



# Contribució de la proteïna circulant sCD40L i dels inhibidors solubles del complement en el desenvolupament del procés immunoinflamatori

Rut Olivar Miró

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



# Contribució de la proteïna circulant sCD40L i dels inhibidors solubles del complement en el desenvolupament del procés immunoinflamatori

Rut Olivar Miró

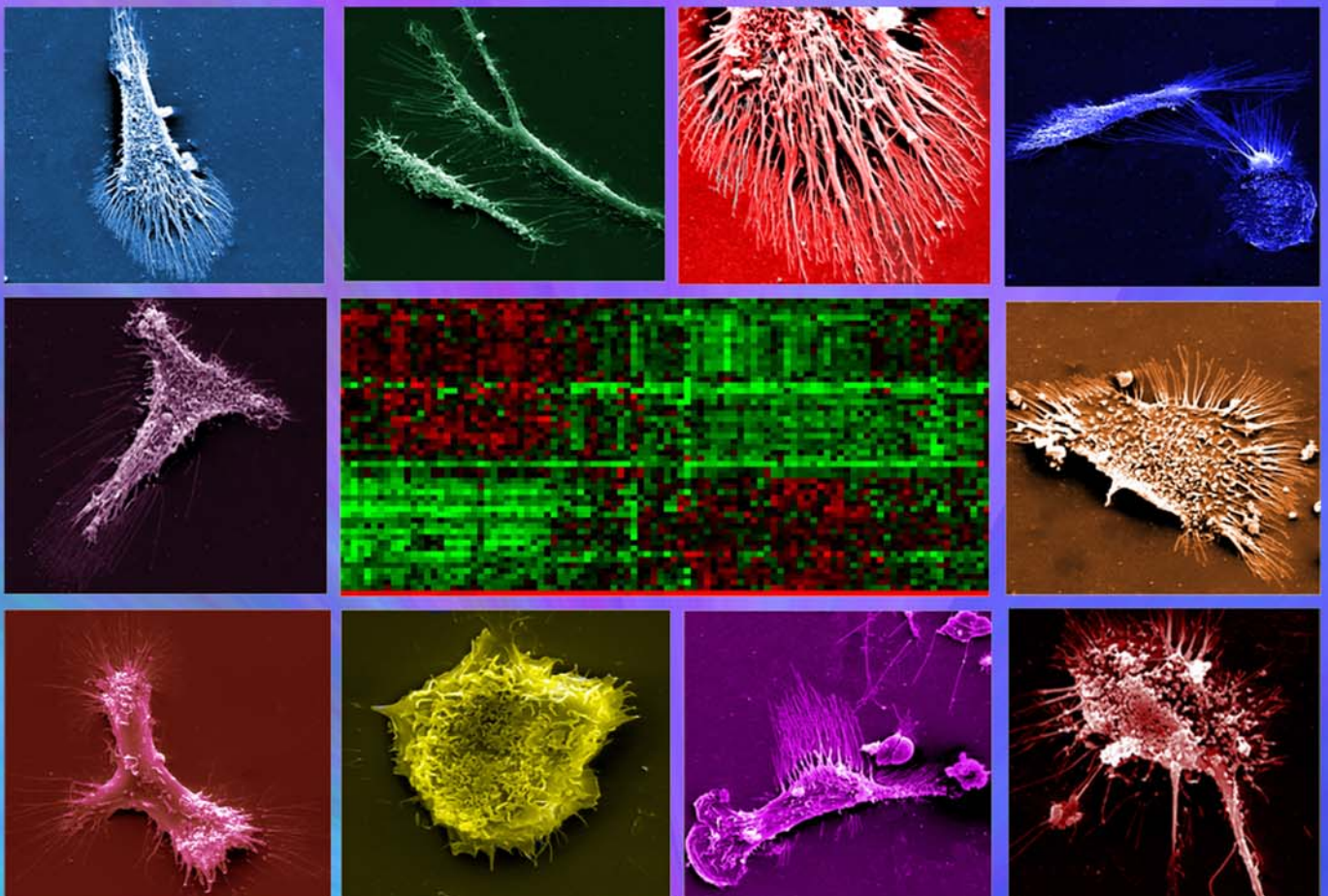
**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Tesi Doctoral

# CONTRIBUCIÓ DE LA PROTEÏNA CIRCULANT sCD40L I DELS INHIBIDORS SOLUBLES DEL COMPLEMENT EN EL DESENVOLUPAMENT DEL PROCÉS IMMUNOINFLAMATORI



Rut Olivar Miró  
2011





# **Contribució de la proteïna circulant sCD40L i dels inhibidors solubles del complement en el desenvolupament del procés immunoinflamatori**

Memòria presentada per

**Rut Olivar Miró**

per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció del Dr. Josep M<sup>a</sup> Aran Perramon, al Centre de Genètica Mèdica i Molecular de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge-IDIBELL.

Tesi adscrita al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. Programa de Genètica (bienni 2005-2007).

El director,

El tutor,

Dr. Josep M<sup>a</sup> Aran Perramon

Daniel Grinberg Vaisman

L'autora,

Rut Olivar Miró

Barcelona 2011



## Agraïments

Abans de començar voldria agrair a tots els que m'heu ajudat d'alguna manera en la realització d'aquesta tesi doctoral.

Primer de tot al meu director de tesi, Josep M<sup>a</sup> Aran per donar-me la primera oportunitat, permetre'm l'entrada en aquest món i guiar-me en el meu treball.

A la meva companya, la Raquel Pluvinet. Que puc dir que no t'hagi dit ja, moltíssimes gràcies per ensenyar-me tot el que sé, per compartir tots aquests anys dins i fora del laboratori i per seguir sent la meva companya i la meva amiga encara que ja no treballem juntes. Sé que sempre podré comptar amb tu.

Al Josep Quer i a la Maria del grup de Malalties Hepàtiques de l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron per l'ajuda tècnica al llarg de la meva recerca.

Als components del grup del LIRAD dirigit pel Francesc Borràs de la Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, la Mar, la Dàlia, la Bego, la Patrícia i la Carla per ajudar-me en la meva etapa final i obrir-me els braços en el seu grup.

A les meves nenes del laboratori, la Raquel, la Sandra, l'Eva P i la Meri, no sé que faria sense vosaltres. Gràcies per recolzar-me i per tots els bons moments dins i fora del laboratori.

A tots els companys i companyes de l'IRO-IDIBELL que estan i que ja no estan, tant doctors, predocs, postdocs com tècnics. Gràcies per donar-me suport i ànims, pels somriures, les xerrades i els bons moments.

Als meus amics i amigues per la seva amistat incondicional, per aconsellar-me, animar-me en els moments de flaqueza i per estar sempre allà: la Irene, la Meri, la Sònia, la Núria, la Laura, l'Eva R, la Meri M, el Jordi S, el Jordi G, l'Olga, la Montse, la Sue, el Carlos, el Joan, el Rubs, el Maté, el Luís, la Sandra, el Javi, l'Héctor i la Maite.

Als companys de la farmàcia Imma Soler Cuyàs, la Pepa, el Josep M<sup>a</sup>, la Jana, la Meri, l'Eulàlia, l'Eva...Som una gran pinya!!!

Al Jordi, per estar al meu costat com a amic i com a parella, sobretot en aquests últims temps, els més durs. Gràcies pel teu suport, per animar-me i treure'm un somriure en els mals moments i per la teva versió alternativa de la tesi que sempre em fa riure.

I en especial a la meva família, als meus pares, Ramón i Joana; germans, Carmen, David i Jordi; cunyades, Gemma i Yasmina; nebot i nebodes, David, Mireia, Sara i Laia, per animar-me a intentar trobar el que realment volia fer, per la vostra comprensió i la vostra paciència, per entendre que sobretot en els últims moments no us he pogut dedicar el temps que mereixeu. Sense vosaltres no hagués estat possible arribar fins aquí.

Moltes gràcies a tots!!!!





<b>ABREVIATURES.....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>7</b>
1.1. EL SISTEMA IMMUNE.....	9
1.2. PROCESSOS IMMUNOINFLAMATORIS .....	10
1.2.1. <i>RESPOSTA IMMUNE INNATA, NATURAL O INESPECÍFICA</i> .....	10
1.2.2. <i>RESPOSTA IMMUNE ADQUIRIDA, ADAPTATIVA O ESPECÍFICA</i> .....	11
1.2.2.1. Resposta immune mitjançada per cèl·lules.....	11
1.2.2.2. Resposta immune humoral .....	11
1.3. EL SISTEMA DEL COMPLEMENT .....	13
1.3.1. <i>LA CASCADA DEL COMPLEMENT</i> .....	14
1.3.1.1. Activació del complement: amplifiació, progressió i regulació .....	14
1.3.1.1.1. Inici de l'activació del complement.....	16
1.3.1.1.2. C3 convertasa i amplifiació.....	16
1.3.1.1.3. C5 convertasa.....	17
1.3.1.1.4. La via terminal o lítica. Formació del complex d'atac de membrana.....	18
1.3.2. <i>RECEPTORS PER A FACTORS DEL COMPLEMENT</i> .....	19
1.3.3. <i>FUNCIONS DEL COMPLEMENT</i> .....	19
1.3.4. <i>PATOLOGIES ASSOCIADES AL SISTEMA DEL COMPLEMENT</i> .....	21
1.3.5. <i>MECANISMES DE REGULACIÓ DEL COMPLEMENT</i> .....	22
1.3.5.1. Distribució dels reguladors del complement.....	23
1.3.5.2. Expressió dels reguladors del complement.....	25
1.3.5.3. C4BP ( <i>C4b-binding protein</i> ).....	27
1.3.5.3.1. Estructura de C4BP.....	27
1.3.5.3.2. Biosíntesi i regulació de C4BP .....	28
1.3.5.3.3. Funcions de C4BP en relació a la seva estructura. Localització dels llocs d'unió per C4b i C3b .....	29
1.3.5.4. Factor H.....	31
1.3.5.4.1. Estructura del gen CFH.....	31
1.3.5.4.2. Estructura del Factor H .....	32
1.3.5.4.3. Expressió del Factor H. Factor H i proteïnes relacionades.....	32
1.3.5.4.4. Regulació del complement pel Factor H.....	34
1.3.5.4.5. Malalties associades al Factor H.....	34
1.4. TIPUS CEL·LULARS QUE INTERVENEN EN LA RESPOSTA IMMUNE- INFLAMATÒRIA .....	36

## Índex

1.4.1. CÈL·LULES ENDOTELIALS .....	36
1.4.1.1. Funcions de l'endoteli vascular .....	36
1.4.1.1.1. Immunitat innata .....	37
1.4.1.1.2. Immunitat adquirida.....	37
1.4.1.1.3. Coagulació .....	37
1.4.1.1.4. Angiogènesi .....	37
1.4.1.1.5. Mecanisme d'inflamació.....	38
1.4.2 CÈL·LULES IMMUNES .....	43
1.4.2.1 Limfòcits .....	43
1.4.2.2 Cèl·lules dendrítiques.....	45
1.4.2.2.1. Origen i classificació de les cèl·lules dendrítiques .....	46
1.4.2.2.2. Fenotip de les cèl·lules dendrítiques .....	48
1.4.2.2.3. Lligam entre la captura d'antigen, la migració i la maduració .....	50
1.4.2.2.4. Interacció Cèl·lula Dendrítica-Limfòcit T .....	58
1.4.2.2.5. Les cèl·lules dendrítiques com a inductores de tolerància.....	60
1.5. CD40-CD40L, NEXE ENTRE LA IMMUNITAT INNATA I LA IMMUNITAT ADQUIRIDA.....	63
1.5.1 CARACTERÍSTIQUES DEL CD40 I DEL CD40L.....	63
1.5.1.1 CD40 .....	63
1.5.1.1.1 Estructura de CD40.....	63
1.5.1.1.2 Expressió de CD40 .....	64
1.5.1.2. CD40 L.....	65
1.5.1.2.1 Estructura del CD40L .....	65
1.5.1.2.2 Expressió de CD40L .....	66
1.5.1.2.3. Altres potencials lligands de CD40.....	66
1.5.1.3 Transducció de senyals de CD40 .....	67
1.5.1.4 Funcions biològiques de CD40-CD40L .....	68
1.5.1.5. Interacció CD40-CD40L en cèl·lules presentadores d'antigen. Un procés clau en la regulació de la resposta immunoinflamatòria.....	69
<b>2. ANTECEDENTS.....</b>	<b>75</b>
<b>3. OBJECTIUS.....</b>	<b>81</b>
<b>4. MATERIALS I MÈTODES.....</b>	<b>85</b>
4.1. LÍNIES CEL·LULARS I CULTIUS.....	87
4.2. COMPTATGE CEL·LULAR .....	87

