 (Gal1). (**A**) Análisis por Western Blot de los niveles de expresión de pSTAT3 en DC ó DC_{Gal1}; Expresión relativa (ER): intensidad de bandas en relación a STAT3 no fosforilado. Los datos representan tres experimentos independientes. (**B**) Análisis de la capacidad aloestimulatoria de DCs humanas sometidas a maduración en presencia de Gal1 en ausencia (DC_{Gal1}) o presencia (AG490-DC_{Gal1}) de dosis variables de AG490, un inhibidor de la vía JAK2/ STAT3. Incorporación de $[^3H]$-timidina por células T $CD4^+$ cocultivadas durante 5 días con DC, DC_{Gal1} ó AG490-DC_{Gal1}. (**C**) Niveles de expresión relativa (ER) de IκBα de DCs expuestas a LPS y Gal1 por 30 min. Los datos representan dos análisis independientes. (**D**) Análisis de la unión de NF-κB p65 (izquierda) y p50 (derecha) a secuencias específicas en DCs expuestas a LPS y Gal1 usando el "NF-κB p50/p65 EZ-TFA Transcription Factor Assay". Datos representativos de una curva tiempo-respuesta de DC expuestas a Gal1 por períodos menores (15 min) o mayores (1 h) (datos no mostrados). (**E**) Porcentaje de células $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ provenientes de cultivos alogénicos estimulados con DC o DC_{Gal1} derivado del análisis de histogramas obtenidos por citometría de flujo. (**F**) Incorporación de $[^3H]$-timidina por células T $CD4^+$ de cultivos alogénicos expuestas a números variables de células $CD4^+$ previamente estimuladas con DC (CD4-DC) o DC_{Gal1} (CD4-DC_{Gal1}) alogénicas por 5 d. Los datos representan la media ± s.e.m. de al menos tres experimentos. **P* < 0,05; ***P* < 0,01; ****P* < 0,001.

El conjunto de estas evidencias experimentales indican que, en presencia de estímulos inflamatorios, galectina-1 es capaz de promover la diferenciación DCs humanas con propiedades tolerogénicas a través de la modulación de la vía JAK2/STAT3, promoviendo la expansión de células Tr1 FoxP3$^-$ productoras de IL-10.

3.1.4 Galectina-1 imparte un programa regulatorio en DCs humanas maduras

Con el objetivo de determinar si DCs sometidas a maduración en un microambiente enriquecido en galectina-1 presentan incrementada su capacidad regulatoria, estudiamos la habilidad de estas células de inhibir la respuesta aloestimulatoria inducida por DCs controles. Observamos que DC_{Gal1} lograron suprimir en forma dosis-dependiente la respuesta proliferativa de células T CD4$^+$ estimuladas por DCs competentes (**Fig. 9A**). Este efecto inhibitorio se reflejó en una dramática reducción de los niveles de IFN-γ (**Fig. 9B**) y un incremento dosis-dependiente en la producción de IL-10 por parte de células T CD4$^+$ en comparación a aquellos cultivos realizados en ausencia de DC_{Gal1} (**Fig. 9C**).

Los resultados expuestos permiten concluir que galectina-1 favorece la amplificación de un programa regulatorio en DCs humanas, las cuales pueden suprimir en forma efectiva la capacidad aloestimulatoria de DCs competentes sobre células T vírgenes.

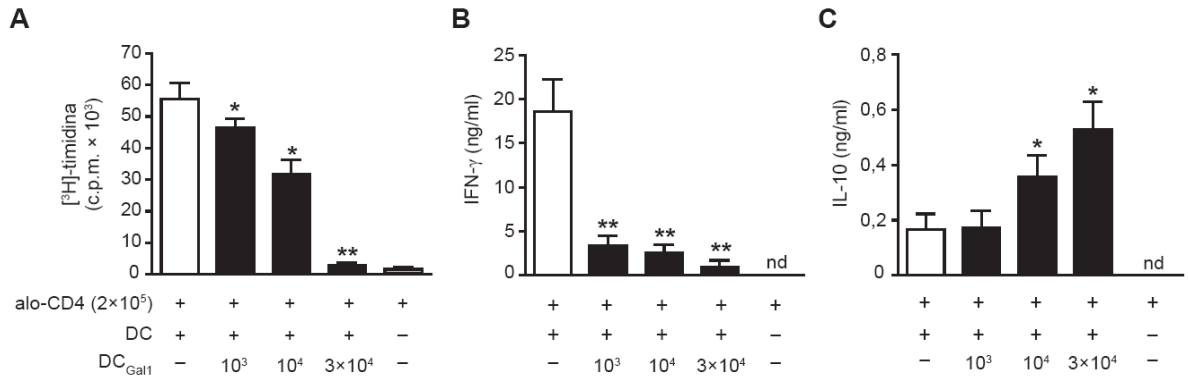


***FIGURA 9*: Galectina-1 genera DCs maduras tolerogénicas con capacidad regulatoria**. Análisis de células $CD4^+$ alogénicas co-cultivadas durante 5 d con DCs maduradas con LPS (DCs; $1x10^4$) en ausencia o presencia de números variables de DCs sometidas a maduración en presencia de galectina-1 (DC_{Gal1}). (**A**) Incorporación de $[^3H]$-timidina por células T $CD4^+$ alogénicas. (**B,C**) Niveles de IFN-γ (**B**) e IL-10 (**C**) en sobrenadantes de cultivo determinados por ELISA. Los datos representan la media ± s.e.m. de cuatro experimentos. **P* < 0,05; ***P* < 0,01.

3.2 IMPACTO DE GALECTINA-1 EN LA FISIOLOGÍA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DE RATÓN

3.2.1 Galectina-1 genera DCs tolerogénicas productoras de IL-27

En función de los resultados obtenidos en DCs humanas especulamos que galectina-1 podría representar un excelente candidato en la generación de DCs regulatorias con potencial tolerogénico *in vivo*. A los fines de evaluar esta hipótesis, analizamos el impacto de esta lectina en la fisiología de DCs de ratón. A tal fin, células progenitoras de médula ósea de ratones de la cepa C57BL/6 fueron incubadas en presencia de GM-CSF durante 8 días. El agregado de galectina-1 durante el proceso de diferenciación logró generar una población de DCs (DC_{Gal1}) con baja expresión de CD11c (marcador de membrana característico de DCs de ratón) y alta expresión de CD45RB (marcador de superficie asociado a DCs regulatorias; Svensson y col., 2004; Wakkach y col., 2003) (**Fig. 10A**). Por el contrario, la diferenciación de progenitores de médula ósea sólo en presencia de GM-CSF resultó en la generación de DCs con alta expresión de CD11c y

ausencia del marcador CD45RB. La diferenciación de DCs tolerogénicas en presencia de galectina-1 involucró interacciones con disacáridos específicos, ya que la incorporación de lactosa al cultivo logró suprimir la aparición de este fenotipo (**Fig. 10A**).

En el contexto de mecanismos de tolerancia periférica, la IL-27 ha sido recientemente identificada como una citoquina dominante producida por DCs tolerogénicas que, junto a IL-6, induce la diferenciación de células T regulatorias productoras de IL-10 (Tr1)(Awasthi y col., 2007; Fitzgerald y col., 2007; Stumhofer y col., 2007). Se halla compuesta por un heterodímero funcionalmente activo formado por las subunidades p28 y EBI3 (Awasthi y col., 2007). En este sentido, observamos que DCs de ratón diferenciadas en presencia de galectina-1 exhiben un incremento significativo en la expresión de IL-27 con respecto a aquéllas diferenciadas en ausencia de esta proteína (**Fig. 10B**). A los fines de examinar las propiedades funcionales de DC_{Gal1} de ratón, se co-cultivaron DC_{Gal1} o DCs control con células T $CD4^+$ alo-reactivas provenientes de ratones BALB/c. La estimulación con DCs controles resultó en una proliferación marcada y síntesis de niveles marcados de IFN-γ e IL-17 por parte de células T alo-reactivas (**Fig. 10C,D**), mientras que DC_{Gal1} ($CD11c^{lo}CD45RB^+$) no lograron estimular significativamente la proliferación de células T $CD4^+$ (**Fig. 10C**), lo cual se reflejó en los bajos niveles de IFN-γ e IL-17 en sobrenadantes de dichos cultivos (**Fig. 10D**). Asimismo, células T $CD4^+$ co-cultivadas con DC_{Gal1} produjeron niveles superiores de IL-10 comparadas con células T $CD4^+$ estimuladas con DCs controles (**Fig. 10D**). Conjuntamente, se observaron niveles incrementados de IL-27 (**Fig. 10E**), IL-6 (**Fig. 10F**) e IL-10 (**Fig. 10G**) y niveles reducidos de IL-12 (**Fig. 10H**) en DC_{Gal1} en comparación con DCs controles luego de la maduración de estas células con LPS. Por el contrario, no se

encontraron diferencias entre estos tipos celulares en cuanto a la producción de TGF-β ó IL-4 (datos no mostrados). Cabe acotar que galectina-1 se une a DCs inmaduras de ratón en forma dependiente del DRC (**Fig. 10I**), tal como se observó en DCs inmaduras humanas.

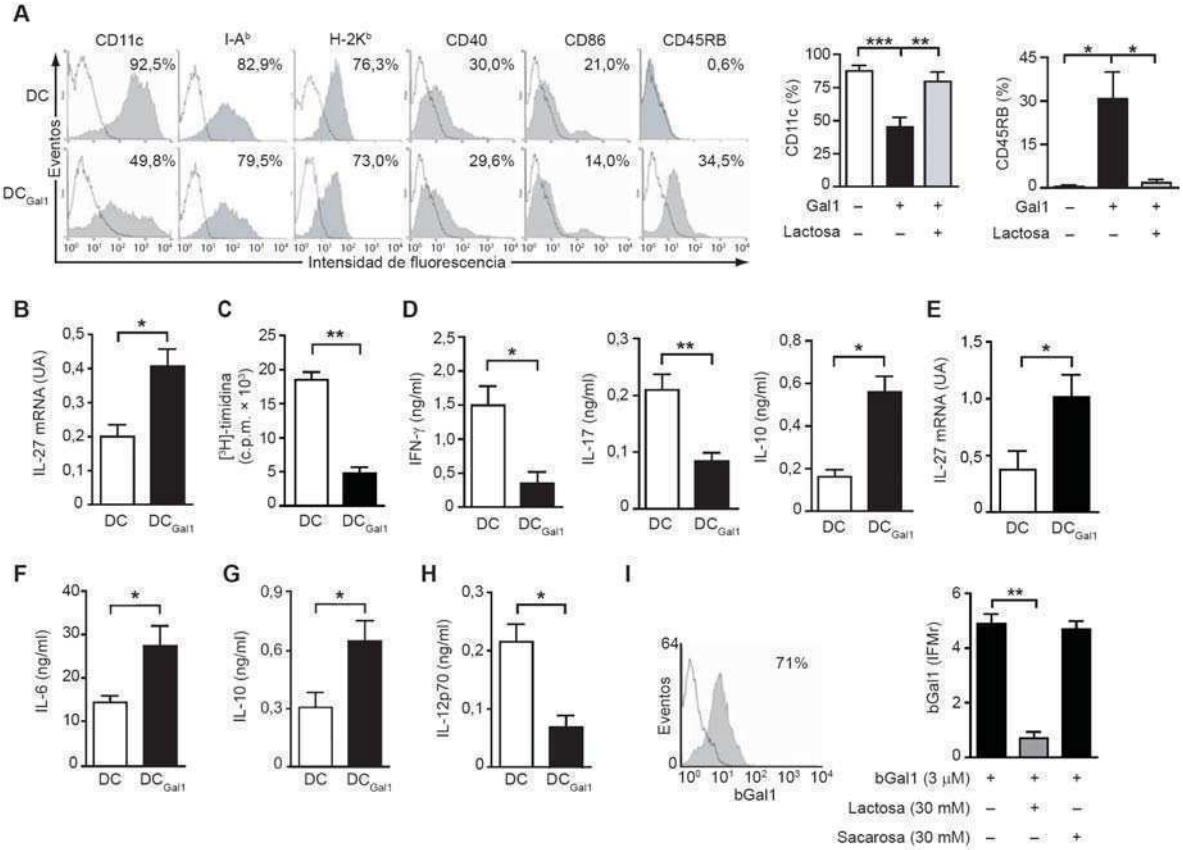


FIGURA 10: **Galectina-1 promueve la diferenciación de DCs tolerogénicas CD45RB^{+} IL-27^{hi}**. Análisis de DCs diferenciadas a partir de precursores de médula ósea de ratón en ausencia (DC) o presencia (DC_{Gal1}) de galectina-1 (3 μM). (**A**) Izquierda: citometría de flujo de marcadores fenotípicos de DC o DC_{Gal1} (izquierda; línea delgada: control de isotipo; sombreado gris: marcadores de diferenciación). Los resultados son representativos de seis experimentos independientes. Derecha: expresión de CD11c y CD45RB en presencia de galectina-1 (3 μM) y lactosa (30mM). (**B**) Análisis cuantitativo de PCR en tiempo real de la expresión del gen de IL-27p28 en DC y DC_{Gal1}; expresión relativa al gen codificante para la enzima GAPDH (unidades arbitrarias, UA). (**C**) Incorporación de [^{3}H]-timidina por células T CD4^{+} de ratones BALB/c estimulados durante 5 d con DC o DC_{Gal1} (proporción DC:T, 1:10). (**D**) Niveles de IFN-γ (izquierda), IL-17 (medio) e IL-10 (derecha) en sobrenadantes de cultivo de células T CD4^{+} estimuladas durante 5 d con DC o DC_{Gal1}. (**E**) Niveles de IL-27p28 determinado por análisis cuantitativo de PCR en tiempo real en DCs diferenciadas en ausencia (DC) o presencia (DC_{Gal1}) de galectina-1 y posteriormente estimuladas con LPS; expresión relativa al gen codificante para la enzima GAPDH (unidades arbitrarias, UA). (**F-H**) Niveles de IL-6 (**F**), IL-10 (**G**) e IL-12p70 (**H**) determinado por ELISA en sobrenadantes de cultivo de DC diferenciadas en ausencia (DC) o presencia (DC_{Gal1}) de galectina-1 y posteriormente estimuladas con LPS. (**I**) Izquierda: la unión de galectina-1 biotinilada (bGal1; 3 μM) a iDCs se detectó utilizando estreptavidina-FITC y citometría de flujo. Derecha: la especificidad de la unión de bGal1 (3 μM) se determinó utilizando un inhibidor específico del DRC (lactosa) y un disacárido no específico (sacarosa). Como control negativo se utilizó estreptavidina-FITC sólamente. Los resultados se expresan como intensidad de fluorescencia media relativa (IFMr) = [(IFM bGal1 – IFM control negativo)/IFM control negativo]. Los datos representan la media ± s.e.m. de al menos tres experimentos independientes. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

Los resultados expuestos nos motivaron a estudiar los posibles mecanismos involucrados en este fenómeno regulatorio. A tal fin, analizamos la contribución de IL-10, TGF-β e IL-27 (tres citoquinas inmunosupresoras por excelencia) a la capacidad regulatoria de estas células. La neutralización del TGF-β ó el bloqueo del receptor de IL-10 utilizando anticuerpos monoclonales específicos, no lograron suprimir la capacidad tolerogénica de DC_{Gal1} (**Fig. 11A**). Sin embargo, el bloqueo de IL-27 utilizando un anticuerpo monoclonal específico contra la subunidad IL-27p28, eliminó completamente la capacidad regulatoria de DC_{Gal1} sobre la respuesta proliferativa de células CD4 alogénicas y la secreción de citoquinas proinflamatorias (IFN-γ e IL-17) por parte de estas células (**Fig. 11A,B**). De este modo, es posible concluir que DCs generadas en presencia de galectina-1 ($CD11c^{lo}CD45RB^{+}$) exhiben una importante función regulatoria dependiente de IL-27 e independiente de IL-10 y TGF-β. Cabe acotar que no se observó ningún efecto significativo cuando se agregaron controles de isotipos a cultivos de DC_{Gal1} y células T $CD4^{+}$ alogénicas o cuando el anticuerpo anti-IL-27 se agregó a cultivos de DCs controles y células T $CD4^{+}$ (datos no mostrados), demostrando la especificidad de este fenómeno. Posteriormente, se estudió el papel del factor de transcripción STAT3 en los efectos mediados por galectina-1. En forma similar a lo ocurrido en DCs humanas, galectina-1 fue capaz de inducir la fosforilación de STAT3 en DCs de ratón (**Fig. 11C**). En este sentido, la incorporación de AG490, inhibidor de la vía JAK2/ STAT3, durante la maduración con LPS, eliminó parcialmente las funciones regulatorias de DC_{Gal1} (**Fig. 11D**). Finalmente, no se encontraron diferencias en la frecuencia de células T regulatorias $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$ en el contexto de la población CD4 estimulada con DC_{Gal1} (**Fig. 11E**).

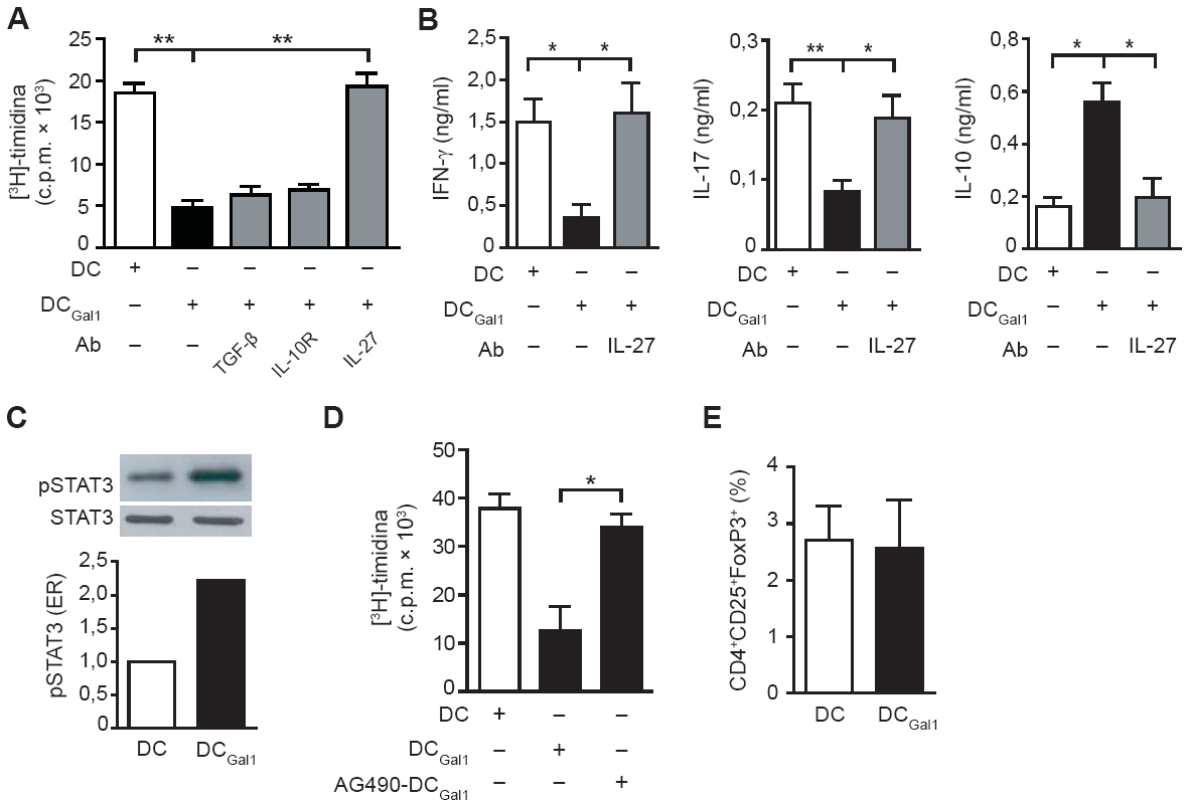


FIGURA 11: **DC_{Gal1} favorecen la diferenciación de células Tr1 a través de mecanismos dependientes de IL-27 y STAT3**. Análisis de DCs diferenciadas a partir de precursores de médula ósea de ratón en ausencia (DC) o presencia (DC_{Gal1}) de galectina-1 (3 µM). (**A**) Incorporación de [^{3}H]-timidina por células $CD4^+$ de ratones BALB/c estimulados durante 5 d con DC o DC_{Gal1} (proporción DC:T, 1:10) en ausencia o presencia de anticuerpos (Ac) neutralizantes anti-IL-27p28, -TGF-β o receptor de IL-10 (IL-10R) o controles de isotipo (dato no mostrado). (**B**) Niveles de IFN-γ (izquierda), IL-17 (medio) e IL-10 (derecha) en sobrenadantes de cultivo de células T $CD4^+$ estimulados durante 5 d con DC o DC_{Gal1} en ausencia o presencia de Ac neutralizantes anti IL-27p28. (**C**) Análisis por *Western blot* de los niveles de expresión de pSTAT3 en DC y $DC_{Gal1;}$ expresión relativa (ER) a la intensidad de banda de STAT3. Resultado representativo de tres experimentos. (**D**) Análisis de la capacidad alo-estimulatoria de DC o DC_{Gal1} maduradas en presencia de galectina-1 en ausencia (DC_{Gal1}) o presencia (AG490-DC_{Gal1}) de 2,5 µM de AG490, un inhibidor de la vía JAK2/STAT3. Incorporación de [^{3}H]-timidina por células T $CD4^+$ cocultivadas durante 5 días con DC, DC_{Gal1} ó AG490-DC_{Gal1}. (**E**) Porcentaje de células $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ provenientes de cultivos alogénicos estimulados con DC o DC_{Gal1} medido por citometría de flujo. Los datos representan la media ± s.e.m. de al menos tres experimentos. **P* < 0,05; ***P* < 0,01.

Los resultados expuestos demuestran una nueva función de galectina-1 en la diferenciación de DCs tolerogénicas con fenotipo $CD11c^{lo}CD45RB^+$, las cuales favorecerían la inducción de células Tr1 a través de mecanismos dependientes de IL-27 y STAT3.

3.2.2 DC_{Gal1} inducen tolerancia específica de antígeno *in vivo*

A la luz de estos resultados, nos propusimos investigar si los efectos que se observaban *in vitro* podían ser reproducidos *in vivo*, en un sistema antígeno-específico. A tal fin, DC_{Gal1} o DCs control se incubaron con ovoalbúmina (OVA; OVA-DC y OVA-DC_{Gal1} respectivamente) y se inyectaron en ratones singénicos. Siete días después, los ratones se inmunizaron con OVA en adyuvante de Freund completo (AFC) y una semana posterior los esplenocitos de estos ratones se re-estimularon *ex vivo* con OVA. Células de bazo provenientes de ratones inyectados con OVA-DC_{Gal1} demostraron una proliferación disminuída en respuesta a OVA (**Fig. 12A**), efecto que fue acompañado por una inhibición drástica de la producción de IFN-γ e IL-17 (**Fig. 12B,C**) y un incremento en la producción de IL-10 (**Fig. 12D**), comparado con la estimulación por OVA-DC. El efecto observado resultó específico de antígeno, ya que, la reestimulación *ex vivo* con un antígeno no relacionado como la hemocianina del molusco lapa (*keyhole limpet*; KLH), no produjo ninguna respuesta significativa en los cultivos. A su vez la inmunización con DC o DC_{Gal1} sin pulsar con OVA no generó diferencias significativas (datos no mostrados).

Estos resultados demuestran la capacidad de galectina-1 de generar DCs regulatorias con funciones tolerogénicas *in vivo*.

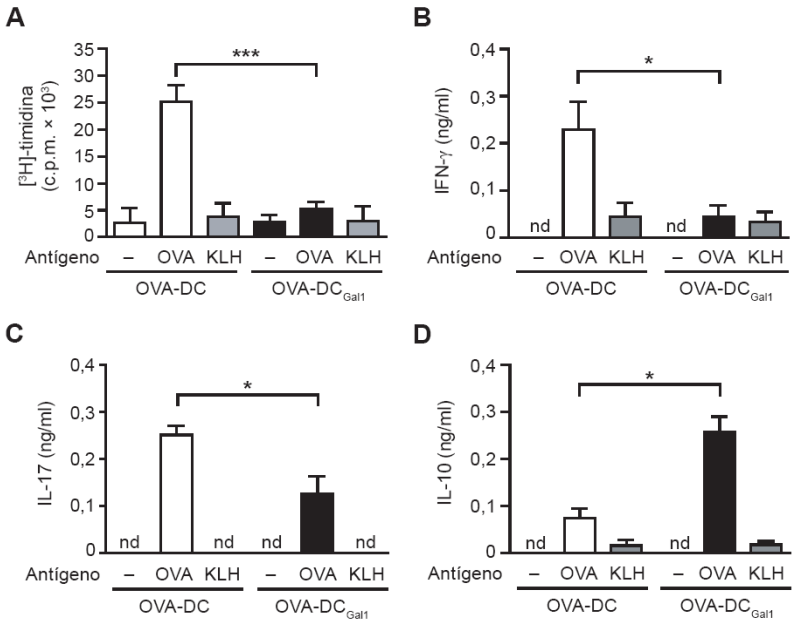


***FIGURA 12*: DC$_{Gal1}$ inducen tolerancia antígeno-específica *in vivo*.** (**A-D**) DC y DC$_{Gal1}$ se cultivaron 18 h en presencia de OVA y se inyectaron 3x10^5 células i.p. en ratones singénicos. Siete días después, los ratones se inmunizaron con OVA en CFA y una semana posterior los esplenocitos se reestimularon *ex vivo* con OVA o con el antígeno no relacionado KLH. (**A**) Incorporación de [^{3}H]-timidina. (**B-D**) ELISA de IFN-γ (**B**), IL-17 (**C**) e IL-10 (**D**) en sobrenadantes provenientes de esplenocitos re-estimulados con los antígenos. Los datos representan la media ± s.e.m. de tres experimentos. **P* < 0,05; ****P* < 0,001.

3.2.3 DC$_{Gal1}$ favorecen la inducción de tolerancia en el microambiente tumoral

Diversos estudios indican que la inmunización con DCs competentes es capaz de proteger frente al desafío con células tumorales (Banchereau & Palucka, 2005; Kotera y col., 2001; Steinman & Banchereau, 2007). En estos modelos las DCs logran inhibir el estado de inmunosupresión promovido por el tumor y permiten generar una potente respuesta inmune antitumoral. A los fines de investigar la capacidad regulatoria de DC$_{Gal1}$ en un modelo con relevancia fisiopatológica *in vivo*, se incubaron DC$_{Gal1}$ o DCs control, con lisados de células de melanoma B16 (Lis-DC y Lis-DC$_{Gal1}$, respectivamente) y se inyectaron en ratones singénicos. Posteriormente los ratones fueron desafiados con células B16 y se monitoreó el crecimiento tumoral como se describió previamente

(Rubinstein y col., 2004). Mientras que animales inmunizados con Lis-DC demostraron una inhibición del crecimiento tumoral ≥ 80⁄ , Lis-DC_{Gal1} no fueron capaces de generar una respuesta protectiva frente al desafío con el tumor salvaje (**Fig. 13A,B**). Más aún, la inmunización con Lis-DC_{Gal1} logró promover un estado de tolerancia en el microambiente tumoral. Células de ganglios linfáticos provenientes de ratones inmunizados con Lis-DC_{Gal1} y estimulados con células B16 *ex vivo* mostraron baja respuesta proliferativa (**Fig. 13C**), efecto que fue acompañado por niveles menores de IFN-γ (**Fig. 13D**) y niveles mayores de IL-10 (**Fig. 13E**) en comparación a células de ganglios linfáticos provenientes de ratones que recibieron Lis-DC control. Finalmente, no se observaron diferencias significativas cuando los animales fueron inmunizados con DC ó DC_{Gal1} no expuestas al lisado tumoral (**Fig. 13**).

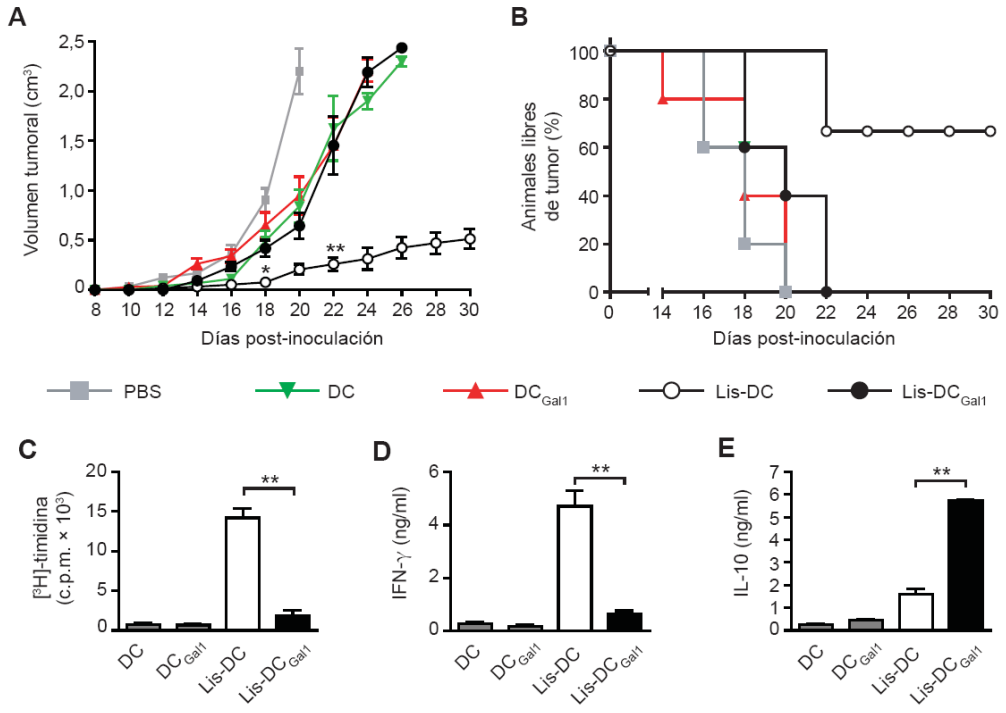


***FIGURA 13*: DC_{Gal1} favorecen la inducción de tolerancia en el microambiente antitumoral.** (**A**) Crecimiento tumoral en ratones inmunizados con DC o DC_{Gal1} incubadas con lisados de células de melanoma B16 (Lis-DC), DC_{Gal1} incubadas con lisados tumorales (Lis-DC_{Gal1}), DCs incubadas con PBS (DC), DC_{Gal1} incubadas con PBS (DC_{Gal1}) o vehículo control (PBS). Los ratones se inyectaron dos veces a intervalos de 7 días y posteriormente se desafiaron con células B16. (**B**) Análisis de Kaplan-Meier de los ratones inmunizados con Lis-DC, Lis-DC_{Gal1}, DC, DC_{Gal1} o PBS. **P* < 0,05 Lis-DC *vs.* Lis-DC_{Gal1}. (**C-E**) Respuesta proliferativa y producción de citoquinas por parte de células de ganglios linfáticos drenantes al tumor dos semanas después del desafío tumoral, reestimuladas *ex vivo* con células B16 irradiadas. (**C**) Incorporación de [^{3}H]-timidina. (**D,E**) ELISA de IFN-γ (**D**) e IL-10 (**E**) en sobrenadantes de dichos cultivos. Los datos representan la media ± s.e.m. de tres experimentos. **P* < 0,05; ***P* < 0,01.

Estos resultados demuestran que DCs diferenciadas en presencia de galectina-1 son incapaces de montar una respuesta antitumoral efectiva favoreciendo la inducción de tolerancia en el microambiente tumoral.

3.2.4 Efecto terapéutico de DC_{Gal1} sobre la enfermedad autoinmune desmielinizante

En función de los resultados obtenidos respecto a la acción inmunosupresora selectiva de galectina-1 sobre poblaciones Th1 y Th17 (Toscano y col., 2007) y la capacidad tolerogénica de DCs diferenciadas en presencia de galectina-1 (presente trabajo de tesis), decidimos explorar el potencial terapéutico de estas células en la Encefalomielitis Autoinmune Experimental (EAE), modelo que recapitula las manifestaciones clínicas e inmunológicas de la Esclerosis Múltiple (EM). Si bien este modelo experimental no refleja en su totalidad las etapas de la enfermedad desmielinizante humana, es uno de los modelos más ampliamente estudiados en el campo de la inmunología, lo que permitió adaptarlo y refinarlo, de modo tal que en la actualidad, la EAE logra recapitular muchos aspectos fisiopatológicos de la EM (Stromnes & Goverman, 2006). Tanto la EM como la EAE se caracterizan por un infiltrado inflamatorio compuesto de células T y macrófagos, con participación de DCs responsables de su activación y en presencia de placas focales de desmielinización las cuales ocasionan distintos grados de déficit neurológico (Sospedra & Martin, 2005; Steinman, 1996). A su vez, es importante destacar que, tanto en la EM como en la EAE, las células Th1 y Th17 son críticas en el establecimiento, severidad y persistencia de la enfermedad (Sospedra & Martin, 2005; Steinman, 2007).

Paralelamente, estudios recientes han propuesto el uso potencial de DCs regulatorias como herramientas terapéuticas para suprimir la progresión de enfermedades autoinmunes (Chorny y col., 2005; Morelli & Thomson, 2007; Rutella y col., 2006b). En este contexto, decidimos evaluar el efecto terapéutico de la transferencia adoptiva de DCs tolerogéncias diferenciadas en presencia de galectina-1 (DC_{Gal1}) sobre las manifestaciones clínicas e inmunológicas de la EAE. A tal fin, se inmunizaron ratones hembra C57BL/6 con el péptido encefalitogénico 35-55 de la de la glicoproteína oligodendrocitaria de mielina (MOG_{35-55}) y, en el día del inicio de los síntomas clínicos (grado clínico = 1), los ratones fueron inyectaron con DCs controles o DC_{Gal1} co-cultivadas con el péptido MOG_{35-55} (MOG-DC ó MOG-DC_{Gal1}; $2x10^5$ DCs/ratón). El tratamiento con MOG-DC_{Gal1} logró reducir drásticamente las manifestaciones clínicas de la EAE respecto a animales tratados con MOG-DC controles (**Fig. 14A** y **Tabla I**). Se observó, además, una reducción en los niveles de desmielinización y una disminución del infiltrado inflamatorio en secciones de médula espinal de ratones inyectados con MOG-DC_{Gal1} respecto a aquéllos tratados con MOG-DC controles (**Fig. 14B**). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas cuando ratones con EAE fueron inyectados con DCs o DC_{Gal1} no estimuladas con el péptido MOG (**Fig. 14A**), sugiriendo la relevancia de la especificidad antigénica en este efecto biológico.

A los fines de examinar los mecanismos responsables del efecto tolerogénico de DC_{Gal1} *in vivo*, se evaluó la proliferación y producción de citoquinas en respuesta a MOG por parte de células de ganglios linfáticos drenantes provenientes de los diferentes grupos experimentales. Células mononucleares de ganglios linfáticos provenientes de ratones inyectados con MOG-DC_{Gal1} mostraron niveles

significativamente menores de proliferación antígeno-específica comparadas con células provenientes de ratones inyectados con MOG-DC controles frente a la re-estimulación *ex vivo* con MOG_{35-55} (**Fig. 14C**). Además, ratones tratados con MOG-DC_{Gal1} exhibieron niveles significativamente inferiores de IL-17 e IFN-γ y niveles mayores de IL-10 en comparación con animales tratados con MOG-DC controles **Fig. 14D-F**). Los efectos tolerogénicos de DC_{Gal1} fueron antígeno-específicos, ya que la administración de DC_{Gal1} sin pulsar no logró alterar el curso clínico de la enfermedad (**Fig. 14C**).

Los resultados obtenidos revelan que la administración terapéutica de DCs diferenciadas en presencia de galectina-1 (DC_{Gal1}) induce una respuesta anti-inflamatoria caracterizada por producción considerable de IL-10 y disminución de perfiles Th17 y Th1 patogénicos, restableciendo la tolerancia inmunológica durante la enfermedad autoinmune desmielinizante. Estos hallazgos proveen nuevas evidencias sobre la capacidad regulatoria de DCs tolerogénicas y su potencial empleo terapéutico en enfermedades autoinmunes mediadas por células Th1 y Th17.

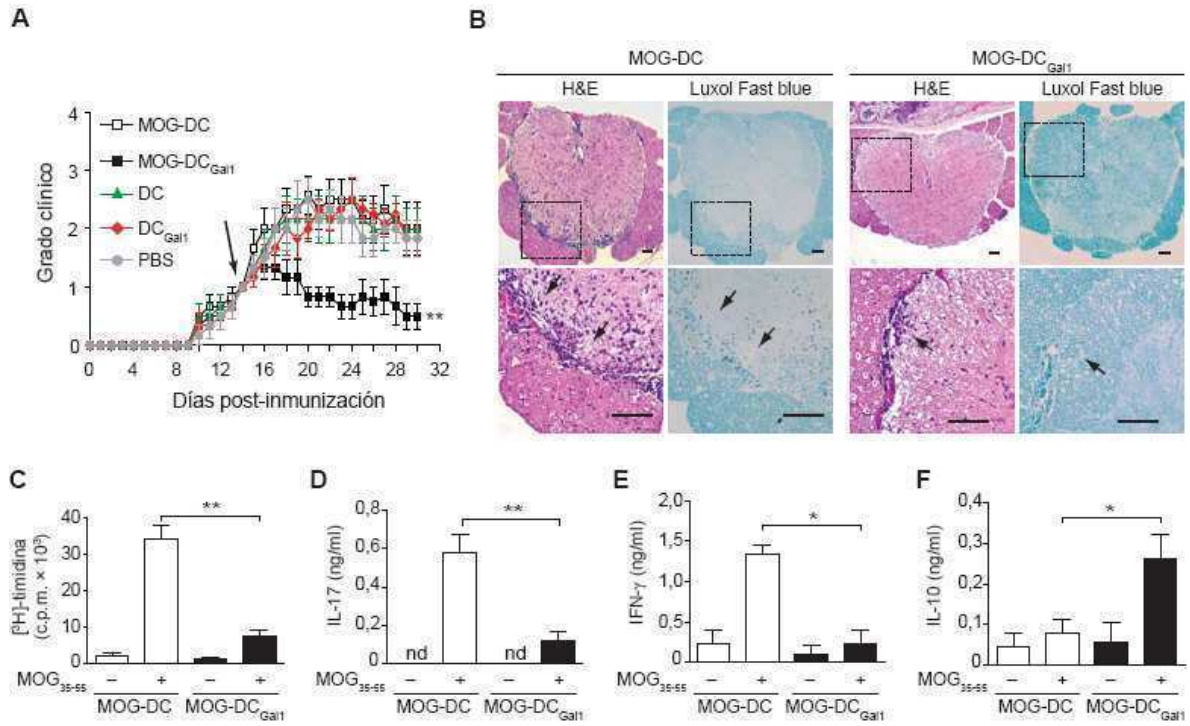


***FIGURA 14*: La administración terapéutica de MOG-DC$_{Gal1}$ suprime la EAE e inhibe la respuesta de células Th1 y Th17.** (**A-F**) El protocolo terapéutico consistió en la transferencia (i.p.) de 2x10^5 DC, DC$_{Gal1}$, DC o DC$_{Gal1}$ incubadas con MOG$_{35-55}$ por 18 h (100 µg/ml; MOG-DC, MOG-DC$_{Gal1}$ respectivamente) o vehículo control (PBS). (**A**) Progresión de la enfermedad. La flecha indica el día de la administración de las DCs. (**B**) Análisis histopatológico en cortes de médula espinal de ratones tratados con MOG-DC o MOG-DC$_{Gal1}$. El infiltrado mononuclear se evaluó a través de tinción con hematoxilina/eosina (H&E). El grado de desmielinización se evaluó a través de la tinción con Luxol Fast blue. Barra: 25 µm. (**C**) Proliferación de células de ganglios linfáticos drenantes provenientes de los ratones inyectados con MOG-DC ó MOG-DC$_{Gal1}$ en respuesta a la reestimulación *ex vivo* con MOG$_{35-55}$, analizado por la incorporación de [^{3}H]-timidina. (**D-F**) Niveles de IL-17 (**D**), IFN-γ (**E**) e IL-10 (**F**) en sobrenadantes en sobrenadantes de dichos cultivos. Los datos representan la media ± s.e.m. de tres experimentos con 4-5 ratones por grupo. **P* < 0,05; ***P* < 0,01.

TABLA I. Efecto terapéutico de MOG-DC$_{Gal-1}$ en la EAE.

Grupo	Grado Clínico Máximo (media ± s.e.m.)
DC	2,5 ± 0,2*
DC$_{Gal1}$	2,3 ± 0.2**
MOG-DC	2,6 ± 0.3**
MOG-DC$_{Gal1}$	1.3 ± 0.2

**P* < 0,05; ***P* < 0,01, *vs.* MOG-DC$_{Gal1}$ (Mann-Whitney *U*-test).

3.2.5 DC_{Gal1} suprimen la respuesta inflamatoria a través de mecanismos dependientes de IL-27

A los fines de completar el estudio de los resultados anteriores, decidimos evaluar la contribución de la IL-27 a la capacidad tolerogénica de las DC_{Gal1} *in vivo*. En función de esta premisa, aplicamos el protocolo terapéutico utilizado en la EAE, en ratones deficientes en el gen que codifica para la cadena del receptor α de IL-27 (IL-27Rα; *Il27ra*$^{-/-}$), también llamado TCCR o WSX1, que al asociarse al receptor común a otras citoquinas gp130, forman el receptor de IL-27 (Awasthi y col., 2007; Fitzgerald y col., 2007; Stumhofer y col., 2007). A tal fin, en el día del inicio de los síntomas clínicos (grado clínico = 1), ratones *Il27ra*$^{-/-}$ ó *wild-type* (*Il27ra*$^{+/+}$) fueron inyectaron con DCs controles o DC_{Gal1} co-cultivadas con el péptido MOG_{35-55} (MOG-DC ó MOG-DC_{Gal1}). Siguiendo este protocolo y confirmando los resultados obtenidos *in vitro*, observamos que la interrupción de la vía de IL-27 logró inhibir en forma considerable el efecto tolerogénico des MOG-DC_{Gal1}, ya que estas células no lograron suprimir en forma significativa la severidad clínica de la EAE (**Fig. 15A** y **Tabla II**) ni modular las concentraciones de las citoquinas producidas en respuesta a la re-estimulación *ex vivo* con el antígeno MOG (**Fig. 15B-D**). Es importante destacar que los resultados anteriores no se debieron a la capacidad de galectina-1 de modular el tráfico de DCs, ya que tanto DCs controles como DC_{Gal1} marcadas con el colorante CFSE migraron en forma equivalente a ganglios linfáticos (**Fig. 15E**).

Los resultados obtenidos revelan que DCGal1 son capaces de ejercer un efecto anti-inflamatorio durante la EAE por mecanismos dependientes de IL-27.

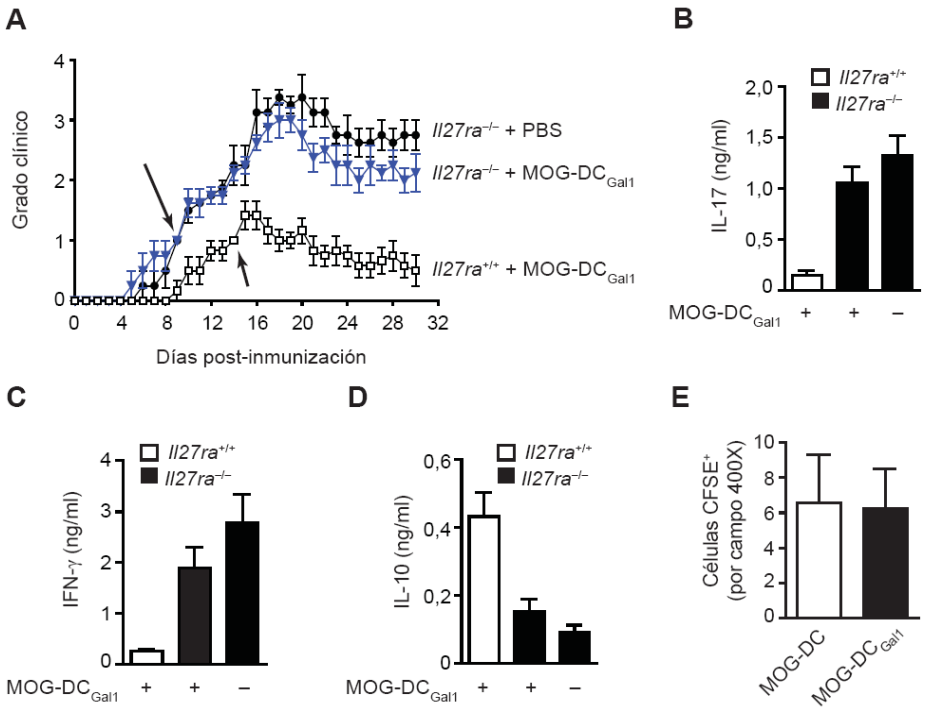


***FIGURA 15*: El bloqueo de IL-27 inhibe el efecto tolerogénico de las MOG-DC$_{Gal1}$.** (**A**) Progresión de la EAE en ratones *Il27ra*$^{-/-}$ y *wild-type* (*Il27ra*$^{+/+}$) tratados o no con DC$_{Gal1}$ incubadas con MOG$_{35-55}$ (MOG-DC$_{Gal1}$). Las flechas indican el día de la administración de las DCs o el vehículo control (PBS). *P* = N.S. *Il27ra*$^{-/-}$ + MOG-DC$_{Gal1}$ *vs. Il27ra*$^{-/-}$ + PBS. (**B-D**) ELISA de IL-17 (**B**), IFN-γ (**C**) e IL-10 (**D**) de sobrenadantes de células de ganglios linfáticos drenantes provenientes de los diferentes grupos de ratones reestimulados *ex vivo* con MOG$_{35-55}$. *P* = N.S. *Il27ra*$^{-/-}$ + MOG-DC$_{Gal1}$ *vs. Il27ra*$^{-/-}$ + PBS. Los datos representan la media ± s.e.m. de dos experimentos con 5-6 animales por grupo. (**E**) Número de MOG-DC o MOG-DC$_{Gal1}$, en ganglios linfáticos luego de ser marcadas con CFSE e inyectadas *in vivo* en ratones singénicos. Las células CFSE^{+} se identificaron 24 h post-inyección. Los datos representan la media ± s.e.m. de dos experimentos con tres animales por

TABLA II. La interrupción de la vía de IL-27 elimina el efecto tolerogénico de MOG-DC$_{Gal1}$.