4.3. CRIOPRESERVACIÓ DE LES CÈL·LULES .....	88
4.4. DESCONGELACIÓ DE CÈL·LULES CRIOPRESERVADES .....	88
4.5. CÈL·LULES ENDOTELIALS HUVEC .....	88
4.5.1. ESTIMULACIÓ D'HUVEC AMB CÈL·LULES JURKAT D1.1 O LA PROTEÏNA CD40L.....	88
4.5.2. DISSENY DEL siRNA anti-CD40 .....	89
4.5.3. TRANSFECCIÓ DE siRNAs.....	89
4.5.3.1. Electroporació del cultiu primari de cèl·lules HUVEC.....	90
4.6. CÈL·LULES DENDRÍTIQUES .....	90
4.6.1. OBTENCIÓ I PURIFICACIÓ DE CÈL·LULES DENDRÍTIQUES .....	91
4.6.1.1. Obtenció i purificació dels monòcits: obtenció de cèl·lules mononucleades .....	91
4.6.1.2. Diferenciació de monòcits a cèl·lules dendrítiques .....	96
4.6.1.3. Maduració de cèl·lules dendrítiques immadures a cèl·lules dendrítiques madures.....	97
4.6.2. EFECTE DE C4BP EN LA MADURACIÓ I DIFERENCIACIÓ DE LES CÈL·LULES DENDRÍTIQUES.....	97
4.6.2.1. Assaig de <i>Binding</i> .....	97
4.6.2.2. Efecte en la diferenciació .....	98
4.6.2.3. Efecte en la maduració .....	99
4.6.2.4. Efecte en la diferenciació i maduració.....	99
4.6.2.5. Medició de citoquines en el medi extracel·lular .....	101
4.6.3. EFECTE DEL FACTOR H EN LA MADURACIÓ I DIFERENCIACIÓ DE LES CÈL·LULES DENDRÍTIQUES.....	102
4.6.3.1. Efecte en la diferenciació .....	102
4.6.3.2. Efecte en la maduració .....	103
4.6.3.3. Efecte en la diferenciació i maduració.....	104
4.6.4. MICROSCOPIA ELECTRÒNICA D'ESCOMBRATGE .....	104
4.6.5. AVALUACIÓ DE LA CAPACITAT ENDOCÍTICA DE LES CDs.....	105
4.6.6. ASSAIG DE QUIMIOTAXIS .....	106
4.6.7. ESTUDIS D'APOPTOSI.....	106
4.6.7.1. Detecció d'Annexin V/7-ADD .....	107
4.6.8. PROLIFERACIÓ DE LIMFÒCITS AUTÒLEGS.....	108
4.6.8.1. Obtenció de limfòcits T CD3 <sup>+</sup> de sang perifèrica.....	108

## Índex

4.6.8.2. Marcatge intracel·lular dels limfòcits T amb CFSE .....	109
4.6.8.3. Enfrontament limfòcit-cèl·lula dendrítica .....	111
4.6.9. <i>CITOMETRIA DE FLUX I ANÀLISI DE LES DADES</i> .....	112
4.6.9.1. Citometria de flux .....	113
4.6.9.2. Anàlisi de dades .....	116
4.7. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA MITJANÇANT PCR A TEMPS REAL O qRT-PCR .....	116
4.7.1. <i>EXTRACCIÓ DE RNA TOTAL</i> .....	118
4.7.2. <i>RETROTRANSCRIPCIÓ O TRANSCRIPCIÓ REVERSA (RT)</i> .....	119
4.7.3. <i>PCR SEMIQUANTITATIVA A TEMPS REAL</i> .....	119
4.7.3.1. Quantificació de l'expressió de CD40 humà .....	120
4.7.3.2. Validació de l'expressió gènica obtinguda per microarrays .....	120
4.7.3.3. Quantificació del marcador de maduració de les cèl·lules dendrítiques CCR7 .....	124
4.7.3.4. Quantificació dels gens IDO/BIC-1/SOD-2 en les cèl·lules dendrítiques .....	124
4.8. DETERMINACIÓ DE PERFILS D'EXPRESSIÓ GÈNICA .....	124
4.8.1. <i>CLASSES DE MICROARRAYS D'EXPRESSIÓ</i> .....	125
4.8.2. <i>DISSENY DE L'EXPERIMENT DE MICROARRAYS</i> .....	126
4.8.3. <i>CLUSTERING</i> .....	128
4.8.4. <i>ANOTACIÓ FUNCIONAL</i> .....	129
4.9. ANÀLISI ESTADÍSTIC .....	129
<b>5. RESULTATS</b> .....	<b>131</b>
5.1. CÈL·LULES ENDOTELIALS HUVEC .....	133
5.1.1. <i>ESTIMULACIÓ D'HUVEC AMB CÈL·LULES JURKAT D1.1 O PROTEÏNA sCD40L</i> .....	133
5.1.2. <i>DETERMINACIÓ DE PERFILS D'EXPRESSIÓ GÈNICA</i> .....	135
5.1.3. <i>CLASSES DE MICROARRAYS D'EXPRESSIÓ</i> .....	136
5.1.4. <i>VALIDACIÓ DELS RESULTATS DE MICROARRAYS PER qRT-PCR</i> ..	143
5.1.4.1. Anàlisi de les dades de Microarrays .....	146
5.2. CÈL·LULES DENDRÍTIQUES .....	152
5.2.1. <i>CARACTERITZACIÓ DE LES POBLACIONS DE MONÒCITS I CÈL·LULES DENDRÍTIQUES</i> .....	152
5.2.1.1. Caracterització fenotípica de les Cèl·lules Dendrítiques .....	153

5.2.1.2. Avaluació de la capacitat endocítica .....	156
5.2.1.3. Avaluació del marcador de maduració CCR7 .....	157
5.2.2. EFECTE DE LES ISOFORMES DE LA PROTEÏNA PLASMÀTICA PURIFICADA C4BP ( $\alpha7\beta1$ I $\alpha7\beta0$ ) I DE LA PROTEÏNA RECOMBINANT C4BP $\alpha$ ( $re\alpha6\beta0$ ), EN LA MADURACIÓ I DIFERENCIACIÓ DE LES CÈL·LULES DENDRÍTIQUES .....	158
5.2.2.1. Assaig de Binding .....	159
5.2.2.2. Efecte en la diferenciació .....	160
5.2.2.3. Efecte en la maduració .....	162
5.2.2.4. Efecte en la diferenciació i maduració.....	165
5.2.2.5. Perfil transcripcional .....	172
5.2.2.6. Medició de citoquines en el medi extracel·lular .....	174
5.2.2.7. Microscopia d'escombratge .....	176
5.2.2.8. Assajos funcionals .....	178
5.2.3. EFECTE DELS MUTANTS DE LA CADENA $\alpha$ DE LA PROTEÏNA C4BP ( $\alpha7\beta0$ ) EN LA MADURACIÓ I DIFERENCIACIÓ DE LES CÈL·LULES DENDRÍTIQUES .....	186
5.2.3.1. Efecte en la diferenciació i maduració.....	186
5.2.3.2. Perfil transcripcional .....	189
5.2.3.3. Mesura de citoquines en el medi extracel·lular.....	190
5.2.3.4. Microscopia d'escombratge .....	191
5.2.4. EFECTE DEL FACTOR H EN LA MADURACIÓ I DIFERENCIACIÓ DE LES CÈL·LULES DENDRÍTIQUES .....	193
5.2.4.1. Efecte en la diferenciació .....	193
5.2.4.2. Efecte en la maduració.....	195
5.2.4.3. Efecte en la diferenciació i maduració.....	198
5.2.4.4. Perfil transcripcional .....	201
5.2.4.5. Microscopia d'escombratge .....	202
5.2.4.6. Assajos funcionals .....	203
<b>6. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>211</b>
6.1. CÈL·LULES ENDOTELIALS HUVEC .....	213
6.1.1. Inhibició de l'expressió de CD40 mitjançant un siRNA-antiCD40 en cèl·lules endotelials HUVEC .....	214

## Índex

6.1.2. <i>Anàlisi del perfil d'expressió gènica en cèl·lules endotelials activades via sCD40L utilitzant microarrays</i> .....	214
6.2. CÈL·LULES DENDRÍTIQUES .....	224
6.2.1. <i>Cèl·lules dendrítiques i els reguladors del sistema del complement</i> .....	226
6.2.2. <i>Cèl·lules dendrítiques i trasplantament</i> .....	244
<b>7. CONCLUSIONS</b> .....	<b>249</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>255</b>







---

## **ABREVIATURES**



## Abreviatures

aa: Aminoàcid	EDTA: Àcid etilendiaminotetraacètic
Ac: Anticòs	ERK: Quinasa regulada per senyals extracel·lulars
Ag: Antigen	FB: Factor B
AP-1: Proteïna activadora-1	FBS: <i>Fetal Bovine Serum</i>
APCs: Cèl·lules presentadores d'antigen	FITC: Fluoresceïna
APC: <i>Allophycocyanin</i>	FH: Factor H
APLN: Apelin	GM-CSF: Factor de creixement de colònies de granulomacrofàgiques
BSA: <i>Bovine serum albumin</i>	HLA-DR: <i>Human leukocyte antigen-DR</i> (HLA class-II)
CCP: <i>Complement control protein</i>	HSC: <i>Hematopoietic stem cells</i>
CCL: <i>Chemokine (C-C) ligand</i>	HSP: Proteïna d'estress tèrmic
CCR: <i>CC chemokine receptor</i>	HUVEC: <i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
CD: Cèl·lula dendrítica	ICAM-1: Molècula d'adhesió intercel·lular
CDi: CDs immadures	ICOSL: <i>Inducible costimulator ligand</i>
CDm: CDs madures	IDO, INDO: <i>Indoleamin-2,3 dioxygenase</i>
CDmi: CDs mileoides	Ig: Immunoglobulina
CDp: CDs plasmacitoides	IFN: Interferó
CLR: Receptor de tipus lectin-C	IFNGR: Receptor de l'IFN- $\gamma$
CpG: <i>Cytosine linked to a guanine by a phosphate bond</i>	IL: Interleuquina
CR: Receptors del complement	IRF: Factor regulador d'interferó
COX-2: Ciclooxygenasa-2	JAK3: <i>Janus quinase 3</i>
CFHR1: <i>Complement factor H-related protein</i>	JNK: Quinasa c-Jun aminoterminal
CR: Receptor del complement	kDa: Quilodalton
CRIg: Receptor de la superfamília de les immunoglobulines	KYNU: Kinureninasa
CTL: Limfòcits T citotòxics	LAK: Cèl·lules agressores activades per limfoquines
CTLA-4: <i>Cytotoxic T lymphocyte-associated 4</i>	LAT-1: <i>Large neutral amino acid transporter</i>
CRP: Proteïna C reactiva	LFA: Antigen de funció limfocitària
C1INH: Inhibidor de la C1 esterasa	LPS: Lipopolisacàrid
C1qR: <i>Complement component C1q receptor</i>	MAC: <i>Membrane attack complex</i>
C4BP: <i>C4b-binding protein</i>	MAPK: Proteïna quinasa activada per mitògens
C4BPA: Cadena alfa de C4BP	MBL: <i>Mannose-binding lectin</i>
C4BPB: Cadena beta de C4BP	MCP: <i>Membrane cofactor protein</i>
CD40L: Lligand de CD40	MCP-1: Proteïna quimiòtica de monòcits
CypA: Ciclofilina	MHC: Complex major d'histocompatibilitat
C9orf5: <i>Chromosome 9 open reading frame 5</i>	mCD40L: Lligand de membrana de CD40
DAF: <i>Decay accelerating factor</i>	MFI: <i>Median Fluorescence Intensity</i>
DC-SIGN: <i>Dendritic cell-specific ICAM3 grabbing non-integrin</i>	MIP: Proteïna inflamatòria de macròfags
DMSO: Dimetil sulfòxid	MMP: Metal·loproteasa
DNA: Àcid desoxiribonucleic	mRNA: RNA missatger
	MRC1: <i>Macrophage mannose receptor 1</i> (CD206)

## Abreviatures

NFAT: Factor nuclear de cèl·lules T activades

NF- $\kappa$ B: Factor nuclear kappa B

NK: *Natural Killer*

NO: Òxid nítric

ODN: Oligonucleòtid

P: Properdina

PAF: Factor activador de plaquetes

PAMPs: *Pathogen associated microbial patterns*

PE: Ficoeritrina

PBMC: *Peripheral blood mononuclear cell*

PC: Proteïna C

PDL: *Programmed death ligand*

PGE2: Prostaglandina E2

PKC: Proteïna quinasa C

PMN: Polimorfonuclear

PRDX5: *Peroxiredoxin-5*

PRRs: *Pathern recognition receptors*

PS: Proteïna S

RCA: *Regulators of complement inhibitors*

RNA: Àcid ribonucleic

RNAi: Interferència de RNAi

RPMI: *Roswell Park Memorial Institut*

RT-PCR: *Real Time Polymerase Chain Reaction*

sCD40L: Lligand soluble de CD40

SELE: Selectina

SOD: Superòxid dismutasa

SNP: *Single nucleotide polymorphism*

STAT: Transductor de senyal i activador de la transcripció

Tc: Limfòcits T citotòxics

TCC: Complex terminal del complement

TCR: Receptor de cèl·lules T

TGF: *Transforming growth factor*

Th: Limfòcits T cooperadors o *helper*

TLR: *Toll like receptor*

TGF: Factor de creixement transformant

TMEM-49: *Transmembrane protein 49*

TNF: Factor de necrosi tumoral

TRAF: *TNF-R associated factor*

Treg: Limfòcits T reguladors

UTR: *Untranslated region*

VCAM-1: Molècula d'adhesió vascular

VDR: Receptor de vitamina D3

7-ADD: 7-amino-actinomycin





## **1. INTRODUCCIÓ**





## **1.1. EL SISTEMA IMMUNE**

El sistema immune és una organització sofisticada de molècules, cèl·lules i teixits que actuen conjuntament per protegir l'organisme front diferents patògens. La seva funció principal consisteix en evitar la colonització, multiplicació i invasió dels teixits per part de virus, bacteris, fongs, protozous i helmints. Està format per un compartiment innat clàssic i el més complex compartiment adaptatiu, l'últim restringit als vertebrats. Juntament amb el sistema nerviós, el sistema immune és el major sistema adaptatiu en l'organisme. Aquests dos sistemes actuen i interaccionen, amb el principal objectiu de mantenir l'homeòstasi.