Grupo	Grado Clínico Máximo (media ± s.e.m.)
Il27ra$^{-/-}$ + PBS	3,4 ± 0,4
Il27ra$^{-/-}$ + MOG-DC$_{Gal1}$	3,0 ± 0.3

P = N.S. (Mann-Whitney *U*-test).

3.2.6 Estímulos tolerogénicos o inflamatorios regulan en forma diferencial la expresión de galectina-1 en DCs

La capacidad de galectina-1 de generar DCs tolerogénicas capaces de impactar en el desarrollo de un microambiente tumoral e inflamatorio, nos impulsó a estudiar la relevancia de la galectina-1 endógena en DCs. A tal fin, investigamos la expresión de esta proteína utilizando diversos estímulos en diferentes diseños experimentales (**Fig. 16**).

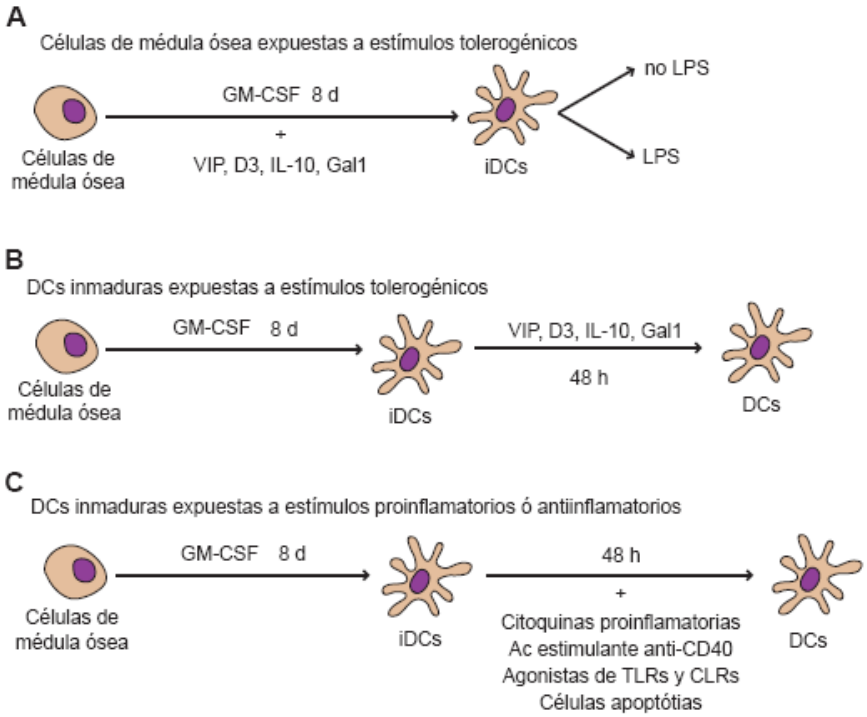


***FIGURA 16*:** **Estudio de la regulación endógena de galectina-1 en DCs - Diseño experimental.** (**A**) Células de médula ósea se diferenciaron a iDCs en ausencia o presencia de estímulos tolerogénicos como VIP, vitamina D3 (D3), IL-10 y galectina-1 (Gal1) y posterior maduración con LPS. (**B**) DCs inmaduras expuestas a LPS o estímulos tolerogénicos. (**C**) DCs inmaduras expuestas a citoquinas proinflamatorias (IFN-γ, TNF-α); anticuerpo estimulante anti-CD40; agonistas de TLRs tales como LPS (TLR4), las lipoproteínas sintéticas bacterianas Pam2CSK4 (TLR2,6) y Pam3CSK4 (TLR1,2), peptidoglicano (PGN; TLR2), poly(I:C) (TLR3; análogo sintético de RNA doble cadena), zymosan (TLR2), *P. acnes* inactivada por calor (TLR2,4), flagelina (TLR5); agonistas de CLRs como SEA (estímulo Th2) y células apoptóticas (esplenocitos irradiados).

Se observó que DCs inmaduras sintetizan niveles elevados de galectina-1, los cuales disminuyen marcadamente durante la maduración (**Fig. 17A**), característica observable también en DCs humanas (**Fig. 17A**). En DCs de ratón, la localización de esta lectina fue predominantemente citoplasmática, tal como se observó por microscopía láser confocal (**Fig. 17B**). A su vez, DCs inmaduras secretaron niveles superiores de galectina-1 respecto a DCs maduras (**Fig. 17C**). En función de esta expresión diferencial, examinamos la capacidad de diferentes estímulos de regular la expresión de galectina-1 en DCs durante el proceso de diferenciación (**Fig. 16A**). Observamos que estímulos tolerogénicos como VIP, vitamina D3, IL-10 y galectina-1 en sí misma, incorporados desde el inicio del cultivo, lograron incrementar en forma notable la expresión de galectina-1, tanto a nivel del mRNA como de la proteína, aún posterior a la maduración con LPS (**Fig. 17D,E**).

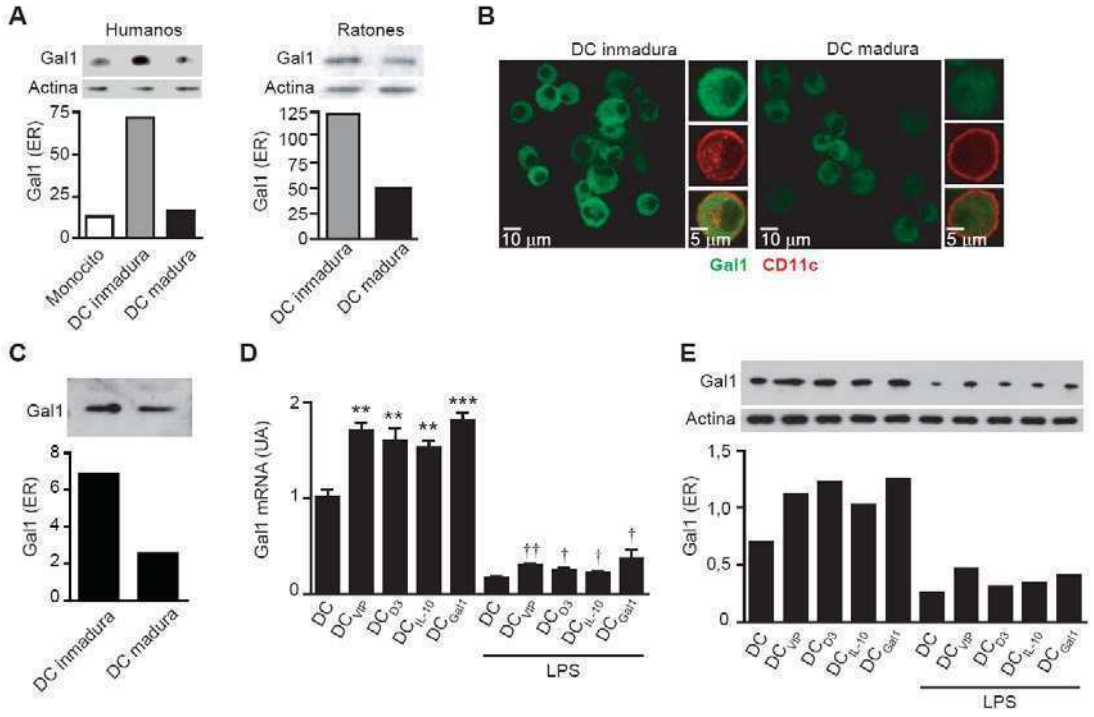


FIGURA 17: **Modulación de la expresión de galectina-1 en DCs.** (**A**) Análisis por *Western blot* de los niveles de expresión de galectina-1 (Gal1). Izquierda: Gal1 en monocitos humanos, DCs inmaduras y DCs maduradas con LPS por 24 h. Derecha: Gal1 en DCs de ratón inmaduras o DCs maduradas con LPS por 48 h; expresión relativa (ER) a la intensidad de banda de actina. Resultado representativo de tres experimentos. (**B**) Microscopía confocal láser de Gal1 (verde) y CD11c (rojo) en DCs inmaduras y maduras de ratón. (**C**) Niveles de secreción de Gal1 determinado por *Western blot* en sobrenadantes de DCs de ratón. Se confirmó la siembra equivalente de proteínas mediante la tinción de las membranas con Ponceau S. Resultado representativo de tres experimentos. (**D-E**) Células de médula ósea diferenciadas a DCs inmaduras en presencia o ausencia de estímulos tolerogénicos como VIP (DC_{VIP}), vitamina D3 (DC_{D3}), IL-10 (DC_{IL-10}) y Gal1 (DC_{Gal1}) y posterior maduración o no con LPS. (**D**) Análisis cuantitativo de PCR en tiempo real de la expresión del gen de Gal1, expresión relativa al gen codificante para GAPDH (unidades arbitrarias, UA). Los datos corresponden a tres experimentos. $^{**}P < 0,01$, $^{***}P < 0,001$ *vs* DC; †$P < 0,05$; ††$P < 0,01$, †††$P < 0,001$ *vs* DCs estimuladas con LPS. (**E**) Ensayo de *Western blot* de la expresión de Gal1; expresión relativa (ER) a la intensidad de banda de actina. Resultado representativo de tres experimentos.

Asimismo, al analizar la expresión de galectina-1 en DCs inmaduras expuestas a los mismos estímulos tolerogénicos anteriores (**Fig. 16B**), también se observó un considerable aumento en la expresión de galectina-1 (**Fig. 18A,B**). En función de estos resultados expusimos DCs inmaduras a un panel de diferentes estímulos como citoquinas proinflamatorias, anticuerpos agonistas de CD40, estímulos de TLRs ó CLRs y células apoptóticas (**Fig. 16C**). La mayoría de los estímulos proinflamatorios lograron inducir una considerable disminución en la expresión de galectina-1 (**Fig. 18C,D**). Por el contrario, estímulos Th2 como los antígenos de huevos de *Schistosoma mansoni* (SEA)(Kane y col., 2004), o el agonista de TLR5, flagelina (Didierlaurent y col., 2004; Parish, 1996), lograron inducir un incremento marcado de la expresión de galectina-1 (**Fig. 18C,D**). Notablemente, el co-cultivo de DCs inmaduras con esplenocitos apoptóticos, una interacción que favorece la generación de DCs tolerogénicas (Skoberne y col., 2006; Steinman y col., 2003), resultó en un aumento considerable de la síntesis de galectina-1 (**Fig. 18C,D**). En función de estos resultados, nos propusimos identificar las vías de señalización responsables del aumento de la expresión de galectina-1. A estos fines expusimos DCs a SEA (el estímulo que condujo al mayor incremento en la síntesis de galectina-1) en presencia o ausencia de inhibidores

específicos de diferentes vías de señalización. Observamos que, la interrupción de la vía de ERK1-2 o JNK por los inhibidores U0126 o SP600125 respectivamente, inhibió completamente la expresión de galectina-1 (**Fig. 18E**). Se observó además reducción parcial en la expresión de galectina-1 cuando se bloqueó la fosforilación de STAT3 por AG490. Por el contrario, no se identificaron variaciones considerables en la síntesis de galectina-1 luego de la exposición de DCs a BAY11-7082, Ly294002 o SB202190, inhibidores de las vías de señalización de NF-κB, PI3K-AKT o p38, respectivamente (**Fig. 18E**). La eficacia de inhibición de estos compuestos se muestra en la **Fig. 19**.

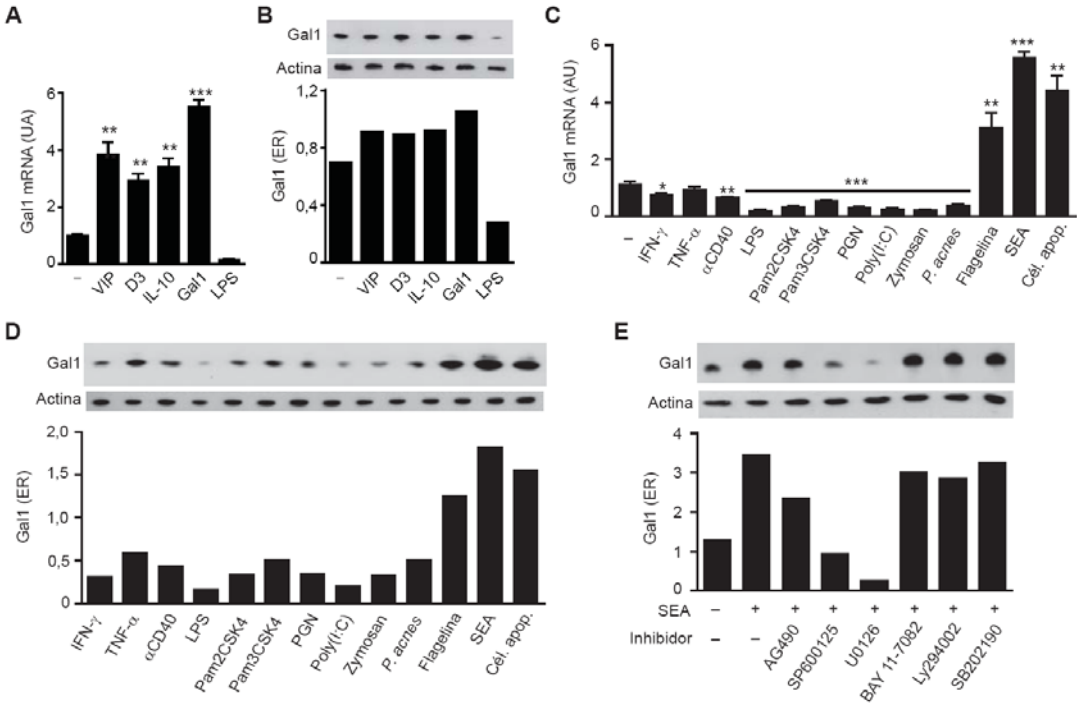


***FIGURA 18*:** **Estímulos tolerogénicos o inflamatorios regulan diferencialmente la expresión de galectina-1 en DCs.** (**A-B**) DCs inmaduras expuestas al estímulo inflamatorio LPS o a estímulos tolerogénicos como VIP, vitamina D3 (D3), IL-10 y galectina-1 (Gal1) por 24 h. (**A**) Análisis cuantitativo de PCR en tiempo real de la expresión del gen de Gal1, expresión relativa al gen codificante para GAPDH (unidades arbitrarias, UA). Los datos corresponden a tres experimentos. ***P* < 0,01, ****P* < 0,001 *vs* DCs sin estimular. (**B**) Ensayo de *Western blot* de la expresión de Gal1; expresión relativa (ER) a la intensidad de banda de actina. Resultado representativo de tres experimentos. (**C-D**) DCs inmaduras expuestas a citoquinas proinflamatorias (IFN-γ, TNF-α), anticuerpo estimulante anti-CD40 (αCD40), agonistas de TLRs tales como LPS, Pam2CSK4, Pam3CSK4, peptidoglicano (PGN), poly(I:C), zymosan, *P. acnes*, flagelina y otros estímulos como SEA (agonista de RLCs) y células apoptóticas (Cél. apop.). (**C**) Análisis cuantitativo de PCR en tiempo real de la expresión del gen de Gal1, expresión relativa al gen codificante para GAPDH (UA). Los datos corresponden a tres experimentos. **P* < 0,05, ***P* < 0,01, ****P* < 0,001 *vs* DCs sin estimular. (**D**) Análisis por *Western blot* de los niveles de expresión de Gal1; expresión relativa (ER) a la intensidad de banda de STAT3. Resultado representativo de tres experimentos. (**E**) Ensayo de *Western blot* de la expresión de Gal1 en DCs inmaduras expuestas a SEA en ausencia o presencia de los inhibidores farmacológicos de las vías de JAK2-STAT3 (AG490), JNK-SAP (SP600125), ERK1-2 (U0126), NF-κB (BAY 11-7082), PI3K-AKT (Ly294002) y p38 (SB202190); expresión relativa (ER) a la intensidad de banda de actina. Resultado representativo de tres experimentos independientes.

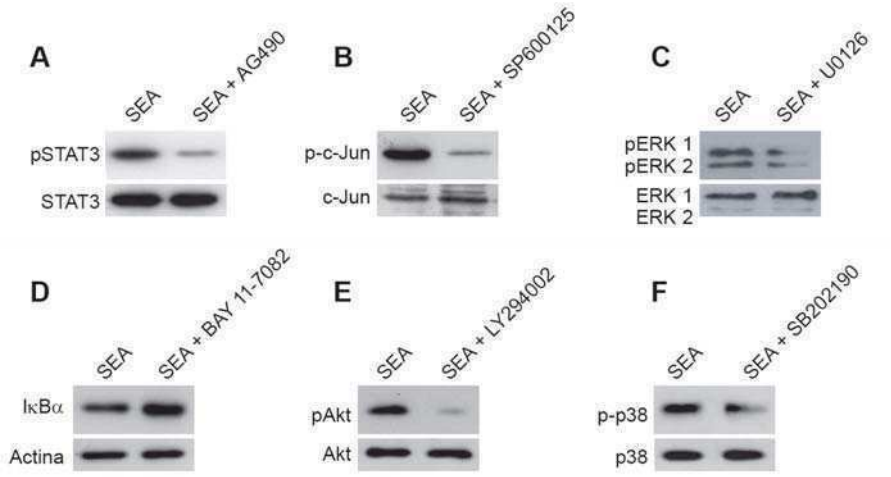


FIGURA 19: **Eficacia de los inhibidores farmacológicos de diferenctes vías de señalización**. DCs immaduras expuestas a SEA en ausencia o presencia de inhibidores farmacológicos de las vías de señalización JAK2-STAT3 (AG490), JNK-SAP (SP600125), ERK1-2 (U0126), NF-kB (BAY 11-7082), PI3K-AKT (LY294002) y p38 (SB202190). (**A-F**) Ensayo de *Western blot* de la expresión de pSTAT3 (**A**), p-c-Jun (**B**), p-ERK1-2 (**C**), IkBa (**D**), pAKT (**E**) y p-p38 (**F**) expresión relativa a STAT3, c-Jun, ERK1-2, actina, AKT y p38 respectivamente. Resultado representativo de tres experimentos independientes.

El conjunto de las evidencias expuestas indican que la expresión de galectina-1 en DCS puede ser regulada en forma diferencial por diferentes señales. Mientras que estímulos tolerogénicos incrementan la síntesis de esta proteína, estímulos inflamatorios disminuyen su expresión.

3.2.7 La expresión endógena de galectina-1 regula las funciones tolerogénicas de DCs *in vitro* e *in vivo*

En función del aumento de la expresión de galectina-1 en respuesta a estímulos tolerogénicos y su disminución al exponer DCs a estímulos inflamatorios, nos propusimos analizar el efecto de la ausencia de galectina-1 sobre la fisiología de DCs. A tal fin, diferenciamos DCs provenientes de ratones deficientes en galectina-1 (*Lgals1*$^{-/-}$

; $DC^{-/-}$) o ratones *wild-type* ($DC^{+/+}$). Si bien $DC^{-/-}$ y $DC^{+/+}$ presentaron un fenotipo similar, las $DC^{-/-}$ mostraron un incremento significativo en la expresión de la molécula del CMH de clase II I-A^b, comparado con $DC^{+/+}$ (**Fig. 20A**). Además, las $DC^{-/-}$ evidenciaron una disminución del mRNA de IL-27 (**Fig. 20B**), fenómeno que fue acompañado por incremento de IL-12 y disminución de IL-10 al estimular con LPS (**Fig. 20C,D**). De acuerdo con este fenotipo, la estimulación alogénica de células T $CD4^+$ con $DC^{-/-}$ reveló un incremento en la proliferación y producción de IFN-γ e IL-17 al igual que una disminución de IL-10 en sobrenadantes de dichos cultivos, en comparación a cultivos estimulados con $DC^{+/+}$ (**Fig. 20E,F**). Nuevamente, no hallamos diferencias en la viabilidad celular durante la diferenciación o maduración de DCs provenientes de animales *Lgals1*$^{-/-}$ o *wild-type* (datos no mostrados).

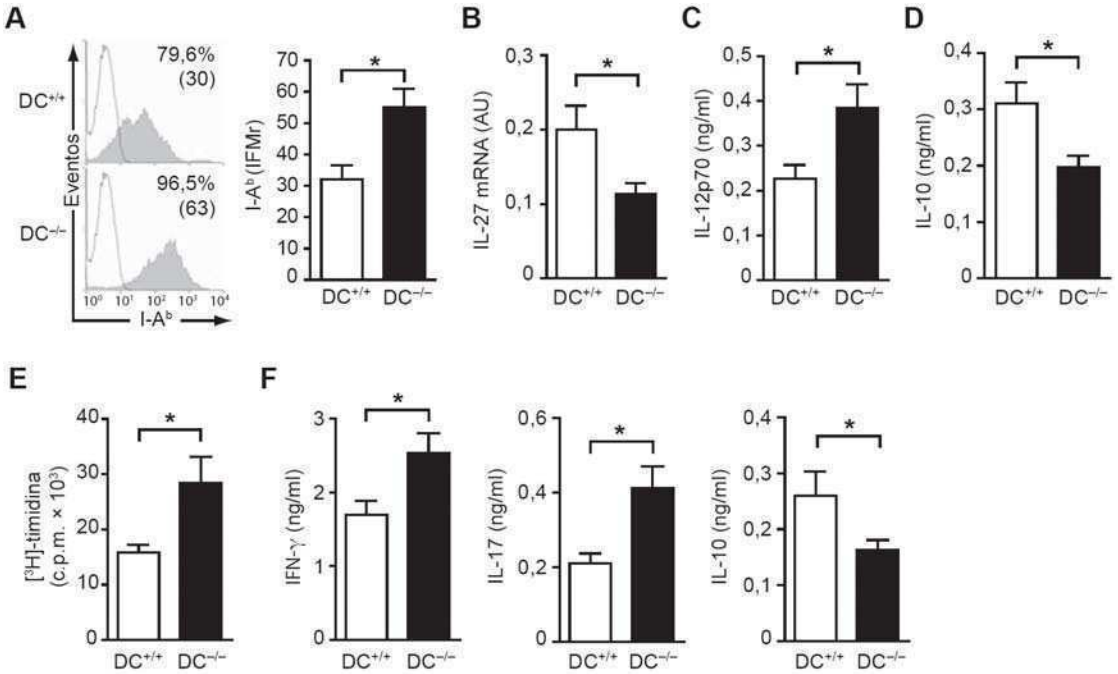


FIGURA 20: **DCs provenientes de ratones *Lgals1*$^{-/-}$ exhiben mayor capacidad estimulatoria *in vitro*.** (**A**) Expresión de I-A^b en DCs provenientes de ratones *wild-type* ($DC^{+/+}$) o de ratones *Lgals1*$^{-/-}$ ($DC^{-/-}$) analizado por citometría de flujo. Izquierda: línea delgada: control de isotipo; gris: I-A^b. Los números entre paréntesis representan la intensidad de fluorescencia media relativa (IFMr): (IFM del anticuerpo específico – IFM del control de isotipo)/IFM del control de isotipo. (**B**) Análisis cuantitativo por PCR en tiempo real de la expresión del gen de IL-27p28 en $DC^{+/+}$ y $DC^{-/-}$; expresión relativa al gen codificante para GAPDH (unidades arbitrarias, UA). (**C,D**) ELISA de la secreción de IL-12 (**C**) e IL-10 (**D**) por parte de $DC^{-/-}$ y $DC^{+/+}$ estimuladas con LPS. (**E**) Incorporación de [^{3}H]-timidina por esplenocitos alogénicos $CD4^+$ estimulados durante 5 d con $DC^{-/-}$ o $DC^{+/+}$. (**F**) ELISA de IFN-γ (izquierda), IL-17 (centro) e IL-10 (derecha) en sobrenadantes de cultivos alogénicos. Los datos representan la media ± s.e.m. de al menos tres experimentos independientes. **P* < 0,05

El conjunto de estos resultados nos impulsó a evaluar la inmunogenicidad de $DC^{-/-}$ *in vivo*. En función de esta premisa, se incubaron $DC^{+/+}$ ó $DC^{-/-}$ con OVA (OVA-$DC^{+/+}$ u OVA-$DC^{-/-}$) y se inyectaron en ratones *wild-type* o *Lgals1*$^{-/-}$. Siete días después, los ratones se desafiaron con OVA en AFC y una semana posterior los esplenocitos se re-estimularon *ex vivo* con OVA. Utilizando este esquema experimental, observamos que esplenocitos provenientes de ratones inyectados con OVA-$DC^{-/-}$ mostraron niveles significativamente mayores de proliferación antígeno-específica (**Fig. 21A**), incremento en la producción de IFN-γ (**Fig. 21B**) e IL-17 (**Fig. 21C**) y disminución de la síntesis de IL-10 (**Fig. 21D**), en comparación con células de bazo provenientes de ratones inyectados con OVA-$DC^{+/+}$.