El sistema immune ens protegeix de substàncies potencialment nocives en reconèixer-les i respondre front a elles. Aquestes substàncies, denominades antígens, estan presents en cèl·lules, bacteris, virus i fongs. En la primera línia de defensa està la immunitat innata, els components de la qual són:

1. Barreres físiques i químiques, tals com epitelis i substàncies produïdes en les superfícies epitelials;
2. Cèl·lules com neutròfils, macròfags, cèl·lules dendrítiques (CDs), cèl·lules citotòxiques naturals (NK) i limfòcits B;
3. Proteïnes sanguínies que inclouen el sistema del complement i altres mitjancers de la inflamació;
4. Proteïnes denominades citoquines que regulen i coordinen altres cèl·lules que participen en la immunitat cel·lular [1], s'activen en un període de temps molt curt abans que es produeixi la infecció i són capaces de produir una resposta ràpida front als microorganismes o antígens no específics.

En canvi, la immunitat adaptativa o adquirida, és un sistema de defensa més evolucionat que es desenvolupa després de l'exposició a l'agent infeccios o antigen específic per diversos mecanismes de reconeixement, la intensitat i capacitat de la qual depenen de l'exposició prèvia al microorganisme, incloent a cèl·lules T efectores  $CD4^+$  i  $CD8^+$  i limfòcits B. Aquestes cèl·lules es comuniquen per mitjà de citoquines, principalment interferó  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor*), altres interleuquines (ILs) i quimioquines, d'aquesta manera eliminen cèl·lules infectades o transformades [1, 2].

## Introducció

### **1.2. PROCESSOS IMMUNOINFLAMATORIS**

La resposta immune consisteix en el desencadenament dels mecanismes destinats a l'eliminació de patògens o material estrany. La resposta immune s'inicia amb el reconeixement de l'antigen pels limfòcits T i la posterior activació d'aquests, que requereix d'un primer senyal a través de la interacció entre el receptor de cèl·lules T (TCR) i el complex pèptid antigènic/pèptid del complex major d'histocompatibilitat (MHC-II) en les cèl·lules presentadores d'antigen (APCs) (incloent cèl·lules B, macròfags, monòcits, CD4 i cèl·lules endotelials). Un segon senyal coestimulador prové de la interacció entre receptors específics de la superfície de les cèl·lules T i els seus corresponents lligands en les APCs: CD40L i CD28 amb CD40 i B7.1 (CD80) o B7.2 (CD86) respectivament. Hi ha, doncs, dos senyals coestimuladors principals: el sistema CD28-B7 i el sistema CD40-CD40L [3].

La unió de CD40 amb la molècula CD40L participa, juntament amb CD28-B7, en la coestimulació de la cèl·lula T, i alhora, condueix a l'activació de les APCs a través de la inducció de la sobreexpressió de diferents molècules d'adhesió (E-selectina, V-CAM i ICAM), l'alliberament de citoquines proinflamatòries (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 i IL-12) i l'expressió, en la superfície cel·lular, de MHC-II, Fas i altres molècules coestimuladores com CD32, CD80 i CD86. Tot això, finalment, resulta en l'augment de la funció de presentació d'antigen per part d'aquestes cèl·lules.

Finalment es dona el tipus i la intensitat de resposta adequada per a l'eliminació o inactivació de l'agent infecciós.

Dins del procés de reacció front a patògens, la resposta immunitària per part de l'hoste es pot classificar en dos tipus: innata (natural o inespecífica) i adquirida (adaptativa o específica). Tanmateix, la resposta adquirida es pot dur a terme a través d'una resposta immune mitjançada per cèl·lules o mitjançant una resposta de tipus humoral. Aquests mecanismes immunes dependran del tipus d'agent, de les lesions que causa i del lloc on es produeix la infecció.

#### ***1.2.1. RESPOSTA IMMUNE INNATA, NATURAL O INESPECÍFICA***

Es desencadena al cap de poc temps de l'entrada de l'agent a l'organisme (minuts o hores) i predomina en les primeres fases d'una infecció, tenint una gran importància en la protecció sistèmica i local de l'organisme [4]. Està constituïda per les barreres físiques i agents químics no específics (pell, secrecions sebàcies, lisozim en la majoria de secrecions, mocs, tapís ciliar de la tràquea, àcid gàstric, secreció lacrimal, saliva, enzims proteolítics, histamina, àcids grassos, etc.), els factors solubles que recobreixen o inactiven inespecíficament patògens

(proteïnes del complement, de fase aguda), així com per cèl·lules (monòcits/macròfags, polimorfonuclears (PMN), cèl·lules citotòxiques (Tc), NK, etc.) que reconeixen inespecíficament als microorganismes o a cèl·lules que es troben infectades [5].

### **1.2.2. RESPOSTA IMMUNE ADQUIRIDA, ADAPTATIVA O ESPECÍFICA**

Aquest tipus de resposta depèn dels limfòcits T i limfòcits B, caracteritzats per l'especificitat per reconèixer antígens i la generació de memòria i per activar-se ràpidament en cas d'un posterior enfrontament al mateix agent. Consta d'una resposta primària, que és de baixa intensitat i de curta durada, i una resposta secundària, que es caracteritza per ser més ràpida, intensa i efectiva.

Dins del procés de la resposta específica pot distingir-se un component humoral, basat en la producció d'anticossos, i un component cel·lular, basat en mecanismes de citotoxicitat. Durant el desenvolupament de la resposta adaptativa front a un patògen, es sol desencadenar ambdós tipus d'immunitat, no obstant generalment una d'elles predomina sobre l'altra.

#### **1.2.2.1. Resposta immune mitjançada per cèl·lules**

La resposta mitjançada per cèl·lules es caracteritza per l'eliminació de l'agent estrany mitjançant l'acció directa de diferents tipus cel·lulars (monòcits/macròfags, PMN, NK, Tc, etc.) així com pels mecanismes d'inflamació, quimiotaxis, fagocitosi, citotoxicitat, alliberament de citoquines i presentació d'antigen, no intervenint, de manera determinant, ni els limfòcits B ni els anticossos. El procés de citotoxicitat mitjançada per cèl·lules pot ser, o no, restringida pel MHC segons el tipus de cèl·lules que intervinguin en ella. L'acció dels limfòcits CD8 sobre les cèl·lules infectades per patògens està determinada per l'expressió de MHC-I per part de les cèl·lules envaïdes, mentre les NK i les LAK (cèl·lules agressores activades per limfoquines) posseeixen la propietat de ser citotòxiques sense especificitat antigènica i sense la participació de MHC. Així mateix, cèl·lules citotòxiques que posseeixen receptors Fc per IgG, poden unir-se a les cèl·lules diana recobertes per aquesta i lisar-les, actuant de manera dependent dels anticossos [6].

#### **1.2.2.2. Resposta immune humoral**

La resposta de tipus humoral es caracteritza per la interacció entre antígens que es troben en l'espai tissular i els anticossos, procés que es dur a terme després de la cooperació entre els limfòcits T i els limfòcits B per a l'activació i diferenciació d'aquests últims. No obstant, la resposta de tipus humoral pot ser independent dels limfòcits T interaccionant directament les cèl·lules B amb els antígens. Un cop activades, les cèl·lules B es convertiran en

## Introducció

cèl·lules plasmàtiques formadores d'anticossos o bé en cèl·lules de memòria que romandran en l'organisme durant un llarg període de temps. D'aquesta manera es produeix un predomini de la resposta Th2 i l'activació i proliferació de diverses cèl·lules.

En la immunitat front patògens, els anticossos poden actuar per tres vies diferents. Es pot produir la unió d'aquests anticossos als patògens per prevenir la infecció de les cèl·lules, realitzant-se així la *neutralització*. Per altra banda, aquest recobriment dels microorganismes per part dels anticossos produeix l'*opsonització* dels mateixos per ser així reconegut pels receptors Fc específics de les cèl·lules fagocítiques, incrementant-se considerablement el procés de la fagocitosi. Alternativament, els anticossos units als patògens poden activar les proteïnes del sistema del *complement* per incrementar l'opsonització i la lisi d'alguns bacteris.

Malgrat que dins de tot el procés de la resposta immune específica existeix una especialització de cada una de les respostes (cel·lular i humoral), els components bàsics d'aquestes (cèl·lules i immunoglobulines) són necessàries per a l'elaboració d'una reacció immune efectiva, ja que malgrat que un tipus de resposta predomina sobre l'altra, en moltes ocasions ambdues col·laboren entre si. En molts casos la resposta humoral no podria realitzar-se amb èxit sense la resposta de tipus cel·lular sobre els microorganismes recoberts d'anticossos [6].

### **1.3. EL SISTEMA DEL COMPLEMENT**

El sistema del complement és una de les primeres línies de defensa de la immunitat innata. Es defineix com un sistema funcional d'unes 30 proteïnes del sèrum que interaccionen entre si de forma regulada formant una cascada enzimàtica, permetent una amplificació de la resposta humoral. És important tant per la integritat cel·lular i l'homeòstasi dels teixits com per modificar la resposta immune adaptativa [7, 8, 9, 10]. El sistema de complement activat reconeix i elimina microorganismes invasors mitjançant les activitats opsòniques, inflamatòries i lítiques, essent beneficiós per l'hoste sense una prèvia exposició a ells, ja que facilita l'eliminació de l'antigen i genera una resposta inflamatòria [11]. També contribueix a la regulació d'altres sistemes biològics, particularment la immunitat adaptativa. A més a més, el complement facilita l'eliminació de cèl·lules pròpies mortes o modificades, així com partícules apoptòtiques i restes cel·lulars. Les reaccions del complement individuals es desenvolupen d'una manera seqüencial, permetent la regulació que modula la intensitat de la resposta i ajusta les funcions efectores per donar lloc a una resposta immune específica.

El sistema del complement va ser identificat fa més de 100 anys, a finals del segle XIX per Ehrlich, com a resultat de la seva activitat bactericida complementària i el seu paper en la fagocitosi de restes cel·lulars. Però és Jules Bordet qui descobreix l'any 1895 aquest component caracteritzat front els anticossos per la seva termolabilitat. L'any 1907 Ferrata comença a caracteritzar alguns dels seus components recorrent a mètodes de diàlisi. Per motius merament cronològics, els components van anar rebent denominacions a base de nombres darrera de la lletra C conforme s'anaven descobrint. Per això, el seu ordre d'actuació no guarda en general relació amb la seva nomenclatura.

El sistema del complement activat dirigeix les funcions immunes efectores i modula la intensitat de la resposta d'una forma autocontrolada mitjançant una resposta immune efectora apropiada, la qual és necessària per al reconeixement i eliminació d'agents infecciosos o cèl·lules modificades del propi organisme. L'activació successiva del complement activa mediadors proinflamatoris, genera pèptids anafilàctics, components citolítics i antimicrobians, recluta cèl·lules efectores i indueix respostes efectores. Això dona lloc a una activació del complement moderada i controlada, la qual és beneficiosa per l'hoste en detriment del microorganisme invasor. Els aspectes beneficiosos d'un sistema del complement moderadament activat inclou la vigilància immune, l'eliminació de restes cel·lulars, la regeneració dels òrgans i la neuroprotecció. Aquestes funcions fisiològiques destaquen el paper del complement en la fisiologia i l'homeòstasi i demostra que la regulació apropiada i

## Introducció

l'activació equilibrada dirigida cap al lloc diana són crucials per mantenir el sistema del complement en el seu estat fisiològic apropiat.

### **1.3.1. LA CASCADA DEL COMPLEMENT**

La major part dels factors del complement són proteïnes plasmàtiques i una petita proporció d'elles són proteïnes de membrana (Taula 1). Molts dels components del complement (C2, C3, C4, C6, C7, C8, Factor B i Factor I) són polimòrfics, és a dir, que existeixen diferents formes al·lèliques que s'expressen amb diferents freqüències en poblacions o races.

L'hepatòcit és el principal productor dels factors del complement. No obstant, els components de C1 són sintetitzats per les cèl·lules epitelials de l'intestí i del sistema genito-urinari i els adipòcits sintetitzen Factor D. S'ha observat que els macròfags activats produeixen alguns factors del complement; tanmateix, això només té importància en el focus inflamatori. Les citokines inflamatòries (IL-1, IL-6 i TNF) i el IFN- $\gamma$  incrementen la síntesi d'alguns factors del complement al fetge.

#### **1.3.1.1. Activació del complement: amplificació, progressió i regulació**

En l'activació del complement es posen en marxa una sèrie de reaccions consecutives en cascada, de tal manera que en cada una d'elles, a partir d'un component inactiu es genera un producte actiu que, a més de determinar que la reacció consecutiva prossegueixi, pot tenir diferents accions biològiques importants en la defensa de l'organisme. Aquests components inactius s'anomenen zimògens que són una preforma inactiva d'una proteasa que per si mateixa li manca la funció proteolítica. Un cop processada o segmentada proteolíticament la proteïna mostra una activitat enzimàtica. L'ús d'aquestes preformes inactives permet dirigir l'activitat de la proteïna cap al lloc correcte en el moment correcte. Moltes proteïnes del complement, però també components de la cascada de coagulació i altres proteases, existeixen i circulen com preformes inactives i requereixen modificació i processament proteolític per ser convertides en les formes actives. Quan troben una superfície biològica, els zimògens inactius són estructuralment modificats, s'uneixen amb components addicionals i són convertits en compostos efectors o enzims actius que activen nous substrats, de manera que la cascada progressa. Aquesta activació seqüencial pot ser dividida en quatre passos principals: inici de l'activació del complement, activació de la convertasa C3 i amplificació, activació de la convertasa C5 i assemblatge del complex terminal del complement (TCC o MAC).