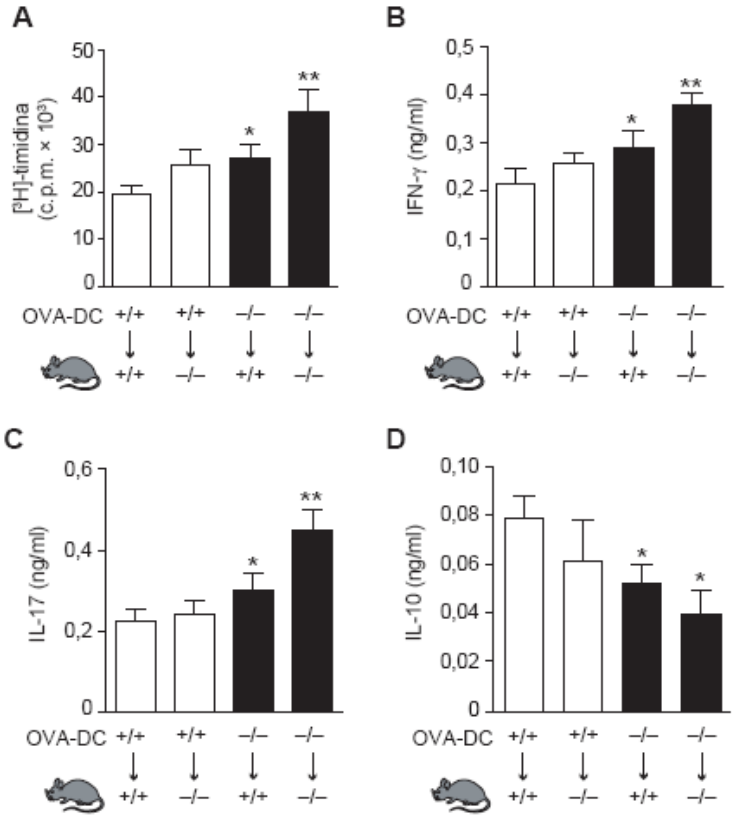


FIGURA 21: **Impacto de la deficiencia en galectina-1 sobre la capacidad inmunogénica de DCs *in vivo*.** $DC^{+/+}$ ó $DC^{-/-}$ se incubaron con OVA y se inyectaron en ratones *wild-type* (+/+) o *Lgals1*$^{-/-}$ (–/–). Siete días después, los ratones se inmunizaron con OVA en CFA y una semana posterior los esplenocitos se re-estimularon *ex vivo* con OVA. (**A**) Incorporación de [^{3}H]-timidina. (**B-D**) ELISA de IFN-γ (**B**), IL-17 (**C**) e IL-10 (**D**) de sobrenadantes provenientes de esplenocitos reestimulados con OVA. Los datos representan la media ± s.e.m. de tres experimentos independientes. **P* < 0,05; ***P* < 0,01 *vs* $DC^{+/+}$ inyectadas en ratones +/+.

En función de estas evidencias es posible concluir que galectina-1 endógena tendría un papel regulatorio crítico sobre las propiedades inmunogénicas o tolerógenicas de DCs.

3.2.8 DCs con alta expresión de galectina-1 promueven la resolución de la EAE

A los fines de aproximarnos a la comprensión del papel fisiológico de galectina-1 en DCs, decidimos explorar las características de estas células durante la evolución de la enfermedad desmielinizante. Previamente se ha descripto que los mecanismos tolerogénicos operan en forma activa durante el pico de enfermedades autoinmunes a los fines de facilitar la resolución del proceso inflamatorio (Greenwald y col., 2005; Probst y col., 2005; Rutella y col., 2006; Salama y col., 2003). En este sentido, los datos obtenidos demuestran que las DCs poseen un incremento de galectina-1 tanto a nivel del mRNA como de la proteína, en el día 21 (pico de EAE) y 28 (resolución de EAE) en comparación al inicio de la enfermedad (**Fig. 22A**). Es interesante destacar que, al igual que en DCs, se observa un incremento significativo en la expresión de galectina-1 en ganglios linfáticos y bazo durante el desarrollo de la EAE, en los días 21 y 28 post-inmunización (tesis doctoral en curso del Bioq. Germán Bianco). En este contexto, estudiamos la relevancia de galectina- 1 endógena durante la resolución de la enfermedad inflamatoria. En primer lugar, analizamos la expresión de IL-27 e IL-23, citoquinas con papeles opuestos en la diferenciación de células Th17 y en la progresión de la EAE (Awasthi y col., 2007; Fitzgerald y col., 2007; Stumhofer y col., 2007). De acuerdo a un incremento en la frecuencia de DCs tolerogénicas necesarias a los fines

de limitar la severidad clínica e iniciar la resolución de la enfermedad, DCs de ratones *wild-type* aisladas en el pico de la EAE, expresaron niveles considerables de IL-27 y bajos de IL-23 (**Fig. 22B,C**), los cuales acompañaron la alta expresión de galectina-1 en estas células (**Fig. 22A**). Notablemente, la deficiencia de galectina-1 en DCs de animales *Lgals1*$^{-/-}$ logró alterar este fenotipo regulatorio, ya que se observó una disminución en la expresión de IL-27 y un aumento en los niveles de IL-23. Por otro lado también observamos menor fosforilación del factor de transcripción STAT3 en DC$^{-/-}$ respecto a DC$^{+/+}$ (**Fig. 22D**).

Estos hallazgos sugieren que los patrones de expresión de galectina-1 podrían participar en la resolución de la respuesta inflamatoria, mediante la diferenciación de DCs tolerogénicas productoras de IL-27 con altos niveles de fosforilación de STAT3 durante el pico de la enfermedad inflamatoria autoinmune.

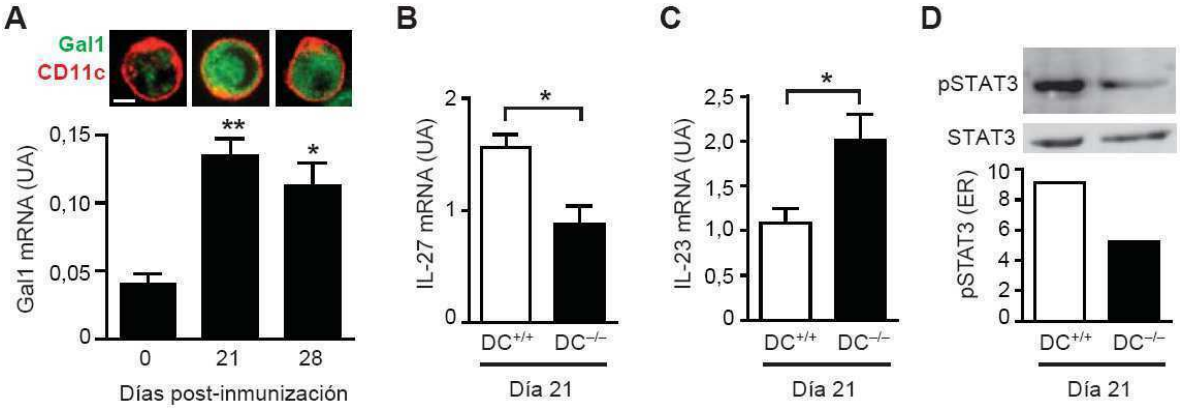


***FIGURA 22*: Expresión diferencial de diferentes marcadores en DC$^{+/+}$ y DC$^{-/-}$ durante la progresión de la EAE.** (**A**) Regulación de la expresión de galectina-1 (Gal1) en DCs purificadas de bazos a diferentes días post-inducción de la EAE. Arriba: Microscopía confocal láser de Gal1 (verde) y CD11c (rojo). Barra, 5 μm. Abajo, análisis cuantitativo por PCR en tiempo real de la expresión del gen de Gal1; expresión relativa al gen codificante para GAPDH (unidades arbitrarias, UA). *P < 0,05; **P < 0,01 *vs*. día 0. (**B-D**) Estudio del fenotipo de DC$^{+/+}$ y DC$^{-/-}$ purificadas en el día 21 de la post-inmunización con MOG_{35-55}. (**B,C**) Análisis cuantitativos por PCR en tiempo real de la expresión de los genes IL-27p28 (**B**) e IL-23p19 (**C**); expresión relativa al gen codificante para GAPDH (UA). Los datos representan la media ± s.e.m. de dos experimentos. *P < 0,05. (**E**) Análisis por *Western blot* de los niveles de expresión de pSTAT3 en células CD11c^{+}; expresión relativa (ER) a la intensidad de banda de STAT3. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

En función de estos resultados, nos propusimos investigar si galectina-1 regulada endógenamente en DCs, podría contribuir a la resolución de la inflamación autoinmune. A los fines de evaluar esta hipótesis, llevamos a cabo un modelo experimental (**Fig. 23A**) en el cual inmunizamos con MOG_{35-55} ratones *wild-type* y *Lgals1*$^{-/-}$ y purificamos DCs en el día 21 (pico) de la EAE. Estas células fueron inyectadas en ratones *Lgals1*$^{-/-}$ en el día de inicio de los síntomas clínicos de la enfermedad (**Fig. 23A**). De acuerdo al papel regulatorio endógeno de galectina-1 los ratones deficientes en esta lectina sufrieron mayor severidad clínica que los animales *wild-type* (Toscano y col., 2007). Notablemente, $DC^{+/+}$ tolerogénicas (purificadas en el día 21) lograron restablecer la tolerancia inmunológica y contribuyeron a la resolución de la inflamación autoinmune al ser transferidas a ratones *Lgals1*$^{-/-}$ (**Fig. 23B-E**). Este fenómeno se reflejó en disminución de la severidad clínica (**Fig. 22B** y **Tabla III**), producción significativamente inferior de IL-17 e IFN-γ (**Fig. 23C,D**) y niveles considerablemente superiores de IL-10 (**Fig. 23E**) en células provenientes de ganglios linfáticos drenantes de ratones deficientes en el gen de galectina-1 que recibieron $DC^{+/+}$, en comparación con células de ganglios linfáticos de animales *Lgals1*$^{-/-}$ que recibieron $DC^{-/-}$.

El conjunto de los resultados expuestos indican que galectina-1 endógena, particularmente en DCs, contribuye a la resolución de la respuesta inflamatoria durante la EAE a través de procesos que involucran la generación de DCs tolerogénicas productoras de IL-27.

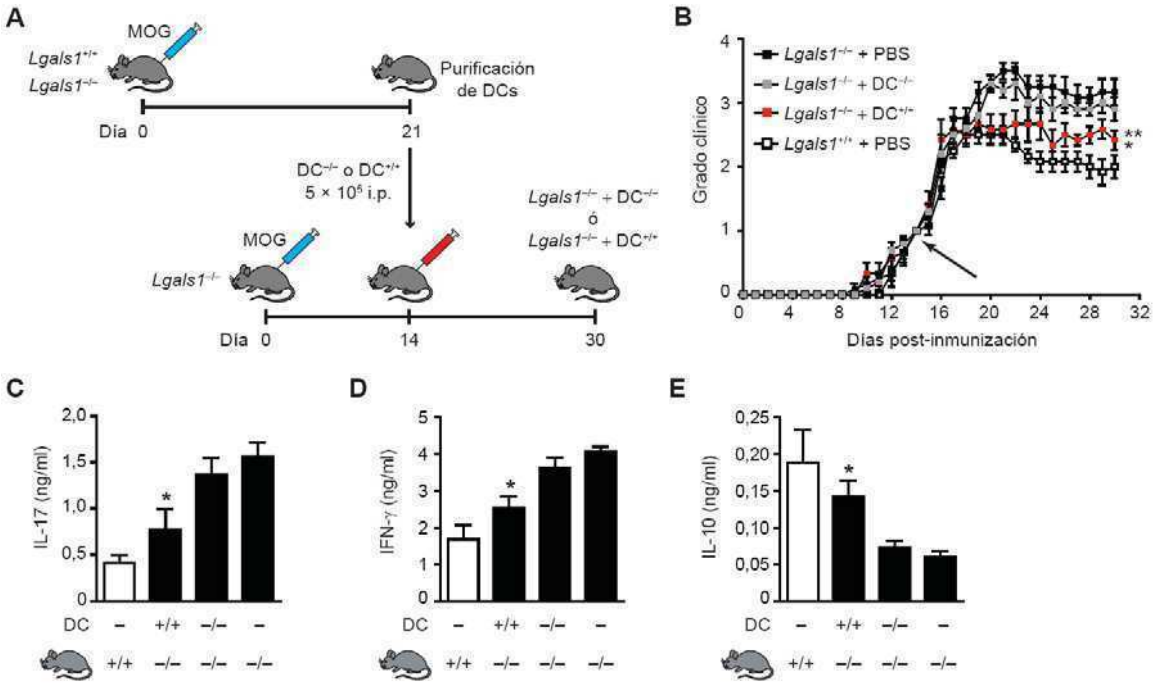


***FIGURA 23*: La expresión endógena de galectina-1 en DCs es crítica para la resolución de la respuesta inflamatoria durante la EAE.** (**A**) Diseño experimental: se purificaron DCs $CD11c^{+}$ de bazos de ratones *Lgals1*$^{-/-}$ ($DC^{-/-}$) o *wild-type* ($DC^{+/+}$) en el día 21 post-inducción de la EAE y se inyectaron en ratones *Lgals1*$^{-/-}$ en el día de inicio de los síntomas clínicos de la enfermedad desmielinizante. (**B**) Progresión de la EAE en ratones *wild-type* y *Lgals1*$^{-/-}$ inyectados con $DC^{+/+}$, $DC^{-/-}$, o vehículo control (PBS). La flecha indica el día de la administración de las DCs. **P* < 0,05 *vs*. *Lgals1*$^{-/-}$ + $DC^{-/-}$; ***P* < 0,01 *vs*. *Lgals1*$^{-/-}$ + PBS. (**C-E**) ELISA de IL-17 (**C**), IFN-γ (**D**) e IL-10 (**E**) de sobrenadantes de células de ganglios linfáticos drenantes provenientes de los diferentes grupos de ratones re-estimulados *ex vivo* con MOG_{35-55} por 72 h. **P* < 0,05 *vs*. *Lgals1*$^{-/-}$ + $DC^{-/-}$ o *Lgals1*$^{-/-}$ + PBS. Los datos representan la media ± s.e.m. de dos experimentos con 5-6 animales por grupo.

TABLA III. Efecto de $DC^{+/+}$ o $DC^{-/-}$ en la resolución de la EAE.

Grupo	Grado Clínico Máximo (media ± s.e.m.)
Lgals1$^{-/-}$ + PBS	3,5 ± 0,2
Lgals1$^{-/-}$ + $DC^{-/-}$	3,3 ± 0,2
Lgals1$^{-/-}$ + $DC^{+/+}$	1.3 ± 0.2**

**P* < 0,05 *vs*. *Lgals1*$^{-/-}$ + $DC^{-/-}$; ***P* < 0,01 *vs*. *Lgals1*$^{-/-}$ + PBS (Mann-Whitney *U*-test).

4. DISCUSIÓN

Una premisa fundamental del sistema inmune es la de no reaccionar frente a los componentes propios del individuo, aún cuando posee la facultad de responder frente a cualquier antígeno extraño. Esta capacidad de reconocimiento y aceptación de los componentes propios del organismo se debe al fenómeno de *tolerancia inmunológica*. Merced a este fenómeno, de entre los receptores específicos de antígeno producidos al azar, se genera una inactivación física o funcional de todos aquellos clones que reconozcan antígenos propios. Sin embargo, en ciertas ocasiones, los mecanismos de tolerancia pueden ser utilizados por tumores o patógenos a los fines de eludir el reconocimiento inmunológico. Por otro lado, la autoinmunidad es un proceso por el cual los mecanismos de tolerancia fallan, desencadenándose procesos autoagresivos. En función de estos antecedentes, en los últimos años se ha puesto especial interés en tratar de dilucidar los mecanismos que regulan la tolerancia o la inducción de la respuesta inmune, a los fines de poder manipular el sistema inmune según lo requiera cada situación. En este sentido, una nueva área de estudio ha surgido en los últimos años- la glicoinmunología- que intenta dilucidar el papel de carbohidratos y lectinas en la regulación de la respuesta inmune en condiciones fisiológicas y patológicas.

Esfuerzos recientes destinados a descifrar los estados de glicosilación de las células y componentes del sistema inmune han revelado importantes cambios en *N*- y *O*- glicanos durante la activación, diferenciación y homeostasis de las células T (Comelli y col., 2006; Marth & Grewal, 2008; Morgan y col., 2004; Toscano y col., 2007; van Vliet y col., 2006). Estas modificaciones también han sido detectadas en procesos de

diferenciación y maduración de DCs humanas (Bax y col., 2007). Asimismo se ha observado que anticuerpos de tipo IgG que se encuentran sialilados en su porción Fc, poseen propiedades antiinflamatorias; mientras que aquéllos no sialilados exhiben actividad proinflamatoria (Kaneko y col., 2006). Estas observaciones sugieren que las interacciones entre proteínas y glicanos podrían cumplir un papel decisivo en el control de la respuesta inmune y fenómenos de tolerancia (van Kooyk & Rabinovich, 2008).

En el presente trabajo de tesis hemos identificado una función esencial para galectina-1 en la generación de DCs tolerogénicas humanas y de ratón. La interacción de galectina-1 con sus glicanos específicos logró generar un circuito inmunoregulatorio a través de la diferenciación a DCs con un perfil tolerogénico. DCs sometidas a diferenciación o maduración en presencia de galectina-1 fueron capaces de generar tolerancia *in vivo* en escenarios tumorales y antígeno-específicos y promover la resolución de la respuesta inflamatoria autoinmune mediada por células Th1 y Th17. El estudio de los mecanismos involucrados en este efecto antiinflamatorio revelaron un protagonismo de la vía regulatoria dependiente de IL-27 y mediada por IL-10. Además, demostramos un nuevo papel para la galectina-1 endógena como moduladora de las funciones tolerogénicas de las DCs durante la resolución de la inflamación autoinmune.

En un sistema de células humanas, galectina-1 inhibe la diferenciación de monocitos a DCs inmaduras (**Fig. 24A**). Esta lectina estaría inhibiendo la generación, a partir de monocitos, de las denominadas “DCs inflamatorias”, un proceso que se desarrolla como consecuencia de la inflamación o estímulos microbianos (Shortman & Naik, 2007; Villadangos & Schnorrer, 2007). A su vez, durante la maduración, galectina-

1 genera DCs con propiedades tolerogénicas las cuales promueven la expansión de células $CD4^{+}FoxP3^{-}$ productoras de IL-10 (Tr1) con capacidad de inhibir posteriores estimulaciones antigénicas (**Fig. 24B**). Los resultados expuestos concuerdan, tanto a nivel de la diferenciación como de la maduración de DCs, con las propiedades inmunosupresoras de galectina-1 en el sistema inmune.

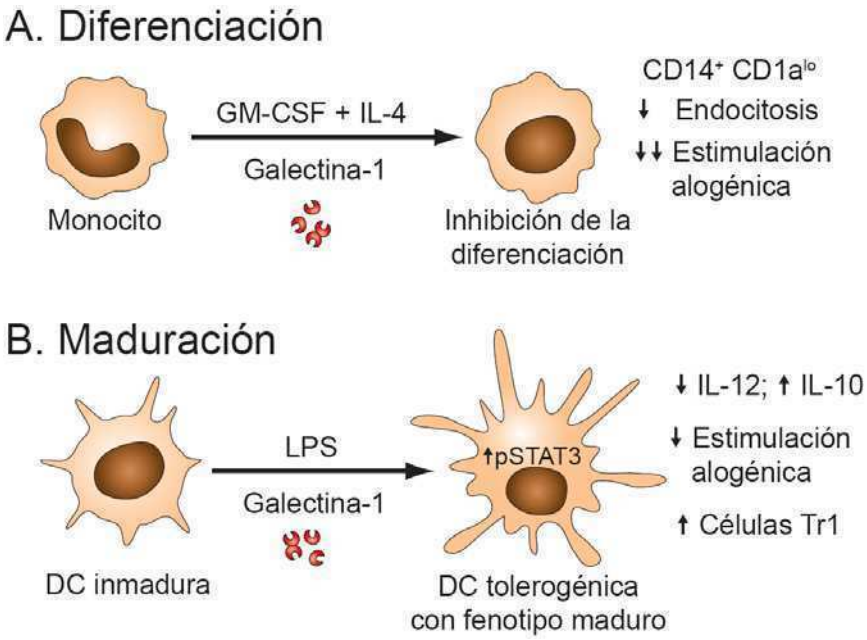


***FIGURA 24*: Galectina-1 interfiere en la funcionalidad de DCs humanas**.

Por otro lado, en un sistema de células de ratón, la administración de galectina-1 durante la diferenciación de DCs, promueve la generación de DCs tolerogénicas $CD11c^{lo}CD45RB^{+}$, las cuales favorecen la inducción de células Tr1 a través de mecanismos dependientes de IL-27 (**Fig. 25A**). A través de estos mecanismos, las DC_{Gal1} son incapaces de montar una respuesta anti-tumoral efectiva, a la vez que poseen la capacidad de restablecer la tolerancia inmunológica en la enfermedad autoinmune desmielinizante. Por el contrario, DCs provenientes de ratones deficientes en el gen de galectina-1, exhiben mayor capacidad inmunogénica (**Fig. 25B**). Estos hallazgos, en

conjunto a la regulación diferencial de galectina-1 en DCs, revelan un papel regulatorio central de galectina-1 en la fisiología de estas células.

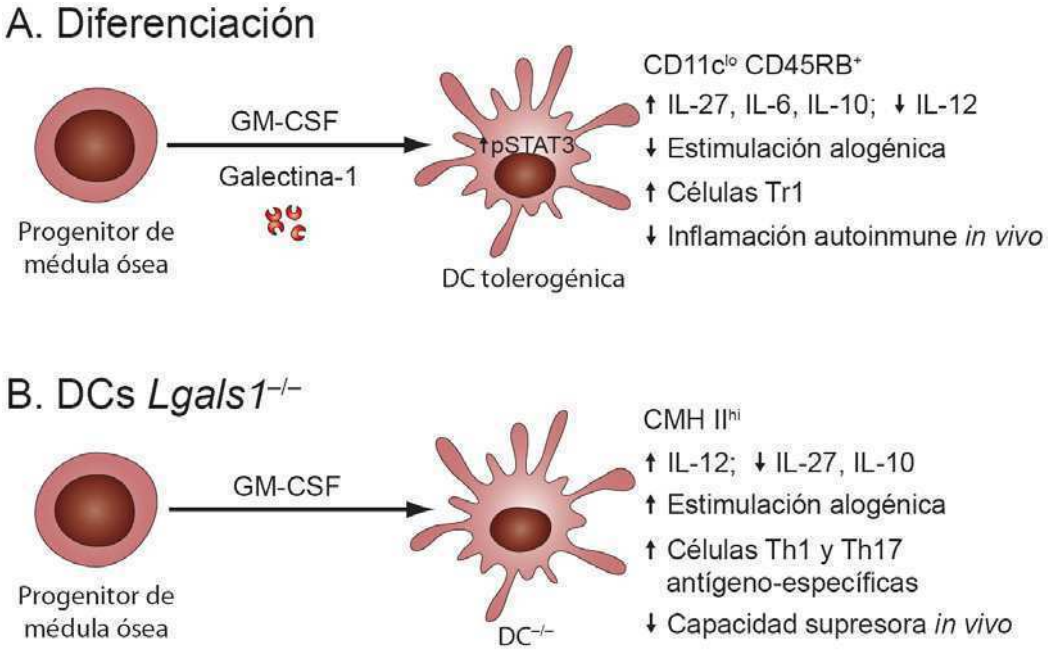


FIGURA 25: **Galectina-1 controla la actividad regulatoria de DCs.**

Evidencias recientes indican que diversas lectinas endógenas, particularmente los RLCs, podrían funcionar como moléculas de señalización, las cuales transmitirían información sobre el patógeno, antígenos tumorales o antígenos propios y de esta forma pueden activar distintos programas de diferenciación (Dillon y col., 2006; Fujikado y col., 2008; Hodges y col., 2007; LeibundGut-Landmann y col., 2007; Urzainqui y col., 2007). En este contexto, la activación del DC-SIGN, un RLC, por el virus de inmunodeficiencia humana-1 induce un fenotipo de DCs inmaduras caracterizado por un incremento en la actividad de la GTPasa-Rho (Hodges y col., 2007). Es más, Dectin-1, un RLC que reconoce estructuras tipo β-glucanos en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), activa en DCs la vía de señalización de la quinasa Syk y la proteína adaptadora CARD9 a los fines de aumentar la secreción de IL-23 y así inducir

la diferenciación de células Th17 (LeibundGut-Landmann y col., 2007). Sin embargo, DECTIN -1, también media la generación de DCs tolerogénicas productoras de IL-10 al reconocer zymosan (pared celular de levaduras) (Dillon y col., 2006). De forma similar, la interacción de P-selectina con el ligando-1 de la glicoproteína P-selectina induce la diferenciación de DCs regulatorias IDO^+ (Urzainqui y col., 2007) y la activación del RLC DCIR promueve señales inhibitorias que limitan la expansión y funcionalidad de DCs (Fujikado y col., 2008). De esta manera, diferentes sistemas de interacción entre proteínas y glicanos podrían haber evolucionado como programas de activación-inhibición que controlarían la inducción de DCs inflamatorias o tolerogénicas. En este sentido, en el presente trabajo de tesis demostramos que la interacción entre galectina-1 y sus glicanos, induce la producción de IL-27 e IL-6 en DCs y promueve la tolerancia *in vivo* a través de la diferenciación de células Tr1 productoras de IL-10. En este contexto van Vliet y colaboradores demostraron que DCs tolerogénicas expresan selectivamente el RLC MGL a los fines de suprimir la activación de células T (van Vliet y col., 2006). Consecuentemente, galectina-1 podría también emplear esta vía a través de la inducción de DCs tolerogénicas que expresen MGL, lo cual sugeriría una conexión entre las galectinas y las lectinas de tipo C en el inducción de la tolerancia inmune.

Los mecanismos subyacentes a la actividad antiinflamatoria de galectina-1 (Offner y col., 1990; Perone y col., 2006; Rabinovich y col., 1999; Santucci y col., 2003; Toscano y col., 2006; Toscano y col., 2007) no han sido claramente dilucidados. Se ha observado que esta proteína modula de la sobrevida de células T activadas y diferenciadas (Motran y col., 2008; Rabinovich y col., 1999; Stillman y col., 2006; Toscano y col., 2007) y dirige el balance de citoquinas de la respuesta inmune hacia un perfil Th2 (Motran y col., 2008; Stowell y col., 2008; Toscano y col., 2006). Sin

embargo, estos mecanismos no logran explicar en su totalidad los fenómenos de inmunosupresión observados en los períodos tempranos o tardíos de la respuesta inflamatoria luego de la administración de esta lectina por terapia génica o proteica (Offner y col., 1990; Perone y col., 2006; Rabinovich y col., 1999; Santucci y col., 2003; Toscano y col., 2006; Toscano y col., 2007). A los fines de determinar mecanismos alternativos que puedan explicar estos fenómenos, en el presente trabajo de tesis identificamos un papel crítico para galectina-1 en la iniciación de un circuito inmunoregulatorio que promueve la diferenciación de DCs tolerogénicas productoras de IL-27, las cuales promueven la expansión de células Tr1 productoras de IL-10. Si bien estudios recientes indican que, a altas concentraciones (20 µM), galectina-1 *per se* induce DCs humanas con fenotipo maduro *in vitro* (Fulcher y col., 2006), nuestros resultados demuestran que a concentraciones fisiológicas (0,3-3 µM), galectina-1 favorece la generación de DCs tolerogénicas, tanto humanas como de ratón, al administrarse durante los procesos de diferenciación o maduración de DCs junto con citoquinas o LPS, reflejando de este modo, las condiciones de activación de DCs *in vivo*. En este sentido, recientemente se ha demostrado que dichas concentraciones se encuentran en el estroma tumoral así como en tejidos inflamados (Saussez y col., 2008; Bianco *et al*., manuscrito en preparación; Cummings RD, comunicación personal). Una explicación posible a esta aparente discrepancia sería que galectina-1 tendría un papel bifuncional, actuando como señal tolerogénica a bajas concentraciones o promoviendo la maduración de DCs, dependiendo de su concentración relativa o de la prevalencia de un microambiente inflamatorio versus uno inmunosupresor. Por otro lado, concentraciones aún bajas de LPS de la proteína recombinante podrían causar una “aparente” maduración de DCs. No obstante, el

paradigma de DCs maduras capaces de iniciar la respuesta inmune adaptativa *versus* DCs inmaduras responsables de la inducción de tolerancia, ha sido recientemente desafiado. Nuevas observaciones indican que, la maduración de la DC *per se* no significa en absoluto que la célula sea inmunogénica, por lo cual una célula con fenotipo de superficie maduro o semimaduro puede efectivamente ejercer funciones tolerogénicas (Reis e Sousa, 2006; Rutella y col., 2006b). En este contexto en el presente trabajo de tesis observamos que la exposición a galectina-1 durante la maduración de las DCs induce un fenotipo maduro o semimaduro, pero con un alto potencial tolerogénico *in vivo*. A su vez, la ausencia de galectina-1 en DCs mostró un aumento de la capacidad inmunogénica de estas células, indicando que esta lectina, agregada exógenamente o regulada en forma endógena, tendría un papel tolerogénico en esta población celular.

En este sentido, recientemente demostramos que galectina-1 ocupa una posición jerárquica en la inducción de mecanismos de tolerancia en la interface materno-fetal (Blois y col., 2007). Utilizando un modelo experimental de rechazo fetal inducido por *stress*, observamos que la progesterona, una de las hormonas claves en el embarazo, es capaz de estimular la síntesis, por parte de la placenta, de galectina-1. En condiciones de stress, la expresión de esta proteína disminuye drásticamente y se asocia a un aumento en la frecuencia de rechazo fetal. Esta situación puede ser revertida por la administración de galectina-1 exógena, la cual restaura la tolerancia mediante el desvío de la respuesta inmune hacia un perfil Th2, expansión de células Treg y la inducción de DCs uterinas con fenotipo aparentemente regulatorio (Blois y col., 2007).

Se han propuesto diferentes mecanismos a los fines de comprender la plasticidad de las DCs y su papel clave en programas de diferenciación de células Th1, Th2 ó Th17 (Reis e Sousa, 2006). Sin embargo, aún no se han descripto DCs con capacidad de silenciar en forma selectiva la inmunidad mediada por dichas subpoblaciones celulares. En este sentido, estudios recientes asignan una función dominante a DCs productoras de IL-27 en la diferenciación de células T antiinflamatorias IL-10^{+}FoxP3^{-} (Awasthi y col., 2007; Fitzgerald y col., 2007; Stumhofer y col., 2007). En el presente estudio demostramos que, galectina-1 imparte un programa regulatorio en DCs, las cuales exhiben un fenotipo tolerogénico que, mediante IL-27, llevan a la generación de linfocitos T productores de IL-10. Estas células suprimen la respuesta Th17 antígeno-específica y limitan la severidad de la inflamación autoinmune, brindando una explicación racional a las amplias propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras de galectina-1. Dado que las DCs productoras de IL-27 podrían ser generadas debido al contacto con células Treg CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+} (Awasthi y col., 2007), las cuales son importantes productoras de galectina-1 (Garin y col., 2007), postulamos que esta lectina podría contribuir un mediador clave ("*missing link*") que conecte señales inmunoreguladoras transmitidas por Tregs con DCs productoras de IL-27 y células Tr1 productoras de IL-10. En este contexto, ratones deficientes en el gen que codifica para la subunidad α del receptor de IL-27 desarrollan EAE con mayor severidad clínica debido a una respuesta Th17 exacerbada (Batten y col., 2006) y animales *Lgals1*$^{-/-}$ recapitulan completamente este fenotipo (Toscano y col., 2007). En consecuencia, en animales *Il27ra*$^{-/-}$, los efectos tolerogénicos de las DC_{Gal1} se vieron casi completamente inhibidos, confirmando de este modo el papel crítico de IL-27 en la actividad regulatoria mediada por galectina-1. Asimismo, durante

la EAE, la expresión de galectina-1 en DCs aumenta durante el pico y resolución de la enfermedad, sugiriendo que esta proteína podría contribuir a la resolución de la respuesta inmune de manera similar a otros mecanismos regulatorios que actúan en tejidos inflamados como las vías de CTLA-4 y PD-1 (Rabinovich y col., 2007; Salama y col., 2003). Avalando este concepto, los estímulos más potentes que indujeron la expresión de galectina-1 fueron señales tolerogénicas como VIP (Chorny y col., 2005), vitamina D3 (Penna y col., 2007), IL-10 (Wakkach y col., 2003), células apoptóticas (Skoberne y col., 2006; Steinman y col., 2003) y galectina-1 en sí misma; así como también flagelina y SEA, potentes estímulos de la respuesta Th2 (Didierlaurent y col., 2004; Kane y col., 2004; Parish, 1996).

Galectina-1 reconoce motivos galactosa-β1-4-*N*-acetilglucosamina (LacNAc), los cuales pueden estar localizados en *N*- u *O*-glicanos (Rabinovich & Toscano, 2009). Por lo tanto, la expresión regulada de glicosiltransferasas a través de la diferenciación y maduración de DCs (Bax y col., 2007), creando sitios de unión poli-LacNAc, podría determinar la susceptibilidad a galectina-1. De acuerdo con la función regulatoria de esta lectina en la fisiología de CPAs, la interrupción de la ramificación β1,6 en *N*-glicanos debido a la eliminación del gen de la *N*-acetilglucosaminiltransferasa 5, o el bloqueo de la síntesis de polilactosamina por inhibición de la enzima β1,3-*N*-acetilglucosaminiltransferasa 2, resultó en una sensibilidad alterada a la señalización de citoquinas y menor umbral de activación en CPAs (Partridge y col., 2004; Togayachi y col., 2007). Además, estudios recientes demostraron que la unión de Tim-3, un receptor específico de galectina-9, induce distintas funciones en DCs y células T favoreciendo la iniciación o finalización de una respuesta Th1 (Anderson y col., 2007;

Zhu y col., 2005). A su vez, galectina-1 y galectina-3 promueven distintos eventos de señalización en macrófagos (Barrionuevo y col., 2007; MacKinnon y col., 2008). En consecuencia, las interacciones entre proteínas y glicanos podrían regular la homeostasis y controlar la activación, diferenciación y señalización de CPAs.

Durante los últimos años se han desarrollado diversas estrategias de inmunoterapia destinadas a combatir el cáncer. Una de estas terapias consiste en administrar vacunas de DCs conteniendo antígenos tumorales a los fines de desencadenar una respuesta inmune lo suficientemente potente como para neutralizar el escape tumoral (Banchereau & Palucka, 2005; Steinman & Banchereau, 2007). Sin embargo, esta estrategia terapéutica puede ser frustrada por factores inmunosupresores presentes durante la diferenciación o activación de estas células en el microambiente tumoral o tejidos periféricos, que podrían convertir DCs aparentemente 'inmunogénicas' en 'tolerogénicas' y de esta forma impedir el desarrollo de una respuesta inmune anti-tumoral deseada (Gottfried y col., 2008; Liu & Rabinovich, 2005; Rabinovich y col., 2007; Vicari y col., 2002). Nuestros datos demuestran que a pesar del estado de maduración, las DCs diferenciadas en presencia de galectina-1 no resultaron competentes a los fines de inducir una respuesta antitumoral efectiva, sino que por el contrario, lograron sesgar el balance de citoquinas promoviendo un microambiente de tolerancia en el sitio de crecimiento tumoral. Cabe destacar en este contexto que células estromales asociadas al tumor exhiben alta expresión de galectina-1 (Juszczynski y col., 2007; Liu & Rabinovich, 2005; Rabinovich y col., 2007; Rubinstein y col., 2004; van den Brule y col., 2001). A su vez, células estromales de diferentes tejidos han sido implicadas en la diferenciación de DCs tolerogénicas $CD11c^{lo}CD45RB^{+}$ (Svensson y col., 2004; Zhang y col., 2004). En

función de estos antecedentes, es posible especular que galectina-1 proveniente del tumor o del estroma tumoral, podría orientar la diferenciación de CPAs hacia un perfil tolerogénico, lo cual permitiría dar una explicación alternativa al papel de galectina-1 como mediador del escape tumoral (Juszczynski y col., 2007; Rubinstein y col., 2004).

Además del papel desempeñado por la galectina-1 exógena sobre la fisiología de DCs, en el presente trabajo de tesis estudiamos la regulación y función endógena de galectina-1, lo cual nos permitió caracterizar el papel que esta proteína cumple en la resolución de la respuesta inflamatoria. Los experimentos realizados indicaron que la expresión de galectina-1 regula en forma pivotal el potencial tolerogénico de DCs. En este contexto, $DC^{+/+}$ obtenidas en el día de máxima severidad clínica (pico de la EAE), lograron restablecer la tolerancia inmunológica en ratones *Lgals1*$^{-/-}$ y contribuir a la resolución de la enfermedad inflamatoria. Por otro lado $DC^{-/-}$ (provenientes de ratones deficientes en el gen de galectina-1) no lograron controlar la evolución de la enfermedad. Los mecanismos a través de los cuales galectina-1 endógena puede delinear el perfil tolerogénico de DCs aún debe ser esclarecidos, aunque de acuerdo con sus propiedades bioquímicas y funcionales, esta proteína podría ser secretada por las DCs durante el transcurso de una respuesta inflamatoria, y actuar de forma autócrina o parácrina a través de interacciones lectina-glicanos a los fines de promover la diferenciación de DCs tolerogénicas. Esta hipótesis permitiría plantear un "*cross-talk*" entre los mecanismos gatillados por galectina-1 exógena y endógena. De acuerdo a nuestros resultados, DCs deficientes en galectina-1 podrían poseer ventajas como adyuvantes en la terapia contra el cáncer o procesos infecciosos, de forma similar a las DCs desprovistas de señales inhibitorias tales como SOCS1 (Shen y col., 2004), DCIR

(Fujikado y col., 2008), o STAT3 (Cheng y col., 2003; Nefedova y col., 2005) o DCs que expresan altos niveles de la deacetilasa de histonas HDAC11 (Villagra y col., 2009).

Los resultados expuestos en esta tesis, integrados junto a datos anteriores de nuestro laboratorio (Rubinstein y col., 2004; Toscano y col., 2007), nos permiten postular un modelo hipotético (**Fig. 26**) en el cual galectina-1 en concentraciones fisiológicas promueve la diferenciación de DCs tolerogénicas productoras de IL-27 las cuales favorecen la inducción de células Tr1 productoras de IL-10, que suprimen la respuesta patogénica y efectora Th1 y Th17. A su vez, frente a estímulos inflamatorios exacerbados, los niveles de galectina-1 endógena aumentarían para eliminar en forma selectiva linfocitos Th1 y Th17 que exhiben en su superficie el repertorio de glicanos permisivos para la acción proapotótica de esta proteína. De esta manera galectina-1 estaría favoreciendo la homeostasis del sistema inmune modulando la fisiología de CPAs y de linfocitos T efectores.

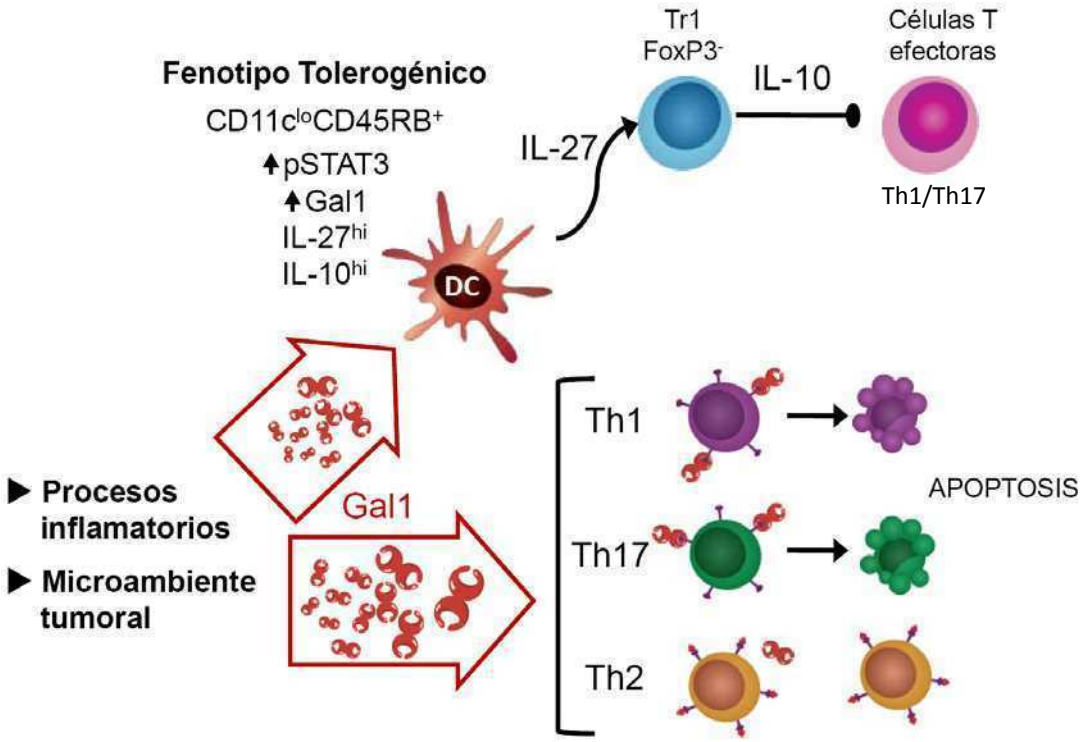


FIGURA 26: **Galectina-1 como nuevo mecanismo de regulación negativa de la respuesta inmune.** Modelo hipotético en el cual a través de la iniciación de un circuito inmunorregulatorio, galectina-1 (Gal1) genera DCs tolerogénicas productoras de IL-27, las cuales favorecen la inducción de células T regulatorias productoras de IL-10 (Tr1), que suprimen la respuesta inflamatoria Th1 y Th17. Frente a un estímulo inflamatorio exacerbado, los niveles de galectina-1 endógena aumentarían e inducirían la apoptosis de linfocitos Th1 y Th17, debido a que poseen el repertorio de glicanos específicos para la función pro-apoptótica de esta proteína. (Toscano y col., 2007).

5. CONCLUSIÓN FINAL

En conclusión, a lo largo de este trabajo de tesis, utilizando una combinación de estrategias experimentales *in vitro* e *in vivo,* exploramos cómo galectina-1 puede regular selectivamente la fisiología de DCs, tanto humanas como de ratón. Como resultado de este estudio, presentamos un nuevo mecanismo de regulación homeostática de la respuesta inmune basado en la interacción entre galectina-1 y sus glicanos. Nuestros hallazgos permitieron identificar una conexión entre la señalización vía galectina-1, la diferenciación de DCs tolerogénicas productoras de IL-27, la expansión de células Tr1 productoras de IL-10 y la supresión de la inflamación mediada por células Th1 y Th17. A la luz de estos resultados es posible anticipar nuevos horizontes terapéuticos en diferentes patologías inmunológicas. En procesos neoplásicos o infecciosos, la inhibición de la expresión de galectina-1 o sus glicanos específicos en el compartimiento de DCs, nos permitiría potenciar la respuesta inmune anti-tumoral o la efectividad de estrategias de vacunación. Por otro lado, la inducción de DCs con capacidad tolerogénica por estimulación con galectina-1 brindaría importantes beneficios terapéuticos en procesos inflamatorios crónicos, enfermedades autoinmunes y en la prevención del rechazo de transplantes.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

6.1.1 Producción de Galectina-1 recombinante

La galectina-1 recombinante (rGal1) se obtuvo de acuerdo al procedimiento descripto por Hirabayashi y colaboradores (Hirabayashi y col., 2002). Brevemente, el plásmido de expresión pH14Gal se utilizó para transformar cepas Y1090 y SCS1 de *E. coli.* La proteína se purificó por cromatografía de afinidad en una columna de lactosil-sefarosa, luego se usó una columna de filtración molecular y finalmente se eliminó el contenido de endotoxinas utilizando una columna de polimixina B. El contenido de endotoxina en la muestra se determinó a través del test de *Gel Clot Limulus* (<0.5 IU/mg; Cape Code).