Un cop activada, la cascada del complement genera compostos efectors que són alliberats a qualsevol superfície d'una manera indiscriminada. No obstant, la progressió de la cascada i l'acció de les molècules efectores són estrictament controlades a cada nivell a través de múltiples reguladors i inhibidors del complement. Aquests reguladors discriminen entre superfícies pròpies o no pròpies, com per exemple cèl·lules – incloent cèl·lules pròpies modificades – teixits i agents infecciosos. Tals circuits de reguladors i inhibidors operen a cada nivell de la cascada i per tant són centrals en l'enteniment de l'acció del complement.

La primera reacció enzimàtica, la qual activa C3, està fortament controlada per assegurar que l'activació i la generació de compostos efectors biològicament actius tinguin lloc només en el lloc i en el temps apropiats. Si la cascada d'activació progressa, les reaccions s'amplifiquen i pot resultar en poderoses i potents funcions efectores. El sistema de complement té més de 60 components i fragments d'activació, que comprenen els nou components centrals de la cascada (C1 a C9), productes d'activació múltiples amb diverses activitats biològiques (per exemple C3a, C3b, C3i, C3d i C3dg), reguladors i inhibidors (per exemple Factor H, Proteïna de tipus factor H (*factor H-like protein*), *complement factor H-related protein 1* (CFHR1), CR1 (CD35), *C4b-binding protein* (C4BP), C1q i vibronectin), proteases i enzims formats recentment (factor B, factor D, C3bBb i C4bC2b) o receptors per molècules efectores (C3aR, C5aR, C5L2 i *complement component C1q receptor* (C1qR)).

El nombre de components coneguts d'aquesta xarxa, particularment reguladors i receptors, està contínuament augmentant i s'identifiquen noves funcions per aquestes proteïnes. Els principals factors del sistema del complement es mostren en la Taula 1.

TAULA 1. Principals factors del sistema del complement					
Factor	Cadenes	Algunes característiques	Factor	Cadenes	Algunes característiques
C1q	18 (6A,6B,6C)		C8	3 (a,b,g)	
Clr	1	E	C9	1	E
Cls	1	E	B	1	E
C2	1	E	D	1	
C3	2 (a,b)	M	P	4	Colectina
C4	3 (a,b,g)	M	MBP	18	E
C5	2 (a,b)	M	C4BP	1	
C6	1		FH	2 (a,b)	
C7	1				

E: Molècules amb activitat serina esterasa;

M: Molècules amb capacitat d'unir-se a la membrana cel·lular.



## Introducció

### **1.3.1.1.1. Inici de l'activació del complement**

El complement és activat per tres vies principals. La **via alternativa** és activada espontàniament i constantment en superfícies biològiques en el plasma i en molts o tots els altres fluids corporals. Aquesta acció espontània inicia fàcilment l'activació. Connecta amb el sistema d'immunitat natural o inespecífic, interaccionant directament amb la superfície del microorganisme. La **via clàssica** és provocada per un anticòs unit a l'antigen diana, de manera que connecta amb el sistema immune adaptatiu per mitjà de la seva interacció amb immunocomplexes. Però aquesta via també pot ser activada d'una forma independent a la unió de l'anticòs per virus i bacteris gram-negatius. La **via lectina** unida a manosa (*manose-binding lectin*, MBL) és iniciada per carbohidrats a la superfície microbial. És una espècie de variant de la ruta clàssica, que s'inicia sense necessitat d'anticossos i, per tant pertany al sistema de la immunitat natural.

L'activació de cadascuna d'aquestes vies resulta en l'assemblatge del primer enzim de la cascada, que s'anomena C3 convertasa. El complement també és activat per una via addicional *bypass* que actua independentment de C3 o *bypassa* la C3 convertasa i és mitjançada per trombina actuant sobre la C5 convertasa.

### **1.3.1.1.2. C3 convertasa i amplificació**

#### **a) La via clàssica**

La via clàssica s'inicia després de la unió antigen-anticòs (Ag-Ac). Els anticossos solubles o lliures i els complexos Ag-Ac solubles no connectats amb membranes no activen el complement, aquest sistema només s'activa quan es formen complexos Ag-Ac sempre i quan aquests complexos estiguin integrats en la mateixa superfície (membrana cel·lular). La via clàssica comença per activació del complex C1 desencadenant una sèrie de reaccions enzimàtiques que finalitzen amb la formació de la convertasa C3 de la via clàssica (complex C4b2a) el qual més tard s'unirà a C4b2b per formar la convertasa C5 (C4b2a3b). Aquesta via està controlada per l'inhibidor de C1, i la convertasa C3 pot ser inhibida pel factor DAF (*Decay accelerating factor* o factor accelerador de la degradació).

#### **b) Via alternativa**

Aquesta via és més antiga, des del punt de vista evolutiu, que la clàssica, diferenciant-se d'aquesta en que la via alternativa no necessita anticossos per activar-se [12], per la qual cosa és un mecanisme de defensa important en els estadis inicials de la infecció quan encara no s'han sintetitzat quantitats importants d'anticossos. Funciona de forma contínua a un baix

nivell i solament en presència de determinats factors s'amplifica. Per això, podem distingir dues situacions per a la via alternativa:

-En estat de repòs: en condicions normals, en el plasma, el factor C3 s'escindeix contínuament i de forma lenta, donant lloc a C3b, que té una vida mitja molt curta.

-En estat d'activació: quan C3b s'uneix a les membranes de bacteris, fongs i paràsits.

Aquesta via porta a la formació de la convertasa C3 de la via alternativa C3bBb que és produïda en el fetge. Aquesta convertasa allibera més factor C3b que en formar C3bBb3b retroalimenta el circuit i aconsegueix la seva amplificació. El complex C3bBb3b a més pot actuar sobre C5 (C3bBb3b és la convertasa de C5 de la via alternativa) hidrolitzant-lo en C5a i C5b i iniciar la via lítica que duu a la lisi dels gèrmens.

La properdina (P) és una proteïna constituïda per 4 subunitats aparentment idèntiques associades entre si de manera no covalent. Aquest factor s'uneix al complex C3bBb, que és làbil, donant lloc a C3bBbP que és més estable, això contribueix a l'amplificació. El factor C3b generat en la via clàssica també pot amplificar la via alternativa, suposant aquest fenomen un mecanisme de connexió entre ambdues vies.

### **C) La via de la lectina**

La via de la lectina és homòloga a la via clàssica, però amb l'opsonina, MBL, i ficolines, en comptes de C1q. Aquesta via és activada per la unió de MBP (*manosa binding protein*) a residus de manosa a la superfície patògena i dóna lloc a la formació de la convertasa C3 (C4b2a), com en la via clàssica. Les ficolines són homòlogues a MBL i funcionen d'una manera similar [9].

#### **1.3.1.1.3. C5 convertasa**

El complex C4b2a actua sobre el factor C3 que es transforma per proteòlisi en dos fragments actius: l'anafilotoxina C3a, que potencia la inflamació en induir la desgranulació dels basòfils i mastòcits i alliberar, per tant, mediadors de la inflamació, i el fragment C3b que s'uneix a la membrana cel·lular facilitant d'aquesta forma el procés de la fagocitosi (opsonització).

Això genera C3bBbC3b, la convertasa C5 per la via alternativa, o C4b2bC3b, la convertasa C5 per les vies clàssica i lectina. Ambdós enzims parteixen el C5 en C5a i C5b. C5a és un poderós pèptid anafilàctic i el fragment C5b pot iniciar la via terminal. La inflamació induïda per C5a i la via terminal iniciada per C5b semblen estar regulades de forma separada.

## Introducció

### 1.3.1.1.4. La via terminal o lítica. Formació del complex d'atac de membrana

Els enzims convertases de C5 (C4b2a3b i C3bBb3b), formats ja sigui en la via clàssica, en l'alternativa o de la lectina, actuen fixant el factor C5 a C3b, que és escindit pels factors amb activitat esterasa (C2a o Bb) en 2 fragments, l'anafilotoxina C5a i el fragment C5b el qual s'uneix a les fraccions C6, C7, C8 i C9 formant el complex d'atac a la membrana (C5b6789, *membrane attack complex* o MAC). El complex MAC penetra a la membrana, donant origen a la formació de canals hidrofílics, que permeten el lliure intercanvi de sodi i aigua amb l'exterior de la cèl·lula, provocant la lisi osmòtica de la cèl·lula atacada.

S'han descrit funcions addicionals per MAC com l'activitat estimulante en la polarització de cèl·lules T col·laboradores, un paper per C7 unit a la membrana com un destí final pels components del complement retardats per controlar la inflamació excessiva induïda per MAC soluble i un paper de MACs solubles en l'activitat activant de plaquetes.

Una vegada produïda l'activació del complement, tota la sèrie de reaccions subsegüents es duen a terme per un procés multiplicador, de tal manera que, encara que l'activació comença per un nombre limitat de molècules, són molts els factors amb activitat biològica que apareixen en el curs de les reaccions. L'acció de les molècules pot ser local, al lloc de la seva producció, però també pot exercir-se a distància per dispersió a altres zones. Un esquema general de les reaccions del complement en el seu conjunt és complex (Figura 1).

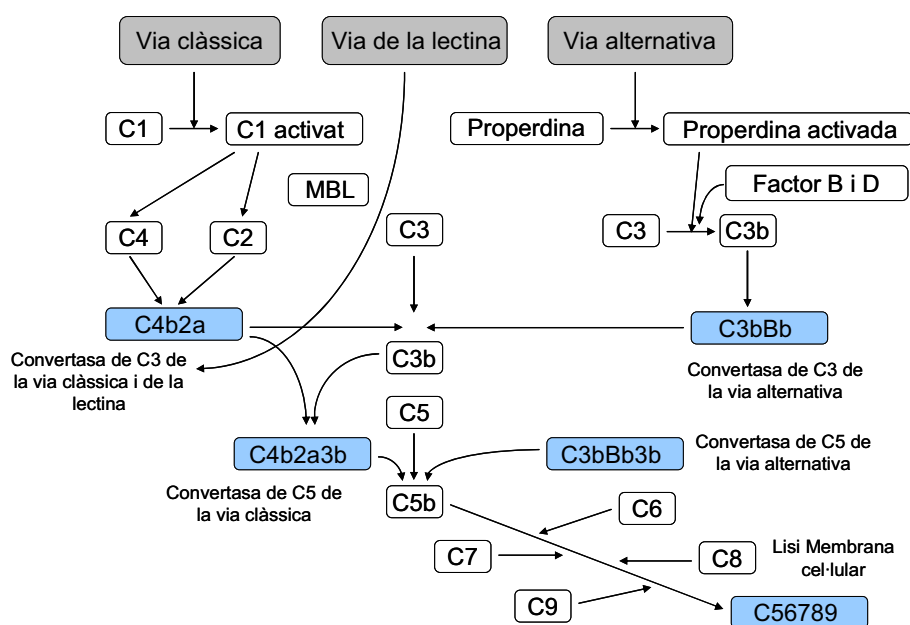


Figura 1. Esquema de les vies de la cascada del complement. La via clàssica s'activa per complexos Ag-Ac mentre que la via alternativa s'activa per gèrmens. La via de la lectina conflueix amb la via clàssica a nivell de la convertasa del C3 (modificada de E. García Olivares, [www.inmunologiaenlinea.es](http://www.inmunologiaenlinea.es) [13]).

### 1.3.2. RECEPTORS PER A FACTORS DEL COMPLEMENT

Moltes de les funcions del complement es duen a terme després de la unió de fragments d'alguns factors del complement a receptors específics presents en la superfície de diversos tipus cel·lulars (Taula 2). Els més coneguts dels quals tenen com lligand a fragments de C3.

TAULA 2. Receptors del complement, els seus lligands i les seves funcions			
Receptor: nom	Lligands	Cèl·lules que l'expressen	Funcions
<b>CR1 (CD35)</b>	C3b iC3b C4b C5b67	Eritròcits, limfòcits T i B, SFM, neutròfils	Aclariment d'immunocomplexes Fagocitosi Quimiotaxi
<b>CR2 (CD21)</b>	C3b iC3b C3d C3dg C5b-9	limfòcits B, c. dendrítiques fol·liculars, c. epitelials	Citòlisi Aclariment de complexos en centres germinals
<b>CR3 (CD11b/CD18)</b>	iC3b	SFM, neutròfils, NK	Fagocitosi Ancoratge a l'endoteli i diapèdesi
<b>CR4 (CD11c/CD18)</b>	iC3b	SFM, neutròfils, Plaquetes, c. dendrítiques	Fagocitosi Ancoratge a l'endoteli i diapèdesi
<b>C3aR</b>	C3a	Mastòcits, basòfils, c. Endotelials, c. múscul llis	Degranulació Augment de la permeabilitat vascular Contracció múscul llis
<b>C5aR</b>	C5a	Mastòcits, basòfils, c. Endotelials neutròfils	Quimiotaxi Opsonització
<b>C1qR</b>	C1q	Leucòcits, plaquetes	Aclariment d'immunocomplexes

SFM, cèl·lules del sistema fagocític mononuclear.

### 1.3.3. FUNCIONS DEL COMPLEMENT

Les funcions del complement són molt diverses, d'aquí la gran potencialitat defensiva del mateix. Aquestes funcions es porten a terme per diferents fraccions del complement actives. La Taula 2 mostra l'acció fisiològica d'aquestes. Els factors actius freqüentment desenvolupen la seva funció connectant amb diferents receptors de membrana. En la Taula 2 s'exposen els receptors de membrana per a les diferents fraccions del complement. Comentem, a continuació, les funcions biològiques fonamentals. Les accions anafilotòxiques, quimiotàctiques i opsonitzants del complement el converteixen en un factor clau en la potenciació de la inflamació, fenomen bàsic en la defensa enfront de la infecció.