6.1.2 Citometría de flujo

Las células ($1x10^6$) se centrifugaron y se resuspendieron en PBS y suero fetal bovino (SFB) 1⁄ . Para realizar la tinción de superficie las células se incubaron durante 30 min a 4 °C con los anticuerpos monoclonales (o sus controles de isotipo) conjugados a sus respectivos fluorocromos. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS/SFB 1⁄ y se resuspendieron en PBS hasta su análisis. A los fines de estudiar la expresión de FoxP3, las células se fijaron y permeabilizaron durante 20 minutos at 4 °C en solución Cytofix/Cytoperm de acuerdo a las instrucciones del proveedor (BD Biosciences) y la tinción intracitoplásmica se realizó con los Ac monoclonales PE-Cy5-anti-FoxP3 (PCH101, humano y FJK-16s, ratón; ambos de eBiosciences) o el control de isotipo

correspondiente durante 30 minutos a 4 °C. Por último, las células se lavaron con PBS + SFB 1⁄ dos veces y se resuspendieron en PBS/paraformaldehído 1⁄ .

6.1.3 Ensayos de endocitosis

DC ó DC_{Gal1} ($1x10^6$) se resuspendieron en RPMI 1640 con 300 μg/ml de FITC-OVA (Sigma) a 37 °C o a 4 °C como control negativo. Luego de la incubación las células se lavaron con PBS y se fijaron con PFA 2⁄ . Tanto la expresión de las proteínas de superficie (6.1.2) como la endocitosis (6.1.3) se detectaron por citometría de flujo en un citómetro FACScalibur ó FACSAria (ambos de BD Biosciences) . Los datos fueron analizados utilizando los programas CellQuest, FACSdiva (ambos de BD Biosciences) ó WinMDI (Scripps Research Institute).

6.1.4 Biotinilación de galectina-1 recombinante

A los fines de obtener galectina-1 biotinilada (bGal1) se utilizó el kit EZ-Link® NHS-LC-Biotin (Pierce) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se utilizaron 1-10 mg de rGal1 liofilizada, por cada reacción de biotinilación. La proteína se reconstituyó con 0,5-2 ml de agua libre de grupos aminos y se añadió el reactivo de biotinilación NHS-LC-Biotin 10 mM en dimetilsulfoxido. La mezcla de reacción se incubó 4 h en hielo con agitación. Finalmente, la proteína se dializó contra PBS/1mM β-mercaptoetanol a 4°C a fin de eliminar el excedente de reactivo.

6.1.5 Ensayos de unión de galectina-1 biotinilada

Luego de la diferenciación o maduración de las DCs, las células ($5x10^5$) se incubaron con distintas concentraciones de bGal1 (1,5 – 6 µM) en un volumen final de 50 µl en buffer PBS/1⁄ BSA durante 1h a temperatura ambiente. A su vez, se realizaron estos ensayos incubando la bGal1 (3 µM) en presencia de lactosa (10, 30 y 100 mM) y sacarosa (100 mM). La detección de los niveles de bGal1 unida se realizó por incubación con una dilución 1:50 de estreptavidina-FITC (Pierce) en buffer PBS/1⁄ BSA por 30 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron exhaustivamente y se fijaron con una solución al 1⁄ de paraformaldehido. Posteriormente, los niveles de bGal1 en la superficie celular se analizaron por citometría de flujo tal como se describió en el item **6.1.3**.

6.1.6 Ensayos de proliferación celular

Luego de llevados a cabo los diferentes cultivos celulares, las células fueron analizadas a los fines de evaluar la proliferación antígeno-específica por incorporación de timidita tritiada. En resumen, al término del tiempo de incubación con 1 µCi de [^{3}H]-timidina (20 Ci/mmol de actividad específica), se utilizó un cosechador automático (Skatron Instruments) en donde el DNA de cada cultivo fue recuperado en un papel de filtro y posteriormente embebido en líquido de centelleo (Optiphase HiSafe 3, Perkin-Elmer). Finalmente se determinó la incorporación de timidina en un contador β de centelleo líquido (Packard Instruments).

6.1.7 Detección de citoquinas por ELISA

Se utilizaron sets de ELISA de captura comerciales de acuerdo a las instrucciones del proveedor. En primer lugar se sensibilizaron (18 h a 4 °C) placas de 96 reservorios (Costar) con el anticuerpo de captura disuelto en buffer de sensibilización (buffer carbonato pH 9,6 o buffer fosfato pH 6,5). Luego las placas se lavaron 3 veces con buffer de lavado (PBS pH 7,4; 0,01⁄ Tween-20) y se incubaron con buffer de bloqueo (PBS/10⁄ SFB) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, se incubaron las muestras y la curva estándar por duplicado (18 h; 4 °C). Luego de 4 lavados se agregó la solución de detección conteniendo el anticuerpo secundario biotinilado y la estreptavidina-HRP (2 h; temperatura ambiente). Finalmente se realizaron 6 lavados y se procedió al revelado con una solución de sustrato tetrametilbenzidina (TMB) y 0,03⁄ de H_2O_2 en buffer fosfato-citrato (0,1 M ácido cítrico; 0,1 M $Na_2H\ PO_4$). La reacción se detuvo con H_2SO_4 2N y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro de placa (Labysistems Multiskan).

6.1.8 Extracción de proteínas

Los extractos proteicos se prepararon en una relación de $1x10^6$ en 30 µl de buffer de extracción (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 10mM EDTA y 1⁄ NP-40) con coctel de inhibidores de proteasas (Sigma). El lisado se incubó en hielo durante 1 h y luego se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 min a 4º C. El sobrenadante obtenido representa el extracto proteico total.

● Proteínas de medios condicionados de DCs: los medios condicionados se diluyeron en cuatro volúmenes de acetona y se incubaron por no menos de 1 h a -20 °C. Se

centrifugó a máxima velocidad durante 20 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Una vez seco, el pellet se resuspendió en PBS 0,5X y se incubó a temperatura ambiente 20 min, luego se centrifugó 5 min a 10.000 x g. Las proteínas se hallan en el sobrenadante que es posteriormente sometido a ensayos de *Western blot*.

6.1.9 Determinación de la concentración de proteínas en extractos celulares

La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el kit Micro BCA (Pierce). La solución micro BCA se preparó en base a tres soluciones. La solución A se utilizó en la relación 25 en 50, la solución B en la relación 24 en 50 y solución C en la relación 1 en 50. Luego, en una placa de 96 reservorios fondo plano, se colocaron 100 µl de solución micro BCA y 100 µl de extracto proteico, diluido en agua destilada. Posteriormente, la microplaca se incubó durante 18 h a temperatura ambiente ó 3 h a 37º C. La concentración de proteínas se determinó a partir de la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro de placa (Labysistems Multiskan). Para cuantificar la absorbancia se realizó el mismo procedimiento con una curva estándar (0,5-100 µg/ml) de albúmina sérica bovina (BSA).

6.1.10 Ensayos de *Western blot*

● Las muestras se prepararon tomando una cantidad fija de proteínas (10-60 µg), todas las muestras se llevaron a un mismo volumen final y se agregó un volumen equivalente de buffer de siembra 2X (*Laemmli Sample Buffer*; Bio-Rad). La desnaturalización de las proteínas se realizó por incubación a 100°C por 3 min.

● Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE): Se prepararon geles de poliacrilamida al 10⁄ -15⁄ de 1,5 mm de espesor. Luego de sembrar las muestras, la corrida electroforética fue realizada en una cuba de electroforesis (Mini Protean II, Bio-Rad) a 150 V constante, en buffer de electroforesis (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM glicina; 0,1⁄ SDS) durante 1 h aproximadamente.

● Preparación de geles: El gel de poliacrilamida al 15 ⁄ (gel de resolución) se preparó agregando 2,3 ml de agua destilada; 2,5 ml de buffer (1,5M Tris-HCl pH: 8,6); 5 ml de acrilamida 30⁄ /bisacrilamida 0,8⁄ ; 10 µl de TEMED; 100 µl de SDS 10⁄ y 70 µl de persulfato de amonio 10⁄ . El gel de poliacrilamida concentrador se preparó agregando 3 ml de agua destilada; 1,25 ml de buffer (0,5M Tris-HCl pH: 6,8); 650 ml de acrilamida 30⁄ /bisacrilamida 0,8⁄ ; 10 µl de TEMED; 50 µl de SDS 10⁄ y 50 µl de persulfato de amonio.

● Transferencia a membranas de nitrocelulosa: Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron utilizando un equipo Mini transblot (Bio-Rad) a una membrana nitrocelulosa (GE Healthcare). Este dispositivo permite transferir las proteínas cargadas negativamente, mediante una corriente eléctrica que moviliza a las proteínas desde el gel hacia la membrana. Para ello se utilizó buffer de transferencia (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM glicina; 0,1⁄ SDS; 20⁄ metanol) y la misma se realizó a 200 mA constante durante 40-110 min. Luego, las membranas se incubaron con buffer de bloqueo (0,15 M NaCl; 50 mM Tris; 0,1⁄ Tween-20 y 5⁄ leche descremada) durante 18h a 4° C.

● Ensayo inmunoquímico: Las membranas, previamente bloqueadas, se lavaron con buffer T.TBS (0,15 M NaCl, 50 mM Tris, 0,1⁄ Tween-20) y posteriormente se incubaron

a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluído en T.TBS/ 1⁄ leche descremada durante 1h. Luego las membranas se lavaron con buffer T.TBS y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa en T.TBS/ 1⁄ leche durante 1 h. El revelado se realizó con el Kit de quimioluminescencia ECL (GE Healthcare).

6.1.11 Detección de células apoptóticas

Brevemente, las células se lavaron 2 veces con solución fisiológica (centrifugando 5 min a 200 g cada vez) y se resuspendieron e incubaron (10 min; 0°C; oscuridad) en buffer Anexina con el reactivo Anexina V–FITC (BD Pharmingen). Al cabo de ese tiempo los niveles de apoptosis se analizaron por citometría de flujo (FACScalibur, BD Biosciences) y los histogramas se evaluaron mediante el software WinMDI 2.9. El porcentaje de células Anexina V^+ fue establecido en función del control negativo (células incubadas con buffer Anexina sin el reactivo Anexina V-FITC). El número absoluto de células viables se evaluó utilizando el colorante vital de exclusión Azul de Trypan.

6.1.12 Vías de señalización

Las DC inmaduras se estimularon con LPS (1 μg/ml) y Gal1 (3 μM) en presencia o ausencia de diferentes concentraciones del inhibidor farmacológico de la vía JAK2-STAT3 (AG490, 2,5 μM; Calbiochem) durante 24 h.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS RELACIONADOS CON DCs HUMANAS

6.2.1 Generación de DCs humanas

Las DCs se diferenciaron a partir de monocitos (Mo) de sangre periférica. Los Mo se purificaron de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas de la fase leuco-plaquetaria (*buffy-coat*) de donantes sanos mediante un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque^{TM} Plus (GE Healthcare) y posterior separación por centrifugación en un gradiente de Percoll (GE Healthcare). La pureza de la población resultante se comprobó por citometría de flujo en la cual la fracción enriquecida en células $CD14^+$ fue siempre >90⁄ . Para obtener DCs inmaduras los Mo se incubaron a 1,5-2x10^6 células/ml en medio completo [RPMI 1640 suplementado con 10⁄ SFB, 40 μg/ml gentamicina, 50 μM 2-mercaptoetanol y 2 mM L-glutamina (todo de Gibco)] en presencia de 5 ng/ml de IL-4 recombinante humana (Sigma) y 35 ng/ml de GM-CSF; Sigma) en ausencia o presencia de Gal1 (0,3-3 μM). Las células se cultivaron durante 6-7 d con 2 cambios completos de medio. La maduración de las DCs diferenciadas en ausencia de Gal1 se realizó agregando 1 μg/ml de LPS (cepa 0111:B4; Sigma) en el día 7 durante 24 h en presencia o ausencia de Gal1 (3 μM).

6.2.2 Anticuerpos

● Citometría de flujo: Se utilizaron los siguientes Ac monoclonales (todos de BD Biosciences): FITC-anti-CD1a (HI149), PE-anti-CD14 (M5E2), FITC-anti-CD86 (2331-FUN-1), FITC-anti-HLA-DR (G46-6), PE-anti-CD83 (HB15e), FITC-anti-CD4 (RPA-T4) y PE-anti-CD25 (BC96).

● *Western blot:* anticuerpos policlonales anti-STAT3 (C20); anti-pSTAT3 (B-7), anti-IkBα (C21) (los tres de Santa Cruz)

● Microscopía confocal: anti-CD43 (DF-T1), anti-CD45 (2B11), anti-IgG acoplado a FITC (F0479). Todos de Dako.

El anticuerpo policlonal anti-galectina-1 de conejo utilizado durante esta tesis doctoral ha sido generado en nuestro laboratorio de acuerdo a los procedimientos descriptos previamente (Rabinovich y col., 1999). Este anticuerpo es específico de galectina-1 y no reacciona con ningún otro miembro de la familia de galectinas (Rodig y col., 2008).

6.2.3 Purificación de células T $CD4^+$

Las células T $CD4^+$ se purificaron a partir de sangre obtenida por punción venosa de dadores sanos utilizando el kit RosetteSep (StemCell Technologies). Brevemente, por cada ml de sangre se agregaron 50 µl del *cocktail* de anticuerpos provisto por el fabricante. La muestra se incubó por 20 min a temperatura ambiente, se diluyó al medio con suero fetal bovino (SFB) al 2⁄ en buffer fosfato (PBS) y se sometió a una centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque Plus (GE Healthcare) (relación 20:5). Luego de la centrifugación, se tomaron las células de la interfase y se lavaron PBS/2⁄ SFB. Finalmente, las células obtenidas se resuspendieron en medio completo (RPMI 1640 suplementado con 2mM L-glutamina, 40 µg/ml gentamicina, SFB al 10⁄ ; todo de Gibco). El número de células viables se determinó a través del recuento en cámara de Neubauer. Luego, las células se diluyeron hasta alcanzar una concentración final de $1x10^6$ células/ml para ser utilizadas en los diferentes ensayos. La pureza se evaluó por tinción con un anticuerpo monoclonal anti-CD4 acoplado a FITC (BD Biosciences) y citometría de flujo.

6.2.4 Ensayos de segregación de CD43 y CD45

Se cultivaron DC inmaduras ($2x10^6$ células/ml) en presencia o ausencia de 3 μM de Gal1 durante 1 h a 37 °C. Luego las células se lavaron con PBS/1⁄ SFB y se fijaron con 2⁄ PFA por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-CD43 (8.4 μg/ml) ó anti-CD45 (14.5 μg/ml) en PBS/1⁄ SFB durante 30 min a 4°C y luego se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG acoplado a FITC por 30 min a 4°C. Finalmente la células se lavaron exhaustivamente y se procedió al montaje de las muestras con medio *antifade* [0,1⁄ 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octano (DABCO), 90⁄ glicerol, 10⁄ PBS, pH 9]. Los preparados se guardaron a -20 °C en oscuridad. Las imágenes se tomaron utilizando el microscopio confocal láser Nikon Eclipse E800.

6.2.5 Cultivos alogénicos

DC ó DC_{Gal1} inmaduras o maduras se resuspendieron en medio completo, se irradiaron (3000 Rads) y se co-cultivaron con linfocitos T $CD4^+$ ($1x10^5$) a diferentes relaciones DC:T por 5 d por triplicado en placas de 96 pocillos. Con el fin de determinar la actividad regulatoria de las DC_{Gal1}, células T $CD4^+$ alogénicas ($2x10^5$) se cocultivaron durante 5 d DCs maduradas con LPS ($1x10^4$) en ausencia o presencia de cantidades variables de DC_{Gal1} por triplicado en placas de 96 pocillos. Se agregó [^{3}H]-timidina por pocillo durante las últimas 18 h de cultivo.

6.3 MATERIALES Y MÉTODOS RELACIONADOS CON DCs DE RATÓN

6.3.1 Animales

Para este estudio se utilizaron ratones C57BL/6 y BALB/c adquiridos al Bioterio de la Universidad de La Plata. Estos animales fueron mantenidos en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires de acuerdo a las normas de Bioética de la Institución. Los ratones deficientes en el gen de galectina-1 (*Lgals1*$^{-/-}$) de la cepa C57BL/6, fueron obtenidos del Instituto Jacques Monod, Centro Nacional para la Investigación Científica, París, Francia, por gentileza de la Dra. Francoise Poirier. Se utilizaron ratones *Lgals1*$^{-/-}$ y *Lgals1*$^{+/+}$ de la cepa C57BL/6. Estos animales fueron criados y mantenidos en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires de acuerdo a las normas de bioética de la Institución. Los ratones deficientes en el receptor de IL-27 WSX1 (*Il27ra*$^{-/-}$) de la cepa C57BL/6, fueron obtenidos de Amgen, Thousand Oaks, California, por gentileza del Dr. Christiaan Saris. Estos animales fueron criados y mantenidos en el Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental de acuerdo a las normas de bioética de la Institución. En todos los casos se utilizaron animales de 6-12 semanas de edad.

6.3.2 Generación de DCs de ratón

Las DCs se diferenciaron a partir de precursores mieloides de médula ósea. Brevemente, se obtuvo la médula ósea de fémures y tibias de ratones C57BL/6 *wild-type* ó *Lgals1*$^{-/-}$, el tejido se disgregó mediante suaves pasajes a través de una aguja de 21 G y se lisaron los glóbulos rojos con buffer ACK (NH_4Cl 0,15 M, $KHCO_3$ 10 mM, Na_2EDTA 0,1 mM, pH 7,2-7,4). Las células obtenidas se cultivaron a $2x10^6$ células/ml

en medio completo [RPMI 1640 10⁄ SFB, 40 μg/ml gentamicina, 50 μM 2-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina y 10 mM HEPES (todo de Gibco)] suplementado con 20 ng/ml de GM-CSF recombinante (Sigma) ó 10⁄ del sobrenadante de cultivo de la línea J588L (mieloma de ratón transfectado con cDNA de GM-CSF). Las células se cultivaron durante 8 d en presencia (DC_{Gal1}) o ausencia (DC) de Gal1 (0.3-3 μM) con 3 cambios completos de medio. La maduración de las DCs se efectuó al exponerlas a 1 μg/ml de LPS durante 48 h.

6.3.3 Anticuerpos

● Citometría de flujo: Se utilizaron los siguientes Ac monoclonales (todos de BD Biosciences): PE-anti-CD11c (HL3), FITC-anti-CD40 (HM40-3), PE-anti-I-A^b (AF6-120.1), PE-anti-H-$2K^b$ (AF6-88.5), FITC-anti-CD80 (16-10A1), FITC-anti-CD86 (GL1), y FITC-anti-CD45RB (16A), FITC-anti-CD4 (GK1.5), PE-anti-CD25 (FJK-16s).

● Western Blot: se utilizaron los siguientes Ac de Santa Cruz: anti-STAT3 (C-20), anti-pSTAT3 (B-7), anti-IκBα (C-21), anti-ERK (C-14), anti-pERK (E-4), anti-p38 (A-12), anti-p38 (D-8), anti-c-Jun (H-79), anti-p-c-Jun (ser63/73-R) y anti-actin (I-19). Los Ac anti-AKT (9272) y anti-pAKT (9271S) son de Cell Signaling. Utilizamos Acs anti-IgG de conejo biotinilado de BioRad.

● Microscopía Confocal: PE-anti-CD11c (HL3; BD Biosciences)

6.3.4 Purificación de células T $CD4^+$

A partir de bazos de ratones BALB/C se purificaron células mononucleares mediante disgregación mecánica. Luego se procedió a la purificación de células $CD4^+$ utilizando el kit de selección negativa Spin Step (StemCell Technology, Vancouver, British Columbia,

Canadá). Brevemente, las células se resuspendieron en PBS 2⁄ SFB en una relación de $8x10^7$ células/ml. Por cada ml de suspensión celular, se agregaron 10 µl de una mezcla de anticuerpos y se incubó 15 min en heladera. Posteriormente, se lavó y resuspendió nuevamente en PBS 2⁄ SFB. Luego se agregaron 250 µl de una solución de partículas de alta densidad y se incubó en hielo por 20 min mezclando ocasionalmente. Luego se llevó la suspensión celular a un volumen de 8 ml con PBS 2⁄ SFB y se sembró sobre 4 ml de medio de densidad. Se centrifugó por 10 min a 1200 r.p.m. a temperatura ambiente. Se recuperaron las células de la interfase luego de un lavado y se resuspendieron en medio RPMI completo.

6.3.5 Cultivos alogénicos

DCs diferenciadas en presencia o ausencia de Gal1 o generadas de ratones *Lgals1*$^{-/-}$ se irradiaron (3000 rads) y se co-cultivaron durante 5-6 d con esplenocitos $CD4^+$ ($2x10^5$) de ratones BALB/c a distintos relaciones T:DCs por triplicado en placas de 96 pocillos. En algunos experimentos, se agregaron al inicio de los cultivos alogénicos 10 µg/ml Ac monoclonales neutralizantes anti-IL-27p28 (AF1834; R&D), anti-TGF-β (1D11; R&D) ó anti-receptor de IL-10 (CD210; 1B1.3a; BD Biosciences). Se agregó 1 µCi de [^{3}H]-timidina (20 Ci/mmol de actividad específica) por pocillo durante las últimas 18 h de cultivo.

6.3.6 Respuesta antígeno-específica *in vivo*

DCs provenientes de ratones salvajes ($DC^{+/+}$), diferenciadas en presencia de galectina-1 (DC_{Gal1}) o provenientes de ratones deficientes en el gen de galectina-1 ($DC^{-/-}$) se incubaron con OVA (200 µg/ml; Sigma) por 18 h y se inyectaron i.p. en ratones

singénicos *Lgals1*$^{+/+}$ ó *Lgals1*$^{-/-}$ ($3x10^5$ DC/ratón). Luego de 7 días, los ratones se inyectaron s.c. con OVA suplementado en CFA. Siete días después se aislaron los esplenocitos a los fines de evaluar la producción de citoquinas y la proliferación celular en respuesta a OVA, se colocaron $2x10^5$ células en 200 µl de medio completo en placas de 96 pocillos fondo en U en presencia o ausencia de 75 µg/ml de OVA por triplicado durante 4 d. A las 72 h se recolectaron los sobrenadantes para la determinación de citoquinas por ELISA. La proliferación se determinó mediante la incorporación de 1 µCi de [^{3}H]-timidina por pocillo durante las últimas 18 h de cultivo.

6.3.7 Ensayos de protección tumoral

El ensayo se realizó de acuerdo al procedimiento descripto por Kotera y col. Brevemente, células de melanoma B16 ($1x10^6$) se resuspendieron en PBS y se sometieron a cuatro ciclos rápidos de congelamiento en N_2 líquido y posterior incubación a 37 °C. Luego, las células se centrifugaron a 200 x g a 4 °C durante 10 min a los fines de remover los restos celulares y se cultivaron en relación 3:1 con DC ó DC_{Gal1} durante 18 h. Se inmunizaron ratones C57BL/6 2 veces a intervalos de 7 d con $1x10^6$ DC ó DC_{Gal1} cultivadas en presencia o ausencia de los lisados de células B16. Catorce días después de la última inmunización los ratones se desafiaron s.c. con $2x10^5$ células/100 µl PBS de células B16 viables. El crecimiento tumoral fue monitoreado cada dos días midiendo los diámetros perpendiculares con un calibre métrico digital. El volumen tumoral fue estimado a través de la siguiente fórmula (d2 x D x 0,5), en donde d es el diámetro menor y D el mayor. Por razones éticas los animales se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un volumen ≥ 2,5 cm3. Los animales con un volumen tumoral menor de 0,5 cm3 se consideraron como libres de tumor para el análisis de

Kaplan-Meier. Dos semanas después de la inoculación tumoral se purificaron células mononucleares de ganglios linfáticos drenantes mediante disgregación mecánica de los mismos y $2x10^5$ células se co-cultivaron con $1x10^4$ células B16 irradiadas (4000 rads) por triplicado. Al cabo de 72 h se recolectaron los medios condicionados a los fines de determinar los niveles de citoquinas. Luego de 3 d de cultivo se agregó 1 µCi de [^{3}H]-timidina por pocillo durante 18 h con el objetivo de determinar la proliferación linfocitaria.