## Introducció

### **A) Acció citolítica**

Una vegada engegada la cascada del complement, si es forma el complex final C5b6789, es produeix la lisi de les cèl·lules sobre les membranes de les quals s'ha adossat dit complex per la formació de múltiples porus. A aquest efecte es pot arribar per la unió del Ag-Ac (via clàssica) o per l'activació per gèrmens (via alternativa). Per un o altre mecanisme es produeix la lisi de gran nombre de bacteris, tals com *bacteridium*, *salmonella*, *shigella*, *escherichia*, *vibrio*, *treponema* i altres cèl·lules. Totes aquestes accions s'agrupen sota la denominació coneguda de citotoxicitat depenent del complement.

### **B) Acció anafilotòxica**

Les fraccions C3a i C5a, connectant amb receptors de membrana (C3aR, C5aR, Taula 2), exerceixen una acció anafilotòxica, i posseeixen una potent acció activadora sobre els mastòcits i basòfils que en conseqüència, alliberen mediadors de la inflamació. Les substàncies vasoactives alliberades incrementen la permeabilitat capil·lar, el que facilita l'afluència de leucòcits i molècules al focus inflamatori.

### **C) Acció quimiotàctica**

La fracció C5a posseeix una potent activitat quimiotàctica, que determina l'atracció de leucòcits al focus inflamatori.

### **D) Acció d'ajuda a la fagocitosis (opsonització)**

Els macròfags i els polimorfonuclears neutròfils presenten en les seves membranes receptors (CR1, CR3 i probablement CR4, Taula 2) capaços d'unir la molècula C3b i els seus derivats resultants de l'activació del complement. D'aquesta forma, si el C3b està fixat sobre la superfície d'un germen, els fagòcits poden connectar amb aquest mitjançant els receptors per a C3b, facilitant-ne així el fenomen de la fagocitosis. Aquesta activitat d'ajuda a la fagocitosis es denomina opsonització. La fagocitosis de microorganismes depenent de C3b i iC3b és probablement el major mecanisme de defensa enfront de les infeccions bacterianes.

### **E) Aclariment d'immunocomplexes**

És una funció d'especial importància lligada a la capacitat inductora de la fagocitosis de certs factors del complement. En condicions normals, es poden detectar immunocomplexes solubles circulant en sang. Aquests immunocomplexes són potencialment peril·losos, doncs de precipitar en algun teixit activarien el complement i iniciarien un focus inflamatori. No obstant

això, existeix un mecanisme fisiològic d'aclariment d'immunocomplexes. Els eritròcits, les cèl·lules més abundants de la sang, presenten CR1 en la seva membrana i mitjançant aquest receptor capten immunocomplexes circulants a través del factor C3b. Quan els eritròcits travessen el fetge o la melsa, els macròfags d'aquests òrgans, mitjançant els seus receptors CR1, CR3 o CR4, uneixen els immunocomplexes a través de C3b (o mitjançant receptors per a Fc a través de IgG) i els fagociten. Els eritròcits queden lliures per a captar nous immunocomplexes.

### **F) Acció reguladora de la resposta immune**

El factor C3b té importants funcions reguladores de la resposta immune. Així, el C3b o els seus derivats (C3d), units a membranes faciliten la cooperació entre les cèl·lules immunes i actuen en l'estimulació de les cèl·lules T i B probablement a causa de la seva capacitat de promoure l'adhesió cèl·lula-cèl·lula. Les APCs tenen receptors per al complement, el que permet la seva connexió amb l'antigen per a la seva posterior presentació.

### **1.3.4. PATOLOGIES ASSOCIADES AL SISTEMA DEL COMPLEMENT**

S'ha après molt sobre la patologia de les deficiències dels components de les cascades del complement. Aquests estan sovint associats a infeccions recurrents amb bacteris encapsulats, malalties del sistema immune com el lupus eritematós (SLE), la glomerulonefritis, l'asma i el síndrome de Barraquer-Simons i diverses formes d'artritis, malaltia autoimmune de cor, esclerosi múltiple, dany per reperfusió isquèmica, etc.

Deficiències en la via terminal predisposen tant a malalties autoimmunitàries com a infeccions. Deficiències dels inhibidors del complement també causen malaltia. Mutacions en els reguladors del complement com el factor H i la proteïna cofactora de membrana han estat associats amb el síndrome uraèmic hemolític atípic [14, 15]. A més, un polimorfisme (SNP, *single nucleotide polymorphism*) en el factor H (Y402H) ha estat associat amb la degeneració macular associada a l'edat [16]. Es creu que ambdós desordres porten a l'activació aberrant del complement en la superfície de les cèl·lules hostes.

No obstant, el complement també és el major responsable del rebuig dels xenotrasplants. L'activació no desitjada del complement contribueix també a la patogènia de la glomerulonefritis, el dany per isquèmia/reperfusió, l'artritis reumatoide, l'esclerosi múltiple i moltes més malalties. A causa de l'habilitat de la molècula C1 per reconèixer estructures proteiques anormals, el complement està implicat en la patologia de la malaltia de l'Alzheimer i malalties on estan implicats prions.

## Introducció

Mutacions en el gen que codifica per l'inhibidor de C1 pot causar angioedema hereditari, una malaltia autoimmunitària resultant d'una regulació reduïda de la via del complement. Mentre que mutacions en els components del MAC sovint són implicades a infeccions per *Neisseria*.

### 1.3.5. MECANISMES DE REGULACIÓ DEL COMPLEMENT

El complement és important per l'eliminació d'agents infecciosos, però els patògens utilitzen un nombre d'estratègies d'evasió per modificar i bloquejar l'activitat del complement. Molts patògens expressen proteïnes de superfície que s'uneixen a reguladors del complement de l'hoste o recluten inhibidors del complement i així bloquegen o interfereixen en les funcions efectores del complement. Aquests reguladors de l'hoste units a la superfície retarden o fins i tot bloquegen les respostes immunes innates protectores de l'hoste que, del contrari, eliminarien l'agent infecciós i mantindrien intacte l'organisme hoste. No obstant, un patògen persistent provoca reaccions immunes addicionals. Per altra banda, durant una infecció per un patògen, el complement és induït localment i aquesta activació també ataca cèl·lules col·laterals de l'hoste en el lloc de la infecció. En aquesta situació, una cèl·lula hoste atacada requereix màxima protecció i utilitza nombrosos reguladors disponibles per assegurar la supervivència. Per tant, el sistema del complement humà manté un delicat balanç entre activació i inhibició per permetre l'activació sobre les superfícies pròpies modificades o de l'exterior i la seva pròpia protecció. Això explica perquè la regulació del complement és crucial per l'homeòstasi.

TAULA 3. Molècules reguladores del sistema del complement		
Factor	Lligand	Efecte
C1inh	C1r,C1s	Inhibició de la C1 esterasa
C4BP	C4b	Dissociació del complex C4b2a
FH	C3b	Facilita la degradació de C3b per FI
FI	C3b, C4b	Degradació de C3b, C4b
C3aI	C3b, C4b, C5b	Proteòlisi de residus terminals arginina
CR1	C3b, C4b, iC3b	Facilita la dissociació de les C3 convertases i fagocitosis
(CD35)	C4b, C3b	Facilita la dissociació de C4b i 2a
DAF	C4b, C3b	Facilita la degradació de C4b i C3b per FI
MCP	C5b67	Impedeix la unió de C5b67 a la membrana cel·lular
(CD46)	C5b-9	Modula la formació de MAC
Proteïna S	C5b-8, C9	Inhibeix la inserció de C5b-8 i la polimerització de C9.
SP-40,40	C5b-8, C9	Inhibeix la inserció de C5b-8 i la polimerització de C9.
CD59		
HRF		

C3bI: Inactivador del C3b. HRF: factor de restricció homòloga. DAF: factor accelerador de la degradació.

El mecanisme més simple de regulació és la baixa concentració i labilitat de molts dels seus factors. No obstant això els factors que actuen en la regulació del complement exerceixen la seva acció en diferents punts tant en la via clàssica com en l'alternativa o lítica, centrant-se fonamentalment en l'activació de C3. Les molècules reguladores del complement es mostren a la Taula 3.

### 1.3.5.1. Distribució dels reguladors del complement

Considerant el potencial explosiu i destructiu del complement, hi ha una necessitat òbvia de tenir inhibidors que protegeixin els propis teixits de l'hoste.

La importància de la restricció del complement és destacada pel gran nombre de reguladors identificats els quals actuen a tots els nivells i es classifiquen en 3 categories principals: fase fluida, unit a la superfície de les cèl·lules hostes i receptors de molècules efectores del complement. Sorprenentment, diversos reguladors tenen activitats addicionals més enllà del complement, com són les de mitjançar l'adhesió cel·lular i les interaccions amb la matriu tissular o ser el lligam de la cascada del complement amb vies fisiològiques importants com és la cascada de la coagulació.

#### **A) Reguladors del complement de fase fluida**

Els reguladors del complement de fase fluida estan distribuïts en el plasma humà i en fluids corporals com són el líquid sinovial i l'humor vitri. Aquests reguladors estan agrupats d'acord amb la seva activitat majoritària i inclou els reguladors de la via alternativa Factor H, FHL1 i la proteïna activadora properdin. Carboxipeptidasa N, la qual parteix i inactiva parcialment els pèptids anafilàctics C3a i C5a, actua en les tres vies principals del complement. Com a reguladors solubles de les vies clàssica i de la lectina s'inclouen l'inhibidor C1 (C1INH) i C4BP. C1q és un inhibidor proteïnasa que pertany a la família serpin i inhibeix directament el potencial proteolític de C1 [17]. Té un paper crucial en la defensa de l'hoste i en l'eliminació de complexos immunes. Dins de la via terminal s'inclouen inhibidors solubles coneguts recentment identificats com CFHR1, clusterin i la proteïna S (vitronectina), que tenen funcions fisiològiques addicionals més enllà del complement.

La proteïna C4BP té la capacitat de captar C4b facilitant la seva dissociació del complex C4b2a i inhibint, per tant, l'activitat convertasa de C3.

La proteïna S o vitronectina és una glicoproteïna plasmàtica amb capacitat per unir-se al complex C5b67 impedit que aquest s'uneixi a la membrana cel·lular.



## Introducció

### **B) Reguladors del complement units a membrana**

La membrana de les cèl·lules hostes estan equipades amb reguladors del complement, on s'inclouen CR1 (*complement receptor 1*, CD35), CR2 (*complement receptor 2* o CD21), CD55 (DAF), CD46 (MCP, *membrane cofactor protein* o cofactor proteínic de membrana), CD59 (protectin) i el receptor del complement de la superfamília de les immunoglobulines (CRIg). Els reguladors del complement units a membrana controlen les tres vies principals d'activació del complement i inactiven ambdós C3 i C4.

CD59 és un inhibidor GPI (glucosilfosfatidilinositol) ancorat a la membrana del complex d'atac MAC. [17] CR1, MCP i DAF són proteïnes codificades per gens del cromosoma 1, pertanyents al grup denominat RCA (*Regulators of complement inhibitors*).

### **C) Receptors de molècules efectores del complement**

Els productes d'activació del complement i compostos efectors tenen una activitat biològica potent. Potencien i modulen la inflamació, controlen les respostes inflamatòries, dirigeixen les respostes múltiples cel·lulars i indueixen funcions efectores, com és el marcatge de superfícies cel·lulars i la inducció o augment de la fagocitosi.

Hi ha molts receptors del complement, les quals s'uneixen a compostos efectors com són C3a i C5a, superfícies opsonitzades C3b, superfícies de cèl·lules modificades i microorganismes marcats, toxines o antigens. Cinc receptors majoritaris units a la membrana, CR1, CR2, CR3 (coneguts també com CD11b-CD18), CR4 (CD11c-CD18) i CRIg, s'uneixen a C3b i C4b dipositats en la superfície de la diana i condueixen les funcions efectores corresponents a la forma específica dels compostos d'activació C3 i C4. L'acció dels fragments anafilàctics C3a i C5a és mitjançada per membres de la família de set receptors transmembrana, incloent C3aR i dos receptors de superfície C5aR i C5L2. A més a més, C1q és reconegut en la superfície cel·lular per dos receptors, C1qR i el *dendritic cell-specific ICAM3 grabbing non-integrin* (DC-SIGN) homòleg a *SIGN-related 1* (SIGNR1 o CD209).

Un aspecte important del paper dels receptors de membrana és la seva expressió i distribució en llinatges de cèl·lules individuals o tipus cel·lulars. Receptors de complement units a la superfície i receptors efectors no s'expressen de forma uniforme en cèl·lules hostes nucleades, eritròcits i plaquetes. Conseqüentment, la distribució i el nombre de receptors individuals i el repertori complet de receptors en una membrana cel·lular donada són paràmetres importants per definir la superfície de protecció i la resposta cel·lular al complement.

### **D) Reguladors del complement units a la superfície**

Actualment es coneix que diversos reguladors del complement de fase fluida també s'uneixen a superfícies cel·lulars i a biomembranes com la membrana basal glomerular del fetge i la membrana Bruch de la retina. A més a més, aquests reguladors s'uneixen a superfícies pròpies modificades com són partícules apoptòtiques, cossos necròtics i la matriu tissular. Així, el Factor H, FHL1, C4BP, CFHR1, clusterin i vitronectina, que controlen el complement en la fase fluida, també s'uneixen a les bicapes lipídiques o a biomembranes i mantenen l'activitat reguladora del complement. Aquesta unió a la superfície forma una capa protectora addicional (zona de superfície) per cèl·lules hostes intactes que controla el complement i limita la formació dels seus productes d'activació i compostos efectors a la superfície cel·lular. Aquest escut flexible i protector coopera amb la zona de membrana, un escut interior que està format per reguladors units a la membrana. Actualment, els lligands en la superfície cel·lular i en la biomembrana que s'uneixen a reguladors del complement de fase fluida no han estat identificats a nivell molecular i s'han proposat que els aminoglicans actuen com a receptors de la superfície cel·lular i de biomembrana.

La unió simultània de múltiples reguladors crea un zona de superfície protectora addicional. La seva dimensió aproximada depèn de la longitud i la densitat de les proteïnes unides.

#### **1.3.5.2. Expressió dels reguladors del complement**

Aquestes proteïnes homòlogues pertanyen a una família anomenada els Reguladors d'Activació de Complement (RCA, *regulator of complement activation gene cluster*) o Proteïnes de Control de Complement (CCP, *Complement control protein*). Les proteïnes de control de complement funcionen en concert per regular el sistema i evitar que danyi el teixit hoste mentre que simultàniament el dirigeix cap a partícules estranyes com virus i bacteris i material indesitjat com restes de cèl·lules i complexos d'Ag-Ac.

Aquestes proteïnes estan codificades per un conjunt de gens que es troben en el cromosoma 1q32. El conjunt de gens que codifiquen per RCA s'estén al llarg de 21-45 cM i inclou més de 60 gens dels quals 15 són gens relacionats amb el complement. Tots aquests gens estan distribuïts en tàndem dins de dos grups. Aquests dos grups són: un llarg segment de DNA telomèric de 900 kb que inclou els gens que codifiquen per C4BPB, C4BPA, C4BPAL1, C4BPAL2, DAF, CR2, CR1, MCPL1, CR1L1 i MCP i un segment de DNA centromèric de 650 kb que conté els gens que codifiquen per CFH, CFHR3, CFHR1, CFHR4, CFHR2 i

## Introducció

CFHR5, així com el gen que codifica per la subunitat B del factor de la coagulació XIII, FI3B (Figura 2).

Finalment, un nombre d'inhibidors actuen en les convertases C3 i C5, tant per la dissociació incrementada de complexos enzimàtics (Acceleració de la degradació) com promovent la degradació enzimàtica de C3b i C4b mitjançada pel Factor FI (*Serine proteinase Factor I*) [17]. Els últims inhibidors estan formats quasi exclusivament per 4-35 dominis CCP. Els dominis CCP consisteixen en aproximadament 60 aminoàcids que formen un nucli hidrofòbic compacte envoltat per 5 o més cadenes  $\beta$  organitzades en làmines  $\beta$  i estabilitzades per ponts disulfur. Aquests dominis també estan presents en un nombre de proteïnes no relacionades amb el complement, com per exemple selectines, haptoglobina i el Factor de coagulació XIII (per veure una llista detallada de proteïnes que contenen els dominis CCP consultar: <http://smart.embl-heidelberg.de/>).

El C4BP és el major inhibidor soluble de les vies clàssica i de la lectina, mentre que el Factor H inhibeix la via alternativa. S'han descrit en els últims anys tota una família de proteïnes de tipus Factor H i proteïnes relacionades, però encara es desconeix si el paper majoritari d'aquestes proteïnes és inhibir el complement.

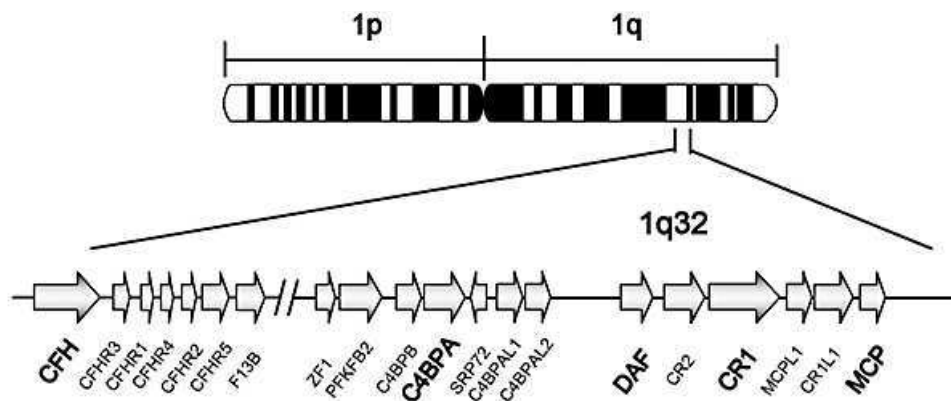


Figura 2. conjunt de gens dels Reguladors d'Activació de Complement en el cromosoma 1q32 [18].

Alguns inhibidors del complement tenen un potencial terapèutic a causa dels rols cardioprotector, accions antiinflamatòries i el seu potencial per contrarestar el rebuig hiperagut durant el xenotrasplantament.

Lògicament els gèrmens no presenten en les seves membranes molècules reguladores de l'autòlisi de manera que no poden protegir-se dels efectes lítics del complement. Això determina, per tant, un mecanisme rudimentari de discriminació entre el propi i el no propi. No obstant, alguns gèrmens han desenvolupat mecanismes per evadir l'actuació del complement.

En alguns gèrmens la simple presència d'una càpsula pot ser un mecanisme de resistència. Altres gèrmens presenten proteïnes de membrana que impedeixen el desenvolupament del MAC o enzims que degraden els factors del complement o alliberen factors proteics que inactiven les convertases de C3, etc.

### 1.3.5.3. C4BP (*C4b-binding protein*)

La proteïna C4BP és una glicoproteïna plasmàtica d'elevat pes molecular (570 kDa, conté uns 4000 residus d'aminoàcids, aa) amb una concentració estimada en plasma de 200 mg/l [17] que inhibeix de forma eficient la via clàssica de l'activació del complement. Apart de prevenir l'assemblatge de la convertasa C3 (C4b2a), també accelera la descomposició del complex. A més, C4BP s'uneix a C4b i actua com a cofactor del factor serina proteasa I de plasma en la fragmentació de C4b tant quan està en fase fluida com quan C4b està dipositada en la superfície cel·lular.

#### 1.3.5.3.1. Estructura de C4BP

C4BP pertany a una família de gens de proteïnes relacionades, les RCA, que també inclouen el Factor H, els receptors del complement 1 i 2 (CR1 i CR2), la proteïna cofactor de membrana, i DAF. Cada una de les proteïnes d'aquesta família s'uneix a C4b i/o a C3b essent important per la inhibició de les vies clàssica i/o alternativa de l'activació del complement. Totes aquestes proteïnes contenen un nombre variable de dominis organitzats en tàndem, els quals són denominats CCP (*complement control protein repeats*) o SCR (*short consensus repeats* o *sushi domains*). Aquests dominis són rics en cisteïna, tenen una extensió d'uns 60 aminoàcids de llarg, i cada un està format per un nucli envoltat per cadenes  $\beta$ .

C4BP és una proteïna oligomèrica heterogènia present en plasma [19] en 3 isoformes amb la composició de les subunitats diferent. La isoforma majoritària (75-80%) [17],  $\alpha\beta 1$ , és un complex de 7 cadenes  $\alpha$  (C4BP $\alpha$ , 70 kDa) idèntiques amb 8 CCPs cadascuna i una cadena  $\beta$  (C4BP $\beta$ , 45 kDa) amb 3 CCPs [20]. Les vuit cadenes estan lligades per ponts disulfur en les seves regions C-terminals formant un nucli central [17]. Les altres isoformes de C4BP en plasma són  $\alpha\beta 0$  i  $\alpha 6\beta 1$ . Les cadenes C4BP $\alpha$  i C4BP $\beta$  estan codificades pels gens C4BPA i C4BPB que estan localitzats en el cromosoma 1q32 en el grup de gens RCA i són principalment expressats en el fetge. Cada cadena C4BP $\alpha$  té un lloc d'unió per C4b, localitzat a l'extrem N-terminal. Aquesta unió no requereix C4BP $\beta$ . Per altra banda, la cadena C4BP $\beta$  té un lloc d'unió per la proteïna S anticoagulant (PS) [17], i la cadena C4BP $\alpha$  no és necessària per aquesta unió. Les parts C-terminals (60 aminoàcids cada una) de les dues cadenes C4BP $\alpha$  i

## Introducció

C4BP $\beta$  contenen dos residus de cisteïna i una regió hèlix- $\alpha$  amfipàtica, que són requerits per l'assemblatge de C4BP. Anàlisis de microscòpia electrònica van demostrar una conformació de tipus pop (octopus), amb les 7 cadenes C4BP $\alpha$  formant tentacles extensos. L'estructura 3D de C4BP no ha estat determinada experimentalment per Ressonància magnètica nuclear o cristal·lografia de raigs X. No obstant, diversos dominis CCP d'altres proteïnes han estat estudiats per aquests mètodes. Les estructures 3D globals de tots els dominis CCP són altament conservats, permetent la creació de models 3D útils basats en homologia de tots els dominis CCP de C4BP.

La interacció entre C4BP i la proteïna S és d'una elevada afinitat ( $K_d = 1-6 \times 10^{-10}$  M) [17]. A concentracions normals de C4BP o de proteïna S en plasma, un valor observat de  $K_d$  baix implica que totes les molècules que contenen C4BP $\beta$  en plasma estan unides a la proteïna S i que al voltant del 40% de la proteïna S està en la forma lliure i per tant activa. A causa que la interacció entre C4BP $\beta$  i la proteïna S inactiva aquesta última, s'ha suggerit que aquesta interacció juga un paper en el control del sistema de la coagulació. No obstant, és remarcable que en ratolins, bovins i altres mamífers, el polipèptid C4BP $\beta$  ha desaparegut o ha esdevingut no funcional. Mentre que la significança fisiològica del polipèptid C4BP $\beta$  es desconeix, en experiments *in vitro* i *in vivo* s'indica que concentracions elevades de C4BP $\beta$  poden resultar en una manca de proteïna S lliure, i són un risc potencial per desencadenar desordres tromboembòlics a causa de la inactivació de la via anticoagulatòria de la proteïna C. Així, nivells elevats de C4BP en pacients amb diferents malalties autoimmunes han estat associades amb un increment del risc de desenvolupar malalties tromboembòliques. A més a més, s'han trobat concentracions plasmàtiques elevades de C4BP en pacients amb trombosi venosa profunda aguda i coagulació intravascular disseminada [20].

### **1.3.5.3.2. Biosíntesi i regulació de C4BP**

Els gens que codifiquen per les cadenes C4BP $\alpha$  i C4BP $\beta$  estan localitzats en el *cluster* gènic RCA en el braç llarg del cromosoma 1. Els dos gens, que només estan separats per 4 kb, estan organitzats de cap a cua, donant suport a la hipòtesi que són el resultat d'un esdeveniment de duplicació gènica. Com moltes proteïnes del complement i del plasma, C4BP és sintetitzada al fetge, però hi ha llocs secundaris de síntesi, com són els monòcits, en els quals es va detectar el mRNA i van mostrar un augment sota estimulació amb IFN- $\alpha$  i - $\gamma$  [17]. A més, el mRNA de la cadena C4BP $\beta$  s'ha trobat en l'ovari humà però es desconeix el significat funcional. Anàlisis de *puls-chase* de cèl·lules transfectades amb cDNA que codifica per la cadena  $\alpha$  van mostrar que C4BP polimèrica és sintetitzada ràpidament i apareix en el medi després de 40 minuts.

Aquests experiments van demostrar que la subunitat de la cadena  $\beta$  no és requerida pel procés de polimerització. La cadena C4BP $\beta$  quan era expressada sola (sense  $\alpha$ ) era retinguda en les cèl·lules i degradada. Els nivells plasmàtics de C4BP estan hormonalment regulats, augmenten durant l'embaràs i en dones que utilitzen anticonceptius orals. Els nivells fetals i dels recent nascuts són de 5 i 20%, respectivament, dels nivells adults. C4BP està classificada com un reactant de fase aguda perquè el seu nivell és elevat en plasma (per sobre del 400%) durant la inflamació i en termes generals després d'un trauma definit. A més, els nivells plasmàtics de les isoformes a les quals els manquen la cadena C4BP $\beta$  incrementen en la resposta de fase aguda més que els nivells de C4BP que si la contenen.

### **1.3.5.3.3. Funcions de C4BP en relació a la seva estructura. Localització dels llocs d'unió per C4b i C3b**

C4BP és un important inhibidor de les vies clàssica i de la lectina del complement. Exerceix la seva funció inhibidora controlant les reaccions mitjançades per C4b en diverses vies. (Figura 3) [17]. En primer lloc, C4BP actua com a cofactor de Factor I en la inactivació proteolítica de C4b tant soluble com unit a la cèl·lula, així com preveu la formació i reconstitució de la convertasa C3 clàssica (C4bC2a). En segon lloc, C4BP preveu l'assemblatge de la convertasa C3 unint-se a C4b naixent, i en tercer lloc, accelera la segmentació natural del complex C4bC2a. A més a més, C4BP sembla incapaç d'inhibir l'assemblatge de la convertasa C3 alternativa i no redueix l'activitat hemolítica de C3b unit a la cèl·lula a menys que estigui a una concentració molt alta. Per tant, no pot substituir plenament al Factor H, el qual és el major inhibidor de fase fluida de la via alternativa.

Tot i que cada cadena C4BP $\alpha$  és capaç d'unir-se a una molècula de C4b, només 4 molècules de C4b poden unir-se simultàniament a C4BP a causa de l'impediment estèric. Molts treballs recents han arribat a la conclusió que els tres CCPs més N-terminals són necessaris i suficients per la unió de C4b. C4BP és l'únic inhibidor polimèric del complement amb múltiples llocs d'unió per als seus lligands. La naturalesa polimèrica de C4BP fa que la molècula sigui particularment eficient en la degradació de C4b dipositat en les superfícies cel·lulars. Una molècula monomèrica composta de subunitats simples de C4BP han mostrat ser menys efectives en la regulació de la unió de C4b a la superfície cel·lular, proveint el concepte que el polímer té propietats biològiques úniques.