6.3.8 Células tumorales

La línea de melanoma de ratón B16F0 fue obtenida de ATCC (*American Type Culture Collection*). Esta línea celular es singénicas con ratones C57BL/6 y se mantiene en cultivo con medio DMEM (Gibco), 10⁄ SFB (Gibco), 2mM de glutamina, en estufa a 37º C y a una atmósfera de 5⁄ CO_2.

6.3.9 Modelo de Encefalomielitis Autoinmune Experimental (EAE)

A los fines de inducir la EAE, ratones hembra (*wild-type*, *Lgals1*$^{-/-}$ ó *Il27ra*$^{-/-}$) de 8 – 12 semanas de edad, fueron inmunizados con 200 µg del péptido MOG_{35-55} (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; Peptides International) emulsionados en CFA suplementado con 4 mg/ml de *M. Tuberculosis* (H37Ra). El volumen final de inyección fue de 200 µl por vía s.c. (100 µl en cada flanco). A su vez, los ratones recibieron 200 ng de la toxina de *B. Pertussis* (Calbiochem) por vía i.p. en los días 0 y 2 post-inmunización. La severidad de la enfermedad fue monitoreada a diario y se asignó un valor de grado clínico según la siguiente escala: **0**: sin clínica; **1**: pérdida de la tonicidad de la cola; **2**: paresia o parálisis parcial de los miembros posteriores; **3**: parálisis completa de los miembros posteriores; **4**: parálisis completa de los miembros

posteriores y paresia o parálisis de los miembros anteriores; **5**: muerte. En un grupo de experimentos, los ratones que alcanzaron un grado clínico igual a 1 (día de inicio de los síntomas clínicos de la enfermedad), se inyectaron i.p. con $2x10^5$ DC ó DC_{Gal1} incubadas o no con MOG_{35-55}. En otro grupo de experimentos, a los fines de determinar la contribución de Gal1 a la capacidad tolerogénica de DCs, al día 21 post-inmunización se purificaron células $CD11c^+$ de bazo de ratones *Lgals1*$^{-/-}$ y *Lgals1*$^{+/+}$ utilizando MicroBeads, MACS™ de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec; pureza >96⁄) y se transfirieron a ratones en el día de inicio de los síntomas clínicos de la enfermedad. A los 28 – 30 días post-inmunización los animales fueron sacrificados y se extrajeron médulas espinales, cerebros, bazos y ganglios linfáticos, a los fines de realizar los estudios histopatológicos e inmunológicos. El análisis histológico se llevó a cabo en cortes sagitales de médulas espinales y cerebros embebidos en parafina, por tinción de Hematoxilina & Eosina a los fines de determinar la presencia de focos inflamatorios, o tinción de Luxol Fast Blue para detectar las áreas de desmielinización. A partir de ganglios y bazos de ratones de los distintos grupos experimentales, se purificaron células mononucleares mediante disgregación mecánica. A los fines de estudiar la proliferación y producción de citoquinas en respuesta al antígeno MOG_{35-55} *ex vivo*, se cultivaron $2x10^5$ células en 200 µl de medio completo en placas de 96 pocillos fondo en U en presencia o ausencia de 30 µg/ml del péptido MOG_{35-55} por triplicado. A las 72 h se recolectaron los sobrenadantes a los fines de determinar la concentración de citoquinas por ELISA. Luego de 3 días se agregó 1 µCi de [^{3}H]-timidina por pocillo durante las últimas 18 h para determinar la proliferación antígeno-específica.

6.3.10 Regulación de la expresión de galectina-1 en DCs

Células de medula ósea ó DC inmaduras se cultivaron en presencia o ausencia de los estímulos tolerogénicos VIP (10^{-8} M; Calbiochem), 1,25-dihidroxivitamina D3 (10^{-8} M; Sigma), IL-10 (50 ng/ml; R&D) o Gal1 (3 μM) seguido de estimulación con LPS (1 μg/ml). En otro set de experimentos, DC inmaduras se expusieron a IFN-γ (50 ng/ml; R&D), TNF-α (20 ng/ml; Sigma), Ac monoclonal estimulante anti-CD40 (10 μg/ml HM40-3; BD Biosciences), lipoproteínas bacterianas sintéticas Pam2CSK4 (100 ng/ml; Invivogen) y Pam3CSK4 (1 μg/ml; Invivogen), PGN de *B. subtilis* (10 μg/ml; Invivogen), poly(I:C) (10 μg/ml; Invivogen), zymosan (10 μg/ml; Invivogen), *P. acnes* inactivada por calor (20 μg/ml; van Kampen Group), flagelina de *B. subtilis* (200 ng/ml; Invivogen), SEA libre de endotoxinas (50 μg/ml) o esplenocitos apoptóticos (irradiados con 12000 rds) de ratones *Lgals1*$^{-/-}$. En este ultimo estímulo, seguido del cocultivo, las DCs se separaron de las células apoptóticas por c*ell sorting* en un citómetro de flujo FACSAria™ (BD Biosciences). De todos los tratamientos se obtuvieron los extractos proteicos y el cDNA.

● Preparación de medios condicionados de DCs: los medios condicionados se generaron a partir de cultivos DCs ($3x10^6$ células/ml) cultivadas con medio fresco RPMI 1640 completo (conteniendo $5x10^{-5}$M β-mercaptoetanol y 25 mM HEPES) pero sin suero durante 18 h a 37º C y en una atmósfera de 5⁄ CO_2.

● Purificación de proteínas de medios condicionados de DCs: los medios condicionados se diluyeron en cuatro volúmenes de acetona y se incubaron por no menos de 1 h a -20 °C. Se centrifugó a máxima velocidad durante 20 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Una vez seco, el pellet se resuspendió en PBS 0,5X y se incubó a

temperatura ambiente 20 min, luego se centrifugó 5 min a 10.000 x g. Las proteínas se recuperaron del sobrenadante.

● Microscopía confocal: DCs se fijaron en PFA 1⁄ por 15 min a temperatura ambiente y se permeabilizaron con Perm-2 solution de acuerdo a las instrucciones del proveedor (BD Biosciences). Luego, las células se incubaron 30 min a temperatura ambiente con un Ac policlonal de conejo anti-Gal1 (32 μg/ml) seguido de lavados con PBS y posterior incubación con FITC-anti-IgG de conejo (sc-2012; Santa Cruz) y PE-anti-CD11c (20 μg/ml HL-3; BD Biosciences). Finalmente la células se lavaron exhaustivamente y se procedió al montaje de las muestras con medio *antifade* [0,1⁄ 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octano (DABCO), 90⁄ glicerol, 10⁄ PBS, pH 9]. Los preparados se almacenaron a -20 °C en oscuridad. Las imágenes se tomaron utilizando el microscopio confocal láser Nikon Eclipse E800.

6.3.11 RT-PCR y PCR cuantitativa en tiempo real

Se realizó la extracción de ARN total de DCs con Trizol (Gibco), siguiendo las especificaciones del fabricante. La integridad y calidad del ARN purificado se controló por electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría, midiendo la relación Abs 260 nm/Abs 280 nm. El cDNA se sintetizó a partir de 1 μg de ARN total. Se preparó una mezcla de reacción que contenía 100 pmol de hexámeros aleatorios, 1,25 mM dNTPs y tampón (67 mM Tris pH=8,8, 16,6 mM $(NH_4)_2SO_4$, 6,7 mM $MgCl_2$) en un volumen total de 18,5 μl. Esta mezcla se incubó a 65 °C durante 5 min. Luego, se le agregó 1,5 μl de una solución con 200 U de MMLV-RT y 20 U RNase OUT (inhibidor de ribonucleasas) (todo de Invitrogen). La mezcla final se incubó a 42 °C durante 45 min. Finalmente, los tubos se incubaron a 65 °C durante 5 min, la reacción se diluyó a un

volumen final de 100 µl, se dividió en alícuotas y se almacenó a -20 ºC hasta su uso. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó con SYBR Green PCR Master Mix con 20 µl finales por pocillo siguiendo las indicaciones del fabricante (Applied Biosystem) en un equipo 7500 Real time PCR System (Applied Biosystem) utilizando las siguientes condiciones: 50 °C, 2 min, 1 ciclo; 95 °C, 10 min, 1 ciclo; 95 °C, 15 seg → 62 °C, 1 min, 40 ciclos; curva de disociación: 95 °C, 15 seg → 61 °C, 1 min → 95 °C, 15 seg 1 ciclo. Los experimentos se analizaron con el ABI PRISM 7500 Sequence Detection Software (Applied Biosystem). Los *primers* utilizados fueron: IL-27p28 *forward*: 5´-ATCTCGATTGCCAGGAGTGA; IL-27p28 *reverse*: 5´-GTGGTAGCGAGGAAGCAGAGT-3'; IL-23p19 *forward*: 5'-GCCAGTTCTGCTTGCAAAGG-3'; IL-23p19 *reverse*: 5'-GTTGCTCCATGGGGCTATCA-3'. Gal1 *forward*: 5'-TGAACCTGGGAAAAGACAGC-3'; Gal1 *reverse*: 5'-TCAGCCTGGTCAAAGGTGAT-3'; GAPDH *forward*: 5´-CCAGAACATCATCCCTGCAT-3´; GAPDH *reverse*: 5´-GTTCAGCTCTGGGATGACCTT-3´.

6.3.12 Análisis de vías de señalización

DC inmaduras se expusieron a SEA (50 µg/ml) en presencia de los inhibidores farmacológicos de las vías de señalización JAK2-STAT3 (AG490, 2,5 µM; Calbiochem), JNK-SAP (SP600125, 20 µM; Calbiochem), ERK1-2 (U0126, 5 µM; Sigma), NF-κB (BAY11-7082, 1 µM; Sigma), PI3K-AKT (Ly294002, 2 µM; Sigma) y p38 (SB202190, 10 µM; Calbiochem) durante 24 h.

6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el Prism software (GraphPad). La comparación entre dos grupos se efectuó usando el test *t* de Student para datos no pareados. En los experimentos de protección tumoral se utilizó el análisis de *Kaplan-Meier*. El test *U* de *Mann-Whitney* se utilizó a los fines de establecer la significancia estadística del grado clínico en los ensayos de EAE. Valores de *P* iguales a 0,05 o menores se consideraron significativos.

7. REFERENCIAS

Abbas AK, and Lichtman AH (**2004**). Inmunología Molecular y Celular, Vol 1, 5ta edn (Elsevier).

Adler HS, and Steinbrink K (**2007**). Tolerogenic dendritic cells in health and disease: friend and foe! *Eur J Dermatol* 17;476-491.

Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, Hastings WD, Kassam N, Lei C, Chandwaskar R, Karman J, Su EW, Hirashima M, Bruce JN, Kane LP, Kuchroo VK, and Hafler DA (**2007**). Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science* 318;1141-1143.

Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, Kuchroo VK, Oukka M, and Weiner HL (**2007**). A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol* 8;1380-1389.

Badovinac VP, Messingham KA, Jabbari A, Haring JS, and Harty JT (**2005**). Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat Med* 11;748-756.

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

Banchereau J, and Palucka AK (**2005**). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5;296-306.

Barrionuevo P, Beigier-Bompadre M, Ilarregui JM, Toscano MA, Bianco GA, Isturiz MA, and Rabinovich GA (**2007**). A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway. *J Immunol* 178;436-445.

Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, and Srivastava PK (**2001**). CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 14;303-313.

Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, Lee J, de Sauvage FJ, and Ghilardi N (**2006**). Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 7;929-936.

Baum LG, Pang M, Perillo NL, Wu T, Delegeane A, Uittenbogaart CH, Fukuda M, and Seilhamer JJ (**1995**). Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J Exp Med* 181;877-887.

Baum LG, Blackall DP, Arias-Magallano S, Nanigian D, Uh SY, Browne JM, Hoffmann D, Emmanouilides CE, Territo MC, and Baldwin GC (**2003**). Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin Immunol* 109;295-307.

Bax M, Garcia-Vallejo JJ, Jang-Lee J, North SJ, Gilmartin TJ, Hernandez G, Crocker PR, Leffler H, Head SR, Haslam SM, Dell A, and van Kooyk Y (**2007**). Dendritic cell maturation results in pronounced changes in glycan expression affecting recognition by siglecs and galectins. *J Immunol* 179;8216-8224.

Belkaid Y, and Oldenhove G (**2008**). Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity* 29;362-371.

Benson MJ, Pino-Lagos K, Rosemblatt M, and Noelle RJ (**2007**). All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* 204;1765-1774.

Bettelli E, Oukka M, and Kuchroo VK (**2007**). T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 8;345-350.

Bi S, Earl LA, Jacobs L, and Baum LG (**2008**). Structural features of galectin-9 and galectin-1 that determine distinct T cell death pathways. *J Biol Chem* 283;12248-12258.

Blaser C, Kaufmann M, Muller C, Zimmermann C, Wells V, Mallucci L, and Pircher H (**1998**). Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol* 28;2311-2319.

Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, Toscano MA, Bianco GA, Kobelt P, Handjiski B, Tirado I, Markert UR, Klapp BF, Poirier F, Szekeres-Bartho J, Rabinovich GA, and Arck PC (**2007**). A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med* 13;1450-1457.

Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, Brimnes MK, Moltedo B, Moran TM, and Steinman RM (**2004**). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 199;815-824.

Brocker T, Riedinger M, and Karjalainen K (**1997**). Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 185;541-550.

Clark AG, Chen S, Zhang H, Brady GF, Ungewitter EK, Bradley JK, Sackey FN, and Foster MH (**2007**). Multifunctional regulators of cell growth are differentially expressed in anergic murine B cells. *Mol Immunol* 44;1274-1285.

Coffman RL (**2006**). Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nat Immunol* 7;539-541.

Comelli EM, Sutton-Smith M, Yan Q, Amado M, Panico M, Gilmartin T, Whisenant T, Lanigan CM, Head SR, Goldberg D, Morris HR, Dell A, and Paulson JC (**2006**). Activation of murine CD4+ and CD8+ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. *J Immunol* 177;2431-2440.

Cooper DN (**2002**). Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta* 1572;209-231.

Correa SG, Sotomayor CE, Aoki MP, Maldonado CA, and Rabinovich GA (**2003**). Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. *Glycobiology* 13;119-128.

Cheng F, Wang HW, Cuenca A, Huang M, Ghansah T, Brayer J, Kerr WG, Takeda K, Akira S, Schoenberger SP, Yu H, Jove R, and Sotomayor EM (**2003**). A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity* 19;425-436.

Chorny A, Gonzalez-Rey E, Fernandez-Martin A, Pozo D, Ganea D, and Delgado M (**2005**). Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102;13562-13567.

Chung CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA, and Miceli MC (**2000**). Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J Immunol* 165;3722-3729.

Daniels MA, Hogquist KA, and Jameson SC (**2002**). Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat Immunol* 3;903-910.

Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho IC, Khoury S, Oukka M, and Kuchroo VK (**2008**). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* 9;1347-1355.

Didierlaurent A, Ferrero I, Otten LA, Dubois B, Reinhardt M, Carlsen H, Blomhoff R, Akira S, Kraehenbuhl JP, and Sirard JC (**2004**). Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J Immunol* 172;6922-6930.

Dillon S, Agrawal S, Banerjee K, Letterio J, Denning TL, Oswald-Richter K, Kasprowicz DJ, Kellar K, Pare J, van Dyke T, Ziegler S, Unutmaz D, and Pulendran B (**2006**). Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest* 116;916-928.

Dong C (**2006**). Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol* 6;329-333.

Dubsky P, Ueno H, Piqueras B, Connolly J, Banchereau J, and Palucka AK (**2005**). Human dendritic cell subsets for vaccination. *J Clin Immunol* 25;551-572.

Fainboim L, and Geffner JR (**2005**). Introducción a la Inmunología Humana, 5ta edn (Editorial Médica Panamericana).

Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC, and Puccetti P (**2006**). The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 176;6752-6761.

Faunce DE, Terajewicz A, and Stein-Streilein J (**2004**). Cutting edge: in vitro-generated tolerogenic APC induce CD8+ T regulatory cells that can suppress ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 172;1991-1995.

Fitzgerald DC, Zhang GX, El-Behi M, Fonseca-Kelly Z, Li H, Yu S, Saris CJ, Gran B, Ciric B, and Rostami A (**2007**). Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol* 8;1372-1379.

Fouillit M, Joubert-Caron R, Poirier F, Bourin P, Monostori E, Levi-Strauss M, Raphael M, Bladier D, and Caron M (**2000**). Regulation of CD45-induced signaling by galectin-1 in Burkitt lymphoma B cells. *Glycobiology* 10;413-419.

Fujikado N, Saijo S, Yonezawa T, Shimamori K, Ishii A, Sugai S, Kotaki H, Sudo K, Nose M, and Iwakura Y (**2008**). Dcir deficiency causes development of autoimmune diseases in mice due to excess expansion of dendritic cells. *Nat Med* 14;176-180.

Fulcher JA, Hashimi ST, Levroney EL, Pang M, Gurney KB, Baum LG, and Lee B (**2006**). Galectin-1-matured human monocyte-derived dendritic cells have enhanced migration through extracellular matrix. *J Immunol* 177;216-226.

Gallucci S, and Matzinger P (**2001**). Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13;114-119.

Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, and Lechler RI (**2007**). Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109;2058-2065.

Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Engering A, t Hart BA, and van Kooyk Y (**2004**). Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 22;33-54.

Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F, Chauffert B, and Zitvogel L (**2005**). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 202;919-929.

Gottfried E, Kreutz M, and Mackensen A (**2008**). Tumor-induced modulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev* 19;65-77.

Greenwald RJ, Freeman GJ, and Sharpe AH (**2005**). The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23;515-548.

Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, and Amigorena S (**2002**). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20;621-667.

Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WE, Yagi F, and Kasai K (**2002**). Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 1572;232-254.

Hodges A, Sharrocks K, Edelmann M, Baban D, Moris A, Schwartz O, Drakesmith H, Davies K, Kessler B, McMichael A, and Simmons A (**2007**). Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication. *Nat Immunol* 8;569-577.

Janeway C (**2005**). Immunobiology: the immune system in health and disease, 6th edn (Garland Science).

Janeway CA, Jr., and Medzhitov R (**2002**). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20;197-216.

Juszczynski P, Ouyang J, Monti S, Rodig SJ, Takeyama K, Abramson J, Chen W, Kutok JL, Rabinovich GA, and Shipp MA (**2007**). The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104;13134-13139.

Kane CM, Cervi L, Sun J, McKee AS, Masek KS, Shapira S, Hunter CA, and Pearce EJ (**2004**). Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation. *J Immunol* 173;7454-7461.

Kaneko Y, Nimmerjahn F, and Ravetch JV (**2006**). Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 313;670-673.

Kim GY, Kim KH, Lee SH, Yoon MS, Lee HJ, Moon DO, Lee CM, Ahn SC, Park YC, and Park YM (**2005**). Curcumin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: MAPKs and translocation of NF-kappa B as potential targets. *J Immunol* 174;8116-8124.

Kopcow HD, Rosetti F, Leung Y, Allan DS, Kutok JL, and Strominger JL (**2008**). T cell apoptosis at the maternal-fetal interface in early human pregnancy, involvement of galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105;18472-18477.

Kotera Y, Shimizu K, and Mule JJ (**2001**). Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization. *Cancer Res* 61;8105-8109.

Kourilsky P, and Truffa-Bachi P (**2001**). Cytokine fields and the polarization of the immune response. *Trends Immunol* 22;502-509.

La M, Cao TV, Cerchiaro G, Chilton K, Hirabayashi J, Kasai K, Oliani SM, Chernajovsky Y, and Perretti M (**2003**). A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. *Am J Pathol* 163;1505-1515.

LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Brown GD, Ruland J, and Reis e Sousa C (**2007**). Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 8;630-638.

Liu FT, Patterson RJ, and Wang JL (**2002**). Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta* 1572;263-273.

Liu FT, and Rabinovich GA (**2005**). Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5;29-41.

MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodkinson PS, Henderson NC, Atkinson KM, Leffler H, Nilsson UJ, Haslett C, Forbes SJ, and Sethi T (**2008**). Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *J Immunol* 180;2650-2658.

Majeti R, Bilwes AM, Noel JP, Hunter T, and Weiss A (**1998**). Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge. *Science* 279;88-91.

Marshak-Rothstein A, and Rifkin IR (**2007**). Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. *Annu Rev Immunol* 25;419-441.

Marth JD, and Grewal PK (**2008**). Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol* 8;874-887.

Maynard CL, Harrington LE, Janowski KM, Oliver JR, Zindl CL, Rudensky AY, and Weaver CT (**2007**). Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol* 8;931-941.

McGeachy MJ, and Cua DJ (**2008**). Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 28;445-453.

Moody DB, and Porcelli SA (**2003**). Intracellular pathways of CD1 antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3;11-22.

Morelli AE, and Thomson AW (**2007**). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 7;610-621.

Morgan R, Gao G, Pawling J, Dennis JW, Demetriou M, and Li B (**2004**). N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5)-mediated N-glycosylation negatively regulates Th1 cytokine production by T cells. *J Immunol* 173;7200-7208.

Motran CC, Molinder KM, Liu SD, Poirier F, and Miceli MC (**2008**). Galectin-1 functions as a Th2 cytokine that selectively induces Th1 apoptosis and promotes Th2 function. *Eur J Immunol* 38;3015-3027.

Nefedova Y, Nagaraj S, Rosenbauer A, Muro-Cacho C, Sebti SM, and Gabrilovich DI (**2005**). Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res* 65;9525-9535.

O'Garra A, and Arai N (**2000**). The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol* 10;542-550.

O'Garra A, and Barrat FJ (**2003**). In vitro generation of IL-10-producing regulatory CD4+ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by Th1- and Th2-inducing cytokines. *Immunol Lett* 85;135-139.

Offner H, Celnik B, Bringman TS, Casentini-Borocz D, Nedwin GE, and Vandenbark AA (**1990**). Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 28;177-184.

Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, and Sakaguchi S (**2008**). Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105;10113-10118.

Pace KE, Lee C, Stewart PL, and Baum LG (**1999**). Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J Immunol* 163;3801-3811.

Parish CR (**1996**). Immune deviation: a historical perspective. *Immunol Cell Biol* 74;449-456.

Partridge EA, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Pawling J, Cheung P, Granovsky M, Nabi IR, Wrana JL, and Dennis JW (**2004**). Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* 306;120-124.

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

Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, and Baum LG (**1995**). Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378;736-739.

Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT, and Baum LG (**1997**). Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J Exp Med* 185;1851-1858.

Perone MJ, Bertera S, Tawadrous ZS, Shufesky WJ, Piganelli JD, Baum LG, Trucco M, and Morelli AE (**2006**). Dendritic cells expressing transgenic galectin-1 delay onset of autoimmune diabetes in mice. *J Immunol* 177;5278-5289.

Perruche S, Zhang P, Liu Y, Saas P, Bluestone JA, and Chen W (**2008**). CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nat Med* 14;528-535.

Poirier F, and Robertson EJ (**1993**). Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. *Development* 119;1229-1236.

Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, and van den Broek M (**2005**). Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 6;280-286.

Rabinovich G, Castagna L, Landa C, Riera CM, and Sotomayor C (**1996**). Regulated expression of a 16-kd galectin-like protein in activated rat macrophages. *J Leukoc Biol* 59;363-370.

Rabinovich GA, Modesti NM, Castagna LF, Landa CA, Riera CM, and Sotomayor CE (**1997**). Specific inhibition of lymphocyte proliferation and induction of apoptosis by CLL-I, a beta-galactoside-binding lectin. *J Biochem* 122;365-373.

Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, Castagna LF, Wolfenstein-Todel C, Riera CM, and Sotomayor CE (**1998**). Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol* 160;4831-4840.

Rabinovich GA, Ariel A, Hershkoviz R, Hirabayashi J, Kasai KI, and Lider O (**1999a**). Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology* 97;100-106.

Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J, and Chernajovsky Y (**1999b**). Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med* 190;385-398.

Rabinovich GA, Sotomayor CE, Riera CM, Bianco I, and Correa SG (**2000**). Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur J Immunol* 30;1331-1339.

Rabinovich GA, Ramhorst RE, Rubinstein N, Corigliano A, Daroqui MC, Kier-Joffe EB, and Fainboim L (**2002**). Induction of allogenic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms. *Cell Death Differ* 9;661-670.

Rabinovich GA, Toscano MA, Ilarregui JM, and Rubinstein N (**2004**). Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: novel regulators of innate and adaptive immune responses. *Glycoconj J* 19;565-573.

Rabinovich GA, Gabrilovich D, and Sotomayor EM (**2007a**). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 25;267-296.

Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS, and Vasta GR (**2007b**). Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol* 17;513-520.

Rabinovich GA, and Toscano MA (**2009**). Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol* In Press.

Reis e Sousa C (**2006**). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6;476-483.

Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, and Reis e Sousa C (**2006**). Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol* 7;1258-1265.

Rodig SJ, Ouyang J, Juszczynski P, Currie T, Law K, Neuberg DS, Rabinovich GA, Shipp MA, and Kutok JL (**2008**). AP1-dependent galectin-1 expression delineates classical hodgkin and anaplastic large cell lymphomas from other lymphoid malignancies with shared molecular features. *Clin Cancer Res* 14;3338-3344.

Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, and Levings MK (**2006**). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212;28-50.

Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer OL, and Rabinovich GA (**2004**). Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 5;241-251.

Rutella S, Bonanno G, Procoli A, Mariotti A, de Ritis DG, Curti A, Danese S, Pessina G, Pandolfi S, Natoni F, Di Febo A, Scambia G, Manfredini R, Salati S, Ferrari S, Pierelli L, Leone G, and Lemoli RM (**2006a**). Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10++IL-12low/neg accessory cells with dendritic-cell features. *Blood* 108;218-227.

Rutella S, Danese S, and Leone G (**2006b**). Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 108;1435-1440.

Sakaguchi S (**2005**). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6;345-352.

Salama AD, Chitnis T, Imitola J, Ansari MJ, Akiba H, Tushima F, Azuma M, Yagita H, Sayegh MH, and Khoury SJ (**2003**). Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 198;71-78.

Santucci L, Fiorucci S, Cammilleri F, Servillo G, Federici B, and Morelli A (**2000**). Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 31;399-406.

Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, Mencarelli A, Palazzetti B, Federici B, Rabinovich GA, and Morelli A (**2003**). Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 124;1381-1394.

Sato S, and Nieminen J (**2004**). Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconj J* 19;583-591.

Saussez S, Glinoer D, Chantrain G, Pattou F, Carnaille B, Andre S, Gabius HJ, and Laurent G (**2008**). Serum galectin-1 and galectin-3 levels in benign and malignant nodular thyroid disease. *Thyroid* 18;705-712.

Savina A, and Amigorena S (**2007**). Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 219;143-156.

Shen L, Evel-Kabler K, Strube R, and Chen SY (**2004**). Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. *Nat Biotechnol* 22;1546-1553.

Shortman K, and Naik SH (**2007**). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 7;19-30.

Skoberne M, Somersan S, Almodovar W, Truong T, Petrova K, Henson PM, and Bhardwaj N (**2006**). The apoptotic-cell receptor CR3, but not alphavbeta5, is a regulator of human dendritic-cell immunostimulatory function. *Blood* 108;947-955.

Sospedra M, and Martin R (**2005**). Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23;683-747.

Steinbrink K, Wolfl M, Jonuleit H, Knop J, and Enk AH (**1997**). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159;4772-4780.

Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, and Enk AH (**2002**). CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 99;2468-2476.

Steinman L (**1996**). Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 85;299-302.

Steinman L (**2007**). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 13;139-145.

Steinman RM, and Cohn ZA (**1973**). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137;1142-1162.

Steinman RM (**1991**). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9;271-296.

Steinman RM, Hawiger D, and Nussenzweig MC (**2003**). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21;685-711.

Steinman RM, and Banchereau J (**2007**). Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449;419-426.

Stillman BN, Hsu DK, Pang M, Brewer CF, Johnson P, Liu FT, and Baum LG (**2006**). Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *J Immunol* 176;778-789.

Stowell SR, Karmakar S, Stowell CJ, Dias-Baruffi M, McEver RP, and Cummings RD (**2007**). Human galectin-1, -2, and -4 induce surface exposure of phosphatidylserine in activated human neutrophils but not in activated T cells. *Blood* 109;219-227.

Stowell SR, Arthur CM, Mehta P, Slanina KA, Blixt O, Leffler H, Smith DF, and Cummings RD (**2008a**). Galectins-1, -2 and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. *J Biol Chem*.

Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, Koyama NS, Dias-Baruffi M, Leffler H, McEver RP, and Cummings RD (**2008b**). Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *J Immunol* 180;3091-3102.

Stromnes IM, and Goverman JM (**2006**). Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 1;1810-1819.

Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, and Goverman JM (**2008**). Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med*.

Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, Ernst M, Saris CJ, O'Shea JJ, and Hunter CA (**2007**). Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 8;1363-1371.

Svensson M, Maroof A, Ato M, and Kaye PM (**2004**). Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. *Immunity* 21;805-816.

Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, and Glimcher LH (**2003**). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 21;713-758.

Togayachi A, Kozono Y, Ishida H, Abe S, Suzuki N, Tsunoda Y, Hagiwara K, Kuno A, Ohkura T, Sato N, Sato T, Hirabayashi J, Ikehara Y, Tachibana K, and Narimatsu H (**2007**). Polylactosamine on glycoproteins influences basal levels of lymphocyte and macrophage activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104;15829-15834.

Toscano MA, Commodaro AG, Ilarregui JM, Bianco GA, Liberman A, Serra HM, Hirabayashi J, Rizzo LV, and Rabinovich GA (**2006**). Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J Immunol* 176;6323-6332.

Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, Zwirner NW, Poirier F, Riley EM, Baum LG, and Rabinovich GA (**2007**). Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 8;825-834.

Trumpfheller C, Finke JS, Lopez CB, Moran TM, Moltedo B, Soares H, Huang Y, Schlesinger SJ, Park CG, Nussenzweig MC, Granelli-Piperno A, and Steinman RM (**2006**). Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J Exp Med* 203;607-617.

Urzainqui A, Martinez del Hoyo G, Lamana A, de la Fuente H, Barreiro O, Olazabal IM, Martin P, Wild MK, Vestweber D, Gonzalez-Amaro R, and Sanchez-Madrid F (**2007**). Functional role of P-selectin glycoprotein ligand 1/P-selectin interaction in the generation of tolerogenic dendritic cells. *J Immunol* 179;7457-7465.

van den Brule FA, Waltregny D, and Castronovo V (**2001**). Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. *J Pathol* 193;80-87.

Van Dyken SJ, Green RS, and Marth JD (**2007**). Structural and mechanistic features of protein O glycosylation linked to CD8+ T-cell apoptosis. *Mol Cell Biol* 27;1096-1111.

van Kooyk Y (**2008**). C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochem Soc Trans* 36;1478-1481.

van Kooyk Y, and Rabinovich GA (**2008**). Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 9;593-601.

van Vliet SJ, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB, and van Kooyk Y (**2006**). Regulation of effector T cells by antigen-presenting cells via interaction of the C-type lectin MGL with CD45. *Nat Immunol* 7;1200-1208.

Vasta GR, and Ahmed H (2009). Animal Lectins: a functional View, 1st edn (CRC Press, Taylor & Francis Group).

Vicari AP, Caux C, and Trinchieri G (**2002**). Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Semin Cancer Biol* 12;33-42.

Villadangos JA, and Schnorrer P (**2007**). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 7;543-555.

Villagra A, Cheng F, Wang HW, Suarez I, Glozak M, Maurin M, Nguyen D, Wright KL, Atadja PW, Bhalla K, Pinilla-Ibarz J, Seto E, and Sotomayor EM (**2009**). The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nat Immunol* 10;92-100.

von Boehmer H (**2005**). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6;338-344.

Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, and Groux H (**2003**). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18;605-617.

Walker LS, Chodos A, Eggena M, Dooms H, and Abbas AK (**2003**). Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. *J Exp Med* 198;249-258.

Walzel H, Schulz U, Neels P, and Brock J (**1999**). Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45. *Immunol Lett* 67;193-202.

Walzel H, Blach M, Hirabayashi J, Kasai KI, and Brock J (**2000**). Involvement of CD2 and CD3 in galectin-1 induced signaling in human Jurkat T-cells. *Glycobiology* 10;131-140.

Wang L, Pino-Lagos K, de Vries VC, Guleria I, Sayegh MH, and Noelle RJ (**2008**). Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105;9331-9336.

Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, and Murphy KM (**2006**). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24;677-688.

Yang RY, Rabinovich GA, and Liu FT (**2008**). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 10;e17.

Zhang M, Tang H, Guo Z, An H, Zhu X, Song W, Guo J, Huang X, Chen T, Wang J, and Cao X (**2004**). Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 5;1124-1133.

Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, Zheng XX, Strom TB, and Kuchroo VK (**2005**). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 6;1245-1252.

Zuniga E, Rabinovich GA, Iglesias MM, and Gruppi A (**2001**). Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. *J Leukoc Biol* 70;73-79.

8. ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
AFC	Adyuvante de Freund completo
BCR	Receptor de células B
BDCA-2	*Blood DC antigen-2* (Antígeno 2 sanguíneo de DCs)
bGal1	Galectina-1 biotinilada
C-LEC	*C-type lectin-like receptor* (Receptor de lectina tipo C)
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CPA	Célula presentadora de antígeno
CTLA-4	*Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4* (Antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos)
DC	Célula dendrítica, optamos por la sigla en inglés a los fines de evitar confusiones con los marcadores CD (*cluster of diferentiation*), muy utilizados en inmunología
DCAL-1	*Dendritic cell-associated lectin-1* (Lectina-1 asociada a DCs)
DCIR	*Dendritic cell immunoreceptor* (Inmunorreceptor de DCs)
DC-SIGN	*Dendritic cell–specific ICAM3-grabbing nonintegrin*(Molécula de adhesión intercelular no integrina específica de DCs)
DEC-205	*Dendritic cell receptor for endocitosis* (Receptor de DCs para endocitosis)
DECTIN-1	*Dendritic cell-associated C-type lectin-1* (Lectina 1 de tipo C asociada a DCs)
DRC	Dominio de reconocimiento de carbohidratos
EAE	Encefalomielitis autoinmune experimental
EM	Esclerosis múltiple
Gal1	Galectina-1
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HGF	*Hepatocyte growth factor* (Factor de crecimiento de hepatocitos)
iDC	Célula dendrítica inmadura
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenasa
IFN	Interferón

Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IL-27Rα	Cadena α del receptor de IL-27
iTreg	Células T regulatorias $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ inducibles
KLH	*Keyhole limpet haemocianine* (Hemocianina del molusco lapa; *Fissurellidae sp*.)
LFA-1	*Lymphocyte-function associated antigen-1* (Antígeno 1 asociado a la función de linfocitos)
LPS	Lipopolisacárido
LTC	Linfocito T citotóxico
MGL-1	*Macrophage galactose/N-acetylgalactosamine-specific C-type lectin-1* (Lectina 1 de tipo C específica para galactosa/N-acetylgalactosamina de macrófagos)
MOG_{35-55}	péptido 35-55 de la de la glicoproteína oligodendrocitaria de mielina
NK	Células natural killer (asesinas naturales)
ON	Oxido nítrico
OVA	Ovoalbúmina
PD-1	*Programmed death-1* (molécula asociada a la muerte programada tipo 1)
PD-L1	Ligando de PD-1
PGE	Prostaglandina E
PMAP	Patrones moleculares asociados a patógenos
RE	Retículo endoplásmico
RFc	Receptores para el fragmento Fc de Ig
RLC	Receptores lectina de tipo C
RM	Receptor de manosa
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones
RS	Receptor "*scavenger*"
SEA	Antígenos de huevos de *Schistosoma mansoni*
TCR	Receptor de antígeno de células T
TGF	*Transforming growth factor* (Factor de crecimiento transformante)
Th	Linfocito T *helper* (Cooperador)
TLR	*Toll-like receptor* (Receptor tipo Toll)
TNBS	Ácido sulfónico trinitrobenceno

TNF	*Tumor necrosis factor* (Factor de necrosis tumoral)
Tr1	Células T regulatorias productoras de IL-10
Treg	Células T regulatorias $CD4^+CD25^+Foxp3^+$
VIP	*Vasoactive intestinal peptide* (Péptido intestinal vasoactivo)
Vitamina D3	1,25-dihidroxivitamina D3

9. PUBLICACIONES

I. PUBLICACIONES QUE SURGIERON COMO RESULTADO DE ESTE TRABAJO DE TESIS

An immunoregulatory circuit initiated by galectin-1 on dendritic cells promotes IL-27-dependent T cell tolerance and drives the resolultion of autoimmune inflammation.
Ilarregui JM, Bianco GA*, Croci DO*, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, Geffner JR, Rabinovich GA.
Este trabajo ha sido enviado a publicar en primera instancia en abril de 2008. Los editores sugirieron cambios mayores que fueron realizados en el transcurso del año 2008. En diciembre de 2008 el trabajo fue reenviado a publicar habiendo recibido correcciones limitadas que deben ser realizadas en los próximos dos meses.

II. PUBLICACIONES EN LAS CUALES PARTICIPÉ COMO CO-AUTOR DURANTE EL TRANSCURSO DE ESTA TESIS

A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance.
Blois SM, **Ilarregui JM*,** Tometten M*, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, Toscano MA, Bianco GA, Kobelt P, Handjiski B, Tirado I, Markert UR, Klapp BF, Poirier F, Szekeres-Bartho J, Rabinovich GA*, Arck PC*.
Nature Medicine 2007 Dec;13(12):1450-7.
(*****Estos autores contribuyeron por igual en este trabajo).

Differential glycosylation of T_H1, T_H2 and T_H-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death.
Toscano MA, Bianco GA*, **Ilarregui JM***, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, Zwirner NW, Poirier F, Riley EM, Baum LG, Rabinovich GA.
Nature Immunology 2007 Aug;8(8):825-34.
(*****Estos autores contribuyeron por igual en este trabajo).

Control of dendritic cell maturation and function by triiodothyronine.
Mascanfroni I*, Del Mar Montesinos M*, Susperreguy S, Cervi L, **Ilarregui JM**, Ramseyer VD, Masini-Repiso AM, Targovnik HM, Rabinovich GA, Pellizas CG.
FASEB Journal 2008 Apr;22(4):1032-42.
(*****Estos autores contribuyeron por igual en este trabajo).

A Novel Function for Galectin-1 at the Crossroad of Innate and Adaptive Immunity: Galectin-1 Regulates Monocyte/Macrophage Physiology through a Nonapoptotic ERK-Dependent Pathway.
Barrionuevo P*, Beigier-Bompadre M*, **Ilarregui JM**, Toscano MA, Bianco GA, Isturiz MA, Rabinovich GA.
Journal of Immunology 2007 Jan 1;178(1):436-45.
(*****Estos autores contribuyeron por igual en este trabajo).

Low-dose cyclophosphamide modulates galectin-1 expression and function in an experimental rat lymphoma model.
Zacarias Fluck MF*, Rico MJ*, Gervasoni SI, **Ilarregui JM**, Toscano MA, Rabinovich GA, Scharovsky OG.
Cancer Immunology and Immunotherapy 2007 Feb;56(2):237-48.
(*Estos autores contribuyeron por igual en este trabajo)

Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses.
Toscano MA*, Commodaro AG*, **Ilarregui JM**, Bianco GA, Liberman A, Serra HM, Hirabayashi J, Rizzo LV, Rabinovich GA.
Journal of Immunology 2006 May 15;176(10):6323-32
(*Estos autores contribuyeron por igual en este trabajo)

Regulation of galectin-1 expression by transforming growth factor beta1 in metastatic mammary adenocarcinoma cells: implications for tumor-immune escape.
Daroqui CM*, **Ilarregui JM***, Rubinstein N*, Salatino M*, Toscano MA, Vazquez P, Bakin A, Puricelli L, Bal de Kier Joffe E, Rabinovich GA.
Cancer Immunology and Immunotherapy 2006 Aug 10;
(*Estos autores contribuyeron por igual en este trabajo)

Regulated expression of galectin-1 after in vitro productive infection with Herpes simples virus type I: implications for T cell apoptosis.
Gonzalez MI*, Rubinstein N*, **Ilarregui JM**, Toscano MA, Sanjuan NA, Rabinovich GA.
International Journal of Immunopathology and Pharmacology 2005, Oct-Dec;18(4):615-23.
(*Estos autores contribuyeron por igual en este trabajo)

Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival. Involvement of alternative MAPK-pathways.
Fernández GC*, **Ilarregui JM***, Rubel C*, Toscano MA, Gómez S, Beigier-Bompadre M, Isturiz MA, Rabinovich GA, Palermo MS.
Glycobiology 2005 May;15(5):519-27.
(*Estos autores contribuyeron por igual en este trabajo).

Regulated expression of galectin-1 during T cell activation involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase and p70^{S6} kinase.
Fuertes MB, Molinero LL, Toscano MA, **Ilarregui JM**, Rubinstein N, Fainboim L, Zwirner NW, Rabinovich GA.
Molecular and Cell Biochemistry 2004 Dec; 267(1-2):177-85.

Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell mediated rejection: a potential mechanism of tumor immune privilege.
Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, **Ilarregui JM**, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer OL, Rabinovich GA.
Cancer Cell 2004 Mar;5(3):241-51.

III. REVISIONES EN LAS CUALES PARTICIPÉ DURANTE EL TRANSCURSO DE ESTA TESIS

The coming of age of galectins as immunomodulatory agents: impact of these carbohydrate binding proteins in T cell physiology and chronic inflammatory disorders.
Ilarregui JM, Bianco GA, Toscano MA, Rabinovich GA.
Annals of the Rheumatic Diseases 2005 Nov;64 Suppl 4:iv96-103

Integrating the universe of regulatory cells in cancer: a major hurdle for successful immunotherapy.
Ilarregui JM, Croci DO, Salatino M, Bianco GA, Toscano MA, Rabinovich GA.
Medicina (Buenos Aires) 2007; 67:25-31.

Galectin-1 as a potential therapeutic target in autoimmune disorders and cancer.
Salatino M, Croci DO, Bianco GA, **Ilarregui JM**, Toscano MA, Rabinovich GA.
Expert Opinion on Biological Therapy 2008 Jan;8(1):45-57

Dissecting the pathophysiologic role of endogenous lectins: Glycan-binding proteins with cytokine-like activity?
Toscano MA, **Ilarregui JM**, Bianco GA, Campagna L, Croci DO, Salatino M, Rabinovich GA.
Cytokine and Growth Factor Reviews 2007 Feb-Apr;18(1-2):57-71

Roles of galectins in chronic inflammatory microenvironments.
Parsonage G, Trebilcock E, Toscano MA, Bianco GA, **Ilarregui JM**, Buckley CD, Rabinovich GA.
Future Rheumatology, Aug 2006, Vol. 1, No. 4, Pages 441-454.

How do protein-glycan interactions regulate T-cell physiology?
Toscano MA, **Ilarregui JM**, Bianco GA, Rubinstein N, Rabinovich GA.
Medicina (Buenos Aires) 2006;66(4):357-62

Impact of protein-glycan interactions in the regulation of autoimmunity and chronic inflammation.
Bianco GA, Toscano MA, **Ilarregui JM**, Rabinovich GA.
Autoimmunity Reviews 2006 May;5(5):349-56.

The sweet kiss of death: a link between galectin-1, glycosylation and the generation of immune privilege.
Rubinstein N, Toscano MA, **Ilarregui JM,** Bianco GA, Rabinovich GA.
Trends in Glycoscience & Glycotechnology. 2005; 17:133-143.

The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response.
Rubinstein N, **Ilarregui JM,** Toscano MA, Rabinovich GA.
Tissue Antigens 2004 Jul;64(1):1-12.

Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: novel regulators of innate and adaptive immune responses.
Rabinovich GA, Toscano MA, Rubinstein N, **Ilarregui JM.**
Glycoconjugate Journal 2004 Aug-Sep;19(7-9):565-73.

Galectin-1 in inflammatory microenvironments: conveying glycan-information into T cell and dendritic cell-homeostatic programs.
Rabinovich GA, **Ilarregui JM**.
Immunology Reviews, en prensa 2009

10. AGRADECIMIENTOS

ESTA TESIS FUE POSIBLE GRACIAS A:

Gaby por saber ser director, mentor o compañero según las circunstancias. Por enseñarnos y darnos el ejemplo en que siempre es mejor dar el máximo y hacerlo con pasión. Por la extrema generosidad en lo laboral y en lo personal, y su permanente apoyo y estímulo.

Mart, Ger, Diego y Marian por ser los mejores compañeros que alguien podría tener. Por ayudarme en el día a día y bancarme los días "*nono*".

Juan-K, Sandra y el Tucu por hacer las cosas más fáciles, que no es poco.

Norberto, Vicky, Caro, Lucas y Danián, por los años, el afecto y el compañerismo compartido.

Al laboratorio de Jorge Geffner en la Academia Nacional de Medicina, en especial Jorge y Mónica por la ayuda y la paciencia!

La gente del Lab Satz por los años y *afters* compartidos, y a la gente del IByME por recibirnos tan bien.

CONICET y Fundación Sales por el apoyo económico.

Inmunogenética y el IByME por el espacio.

Fer, mi ***amiga***, por el aguante, la ayuda y su honestidad brutal.

Mis amigos de la facultad Caro, Gero, Juli, María, Maru, Pablo, Pipi y Vero, por esos años, por las salidas y por los días de congresos.

Mi familia María Silvia, Carlos Mario, Sebastián y Juan José, por la libertad y el ejemplo que me dieron.