Utilitzant modelatge computeritzat basat en homologia i mutagènesi de proteïnes recombinants s'han localitzat llocs d'unió per diversos lligands de C4BP: factor C4b del complement, heparina, proteïna S anticoagulant dependent de vitamina K (PS) [21]. S'ha vist que cada

## Introducció

molècula de C4BP pot unir-se a 4 molècules de C4b fortament i a 2 més addicionalment de forma més dèbil.

El grup de Dahlbäck l'any 2001 van localitzar el lloc d'unió de C4b en la interfase entre CCP1 i CCP2 de la cadena  $\alpha$  i van identificar un *cluster* d'aminoàcids de càrrega positiva que són importants per la unió. Aquesta regió també és important per la unió de C4BP a heparina, *Bordetella Pertussis*, i proteïnes M de *Streptococcus pyogenes* [22]. Van determinar que C4b requereix CCP1-3 de la cadena C4BP $\alpha$  per a la seva unió. La pèrdua de la unió a C4b resulta en la pèrdua de totes les funcions inhibidores de C4BP dins de la via clàssica del complement. La unió a heparina requereix CCPs 1-3 de la cadena C4BP $\alpha$ , amb CCP2 essent el més important, així com el *cluster* d'aminoàcids carregats positivament implicats en la unió a C4b. La interacció entre C4BP i PS és de molt alta afinitat i mitjançada pel *cluster* d'aminoàcids hidrofòbics exposats localitzats en CCP1 de la cadena C4BP $\beta$ . A més, C4BP és capturada en la superfície d'alguns patògens, els quals poden contribuir a la seva resistència i patogenicitat en sèrum. S'ha localitzat la interacció de C4BP amb *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pyogenes* i *Escherichia coli* a diverses regions de la cadena  $\alpha$ .

En els recents anys, algunes noves funcions han estat adscrites a C4BP, com és un paper en l'eliminació de cèl·lules apoptòtiques i la protecció de cèl·lules B de l'apoptosi. Fins el moment no hi ha cap cas conegut de deficiència de C4BP que pugui emetre més informació a les funcions de C4BP. L'únic pacient descrit amb baixos nivells de C4BP presentava símptomes de la malaltia de Behcet. [17].

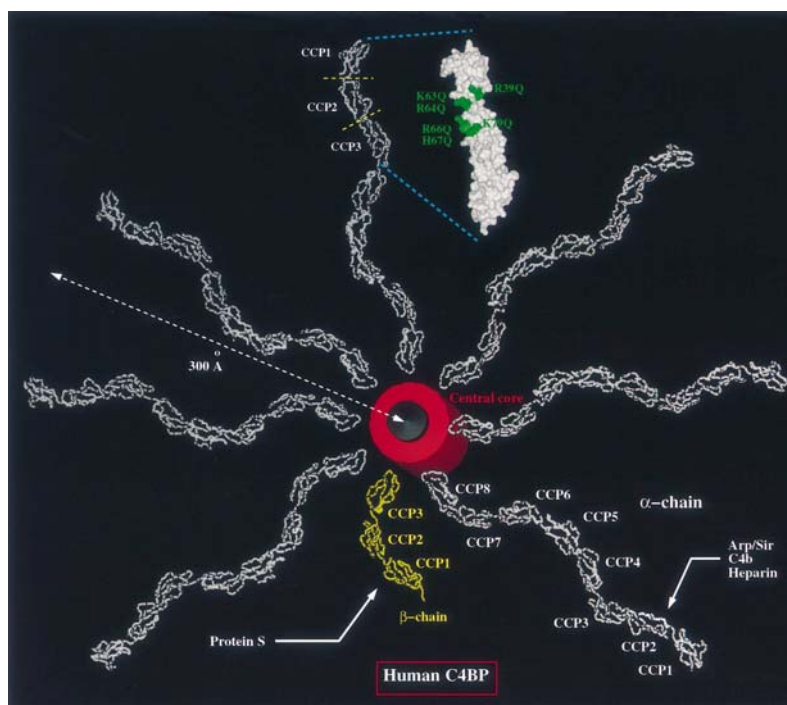


Figura 3. Estructura tridimensional de C4BP humana. La cadena C4BP $\alpha$  és la de color blanc i la cadena C4BP $\beta$  la de color groc, cadascuna amb els seus dominis CCPs. El cilindre central de color vermell és el nucli i les fletxes assenyalen els llocs d'unió dels diferents lligands. Modificada de Blom A.M. et al [22].

### 1.3.5.4. Factor H

L'activació de la via alternativa és regulada de forma precisa i això és a causa de la dissociació espontània i els complexos enzimàtics de vida mitja curta i de l'activitat reguladora d'un nombre de proteïnes plasmàtiques i proteïnes associades a cèl·lules [18].

Dues proteïnes del sèrum, Factor H i Factor I, i dues proteïnes de membrana, CR1 i MCP, les quals interaccionen amb C3b, juguen un paper important en la regulació de la via alternativa. Aquestes proteïnes inhibeixen la via alternativa per regulació de la deposició en la diana [18].

Excepte el Factor I, els gens que codifiquen diferents proteïnes RCA estan localitzades en el braç llarg del cromosoma 1, en el locus anomenat RCA [18].

Una regulació inadequada o extensiva de l'activació del complement pot alterar les funcions fisiològiques de les cèl·lules normals i així contribuir a la inducció de la malaltia [18].

El **Factor H** és una glicoproteïna plasmàtica gran i abundant de 155 kDa. És essencial per mantenir l'homeòstasi del complement i per restringir l'acció del complement sobre les superfícies activants. Mutacions en el gen que la codifica han estat associades al Síndrome hemolític-uraèmic (HUS) i a la nefropatia hipocomplementèmica crònica.

El Factor H regula l'activació del complement en les pròpies cèl·lules posseint tant activitat de cofactor per al Factor I mitjançant la divisió de C3b, com en l'activitat d'acceleració de la divisió de la convertasa C3 de la via alternativa, C3bBb. El Factor H protegeix les pròpies cèl·lules de l'activació del complement però no a bacteris/virus, ja que s'uneix a glicosaminoglicans (GAGs) que són presents en cèl·lules hoste però no en superfícies de cèl·lules patògenes [23, 24].

#### **1.3.5.4.1. Estructura del gen CFH**

CFH és un membre dels reguladors RCA situat en el cromosoma 1q32 (Figura 4). CFH compren 23 exons i introns de més de 94 kb de DNA. El primer exó codifica la regió 5' no traduïda del mRNA i els 18 aa N-terminals que organitzen el pèptid senyal. Cada SCR en el Factor H és codificat per un exó simple excepte SCR2, que és codificat pels exons 3 i 4. L'exó 10 no contribueix al transcrit del Factor H. És utilitzat exclusivament en el transcrit alternatiu que codifica per a la molècula FHL-1. L'exó 10 codifica els últims 4 aa (Ser-Phe-Leu-Thr) i la regió 3' no traduïda de FHL-1 [25].



## Introducció

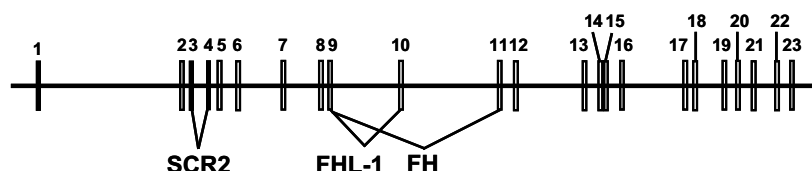


Figura 4. Estructura de CFH, mostrant un diagrama del 23 exons i 2 escissions alternatives del gen CFH. Modificada de Rodríguez de Córdoba [18].

### 1.3.5.4.2. Estructura del Factor H

El Factor H és una glicoproteïna de cadena polipeptídica senzilla de 155 kDa formada per 20 unitats repetitives de 60 aa, anomenats SCR o CCP ordenats de forma contínua. La molècula del Factor H conté diferents llocs d'interacció per C3b i polianions que defineixen els diferents dominis funcionals a les zones N i C-terminal (Figura 5).

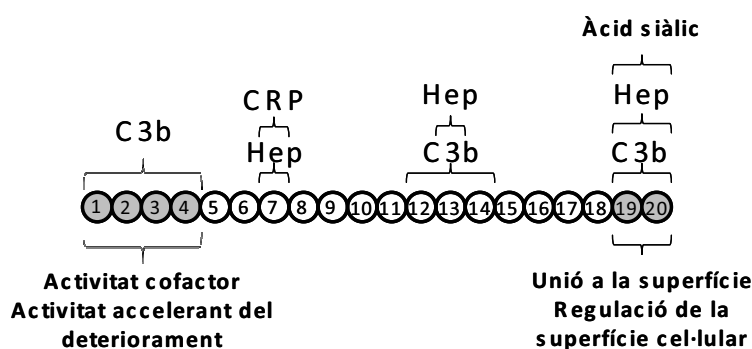


Figura 5. Dominis funcionals del Factor H del complement. El Factor H té tres llocs d'unió a C3b, SCR1-4, SCR12-14 and SCR19-20, respectivament. Modificada de Rodríguez de Córdoba [18].

### 1.3.5.4.3. Expressió del Factor H. Factor H i proteïnes relacionades

El Factor H té unes funcions antiinflamatòries i actua com a lligand per Proteïna C-reactiva (CRP). És produït constitutivament per el fetge [26, 27] i es troba en el plasma humà a unes concentracions de 116-562 µg/ml [28]. La síntesi del Factor H també té lloc en una àmplia varietat de tipus cel·lulars, com són les cèl·lules epitelials del pigment retinal, els limfòcits de sang perifèrica, mioblasts, cèl·lules de rhabdomiosarcoma, fibroblasts, cèl·lules endotelials del cordó umbilical, cèl·lules mesangials glomerulars, neurones, cèl·lules glia, etc [29, 30 i 31]. La producció extrahepàtica de Factor H és interpretat com un mecanisme per incrementar les concentracions locals, que podrien ser una avantatge per a la protecció de les cèl·lules hoste de l'activació del complement en llocs d'infecció o inflamació.

Tres llocs d'unió a C3b han estat identificats; en els SCR1-4, SRC12-14 i SCR19-20. També s'han identificat tres llocs de polianions per heparina i alguns glicosaminoglicans en el SCR7, 13, 19 i 20. El lloc d'unió de C3b en el SCR1-4 és l'únic lloc essencial per a l'activitat cofactor del Factor I per part del Factor H. Similarment, el lloc d'unió de C3b/polianions localitzat dins de SRC19-20 és el lloc més important per prevenir l'activació de la via alternativa en les cèl·lules hostes. En la Figura 5 es mostren els llocs crítics per l'activitat acceleradora de la degradació i per la regulació de la superfície cel·lular en les regions N i C-terminals. A més, hi ha altres dominis en el Factor H que interaccionen amb proteïnes plasmàtiques o amb microorganismes i que són interessants a causa del seu potencial rellevant en la patologia. En aquest aspecte, s'ha vist que el Factor H s'uneix a CRP i pot ajudar a contrarestar i inhibir l'activació de la via alternativa dependent de CRP induïda per dany tissular [32, 33]. Els llocs d'unió d'heparina (Hep) i CRP són llocs solapats en els quals un substrat inhibeix la unió d'altres [34].

El Factor H té dos dominis funcionals importants que estan localitzats als fragments terminals de la proteïna. El fragment N-terminal és un regulador essencial de fase fluida de la via alternativa. Amb el domini C-terminal i SCR7, el Factor H s'uneix a la superfícies de cèl·lules i teixits i així fa de mitjancer del seu paper protector, exercint també aquesta funció en la superfície de les cèl·lules hostes.

En plasma humà hi ha 6 proteïnes que estan estructuralment relacionades i reaccionen de forma immunològicament creuada amb el Factor H. FHL-1 és el producte d'escissió del gen que codifica pel Factor H (CFH) [27, 35, 25, 36, 37]. A més a més, 5 proteïnes relacionades amb el Factor H són codificades per els següents 5 gens CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFHR4 i CFHR5 lligats estretament a CFH [38, 39, 40 i 41]. Aquestes proteïnes són probablement també sintetitzades al fetge, però les seves concentracions són més baixes que les del Factor H. Les propietats funcionals de CFHR1, -2, -3, -4 i -5 no estan plenament definides. Totes elles estan formades per SCRs amb diferents nivells d'identitat amb els SCRs del Factor H [41, 42, 43, 44].

Els nivells de Factor H en el plasma humà varien àmpliament (116-562 µg/ml) en la població. Aquesta variació és resultat dels efectes combinats dels factors genètics i ambientals. S'ha vist que els nivells plasmàtics de Factor H mostren un increment dependent de l'edat i són disminuïts en fumadors.

## Introducció

### **1.3.5.4.4. Regulació del complement pel Factor H**

L'activitat reguladora de superfície del Factor H es basa en la seva habilitat per discriminar entre estructures pròpies no activants i estructures activadores estranyes. El Factor H regula el complement tant en la fase fluida com en les superfícies cel·lulars.

En efecte, el Factor H, en la fase fluida, limita els efectes de la deposició de C3 en inactivar fortament les molècules de C3b lliures de la via alternativa.

La regulació de la convertasa C3 (C3bBb) té lloc a múltiples nivells i impliquen tant la inhibició de l'assemblatge com la dissociació de la convertasa formada i funcional. El Factor H accelera la descomposició de la convertasa C3 per desplaçament de la unitat Bb i actua com un dels cofactors del Factor I per degradar C3b [45, 46 i 47]. No obstant, mentre el Factor H s'uneix i inactiva ràpidament C3b en la fase fluida, la inactivació de C3b unit a la superfície és dependent de la composició química de la superfície en la qual està unit aquest. En presència de polianions com són àcids síalics, glicosaminoglicans o polisacàrids sulfatats (heparines), l'afinitat del Factor H per C3b unit a superfícies incrementa com a conseqüència del reconeixement simultani tant de les molècules polianióniques com del C3b unit per la mateixa molècula de Factor H [48, 49 i 50].

En microorganismes en els quals manquen aquests elements reguladors, l'amplificació té lloc amb una convertasa C3 eficient i el patogen potencial és ràpidament cobert amb molècules C3b les quals són lligands de receptors en cèl·lules fagocítiques o participen en la formació del complex d'atac de membrana C5b9.

### **1.3.5.4.5. Malalties associades al Factor H**

Hi ha evidències recents en la genètica del Factor H que associen variants genètiques diferents del Factor H amb malalties renals i oculars. Les dades disponibles mostren una remarcable correlació genotip-fenotip entre CFH [18] i aquestes condicions, suggerint que, malgrat el lligam comú implicant la desregulació del complement, hi ha diferents alteracions en el Factor H que són essencials en la patogènia d'aquests desordres. Actualment es coneix que mutacions o polimorfismes que alteren el lloc d'unió de C3b/polianions localitzat a la regió C3-terminal del Factor H estan associades fortament amb Síndrome Uraemic hemolític atípic (aHUS, *atypical haemolytic uraemic syndrome*). Específicament, aquestes mutacions afecten la capacitat del Factor H de protegir les cèl·lules hostes. Com a conseqüència, aHUS està emergent com un paradigma de la malaltia resultant de la protecció ineficient de les superfícies cel·lulars de l'hoste de l'activació del complement.

Per altra banda, mutacions que pertorben les activitats plasmàtiques del Factor H per tal que falli en el control de l'activació del complement resulten en una activació massiva de C3 que causa Glomerulonefritis Membranoproliferativa de tipus II (MPGN2), que és una malaltia rara caracteritzada per dipòsits densos del complement dins la membrana basal de la paret capil·lar glomerular. MPGN2 ha estat descrita en pacients als quals els manca el Factor H en plasma i pacients que són positius per autoanticossos contra l'amplificació de la convertasa. En ambdós casos, hi ha una activació permanent de la convertasa C3 i la descomposició permanent de C3.

Finalment AMD, és una malaltia rara caracteritzada per una anèmia hemolítica microangiopàtica, trombocitopènia i una fallida renal aguda. L'edat dels rangs d'aparició van des del període neonatal al període adult. També és una de les majors causes d'invalidesa visual en la vellesa dels països desenvolupats, estan associats amb mutacions o polimorfismes en el gen CFH. Aquests estudis i la generació de models animals per les diferents malalties associades a variants genètiques del Factor H, ens guiarien en el desenvolupament futur de teràpies efectives per aHUS, MPGN2 i AMD.

## **1.4. TIPUS CEL·LULARS QUE INTERVENEN EN LA RESPOSTA IMMUNE-INFLAMATÒRIA**

### ***1.4.1. CÈL·LULES ENDOTELIALS***

En les últimes dècades s'ha produït un augment del coneixement de la cèl·lula endotelial i de la seva funció durant el procés inflamatori. Abans, l'endoteli era considerat com una simple barrera física que separava la sang dels teixits subjacents. A pesar que la seva estructura és aparentment senzilla, actualment se sap que és un òrgan altament especialitzat i metabòlicament molt actiu; ocupa un paper molt important no només en el manteniment del to i de la permeabilitat vascular sinó també en el tràfic dels leucòcits i en la modulació de l'homeòstasi i la trombosi. En condicions normals existeix un equilibri entre les accions dels diferents factors endotelials [51]. En determinades situacions, aquest desequilibri homeostàtic pot veure's alterat donant lloc a la disfunció endotelial.

Les cèl·lules endotelials són cèl·lules polaritzades, amb un domini apical en contacte amb la sang i un domini distal basal en contacte amb el subendoteli. Formen complexes unions intercel·lulars i sintetitzen components de la matriu tissular que ajuden a mantenir l'estabilitat i integritat de la paret vascular, com la fibronectina, i components de la làmina basal, com proteoglicans, heparan sulfat, laminina, nidogen i col·lagen.

L'endoteli regula nombroses funcions vasculares a través de les seves accions endocrina, paracrina i autocrina. A més, la cèl·lula endotelial participa en totes les fases de la inflamació aguda o crònica; produeix mediadors de la vasodilatació com òxid nítric i prostaciclina i expressa molècules d'adhesió que faciliten l'adherència i transmigració dels leucòcits. A més, produeixen el vasoconstrictor més potent que es coneix, l'Endotelina 1.

#### **1.4.1.1. Funcions de l'endoteli vascular**

L'endoteli participa en el reclutament leucocitari durant el procés inflamatori, no obstant les cèl·lules endotelials activades també controlen la immunitat innata, la immunitat adquirida, regulen els processos de coagulació sanguínia, la fibrinòlisi natural, el to vasomotor i l'intercanvi proteic. A més posseeixen una habilitat natural per reparar defectes intimals i són l'element necessari per l'angiogènesi.

#### **1.4.1.1.1. Immunitat innata**

La principal funció de la immunitat innata és el reconeixement de PAMPs (*pathogen associated microbial patterns*) a través de receptors de superfície, com els TLRs (*Toll like receptors*). Els TLRs desencadenen una via de transducció de senyals que dona lloc a l'expressió de gens proinflamatoris, quimiotaxi de leucòcits, fagocitosi, citotoxicitat i l'activació d'una resposta immune adaptativa [52]. Diferents estudis han demostrat l'expressió de TLRs en cèl·lules endotelials entre ells TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 i TLR8 [53].

#### **1.4.1.1.2. Immunitat adquirida**

Les cèl·lules endotelials expressen molècules MHC-I i MHC-II i poden processar l'antigen i actuar com a APC. L'endoteli expressa a més, molècules accessòries com CD80, CD86, ICOS-L, PDL-1, PDL-2 (*programmed death ligand*), LFA-3, CD134L i CD40 [54], i per tant, a través de la seva interacció amb els leucòcits i les plaquetes, les cèl·lules endotelials poden modular directament la immunitat adaptativa.

#### **1.4.1.1.3. Coagulació**

En condicions basals, l'endoteli confereix un estat de defensa antiinflamatori i anticoagulant, i està implicada la proteïna C (PC). En el procés d'activació de la PC intervien la trombomodulina (THBD) i el receptor de proteïna C (EPCR). Aquestes dues proteïnes formen un complex en la superfície de la cèl·lula endotelial que captura la PC generant la forma activa de la proteïna. THBD i EPCR s'expressen de manera abundant en la superfície de la cèl·lules endotelials mentre que PC és sintetitzada al fetge i circula sistèmicament [55].

#### **1.4.1.1.4. Angiogènesi**

L'angiogènesi és un component essencial d'inflamació aguda i crònica i constitueix un altre nexa d'unió entre immunitat i cèl·lula endotelial. L'angiogènesi consisteix en la capacitat especial de crear noves estructures vasculars a partir d'altres preexistents, amb la finalitat de millorar la perfusió d'òrgans i teixits isquèmics.

En la primera fase de la inflamació tenen lloc canvis funcionals en les cèl·lules endotelials que ocasionen un increment en la permeabilitat vascular, l'activació i diapedesi de cèl·lules immunes a través de la vasculatura. Posteriorment es desencadenen canvis estructurals en l'endoteli que impliquen la remodelació de capil·lars i venes, donant lloc a modificacions estructurals sense formació de nous vasos sanguinis [56]. A mida que el procés inflamatori avança, els vasos sanguinis s'expandeixen per aportar suficients nutrients per sostenir

## Introducció

l'acumulació de cèl·lules immunes activades en el teixit afectat. En la fase crònica de la inflamació, els macròfags i limfòcits infiltrats produeixen factors de creixement de les cèl·lules endotelials [57], té lloc una reparació contínua del teixit danyat i els vasos sanguinis formats de nou esdevenen permanents [58].

### **1.4.1.1.5. Mecanisme d'inflamació**

L'esdeveniment inicial en la inflamació aguda és la vasodilatació amb el subsegüent augment de la permeabilitat vascular i l'exsudació de neutròfils. Encara que els mediadors de la vasodilatació poden sorgir del plasma, els leucòcits o les plaquetes, l'endoteli com a òrgan regulador del to vascular contribueix en aquest procés.

La cèl·lula endotelial, per la seva ubicació entre la sang i els teixits, ocupa un paper crucial en la resposta inflamatòria en controlar l'ingrés de mediadors i de cèl·lules inflamatòries als llocs de la inflamació. Aquestes funcions són regulades per canvis en les propietats adhesives de les cèl·lules. En repòs, la cèl·lula endotelial és molt adherent a la làmina basal subjacent del teixit connectiu com col·lagen, laminina i proteoglicans. Aquesta adherència és dependent de les integrines. La seva unió lateral és més complexa, però les caderines ocupen un paper important en el procés inicial.

En la inflamació, l'endoteli emet senyals perquè tingui lloc la migració extravascular dels leucòcits. En condicions normals, aquests tenen un contacte fortuït amb les cèl·lules endotelials, però quan els teixits es deterioren per infeccions, injúries traumàtiques o d'altra índole, les seves cèl·lules alliberen citoquines proinflamatòries (IL-1 i TNF) i amines vasoactives que ocasionen grans canvis en les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis contigus. Aquestes substàncies incrementen el flux sanguini tissular i modifiquen la permeabilitat endotelial causant eritema i edema local. Les citoquines modifiquen les propietats adhesives de la cèl·lula endotelial, el que permet la migració dels leucòcits al lloc de la lesió. Les interaccions leucòcit-endoteli s'inicien amb el desplaçament dels leucòcits cap a la perifèria de les vècules postcapil·lars, on interaccionen de forma dèbil amb les cèl·lules endotelials. Aquesta fase inicial es produeix per la interacció entre molècules d'adhesió de la família de les selectines i els seus lligands. Aquesta interacció fa que els leucòcits presentin un moviment de rotació al llarg de la paret de les vècules, que es denomina *rolling* o rodament. En una segona fase es pot produir l'activació dels leucòcits per l'acció de diferents mediadors proinflamatoris, factors quimiotàctics i quimioquines. Aquesta estimulació dels leucòcits fa que un tipus de molècules d'adhesió leucocitària, les integrines, que es troben habitualment inactives en la superfície del leucòcit, passin a la seva forma activa. Una vegada activats els

leucòcits, tindrà lloc l'adhesió ferma d'aquests a l'endoteli mitjançant la unió de les integrines a molècules de la superfamília de les immunoglobulines. El pas final d'aquesta seqüència es produeix quan els leucòcits adherits migren cap a l'espai intersticial a través de les unions existents entre les cèl·lules endotelials. Aquest fenomen de migració transendotelial dels leucòcits és fonamental per al desenvolupament de la resposta inflamatòria.

Aquests esdeveniments tenen lloc en seqüència, per mitjà d'una sèrie de molècules que discutirem a continuació.

### **Molècules d'adhesió endotelials i leucocitàries**

Es coneixen dos mecanismes pels quals les cèl·lules es comuniquen entre si per a assolir una bona resposta immune: les citoquines i les molècules d'adhesió. La seva funció coordinada és necessària, doncs algunes citoquines indueixen i regulen les molècules d'adhesió.

Les molècules d'adhesió són proteïnes de superfície cel·lular que participen en la unió de cèl·lules, normalment entre leucòcits, unió a cèl·lules endotelials o a la matriu extracel·lular, facilitant les interaccions cel·lulars i la migració d'elles pels diferents teixits i transdueixen senyals reguladors de la transcripció després de la interacció amb els seus lligands.

Les interaccions i respostes que s'inicien per la unió d'aquestes molècules amb els seus receptors lligands són essencials en processos d'inflamació i reaccions immunes, fenòmens transcendents en la defensa de l'organisme. Juguen un paper important en l'embriogènesi, el creixement cel·lular i la diferenciació, en la defensa de l'hoste i en el manteniment de la integritat vascular i epitelial. Els principals grups de molècules són: les selectines, la família de les integrines, la superfamília de les immunoglobulines, proteïnes de la matriu extracel·lular i les caderines.

#### **a) Selectines**

Són molècules d'adhesió de baixa força, dependents de calci, que fan de mitjancers en el primer pas en l'adhesió dels leucòcits en els llocs d'inflamació o d'injúria i faciliten el rodament dels leucòcits sobre la superfície endotelial de les plaquetes o d'altres leucòcits responsables del rodament leucocitari. La seva funció està restringida exclusivament a nivell del sistema vascular (leucòcits, plaquetes i endoteli). El prefix fa referència al lloc on van ser identificades inicialment (leucòcits, endoteli i plaquetes, respectivament). La família de les selectines pot expressar-se com molècules de superfície (E- i L- selectines), poden ser emmagatzemades als grànuls  $\alpha$  de les plaquetes o als cossos de Weibel-Palade de les cèl·lules



## Introducció

endotelials (P-SELECTINA), o actuar com a molècules solubles (L-SELECTINA). Les principals característiques d'aquestes selectines es descriuen a la Taula 4 [59].

### **b) Integrines**

Són glicoproteïnes de membrana que s'expressen en gairebé totes les cèl·lules nucleades, principalment limfòcits T no activats i monòcits. Tenen un paper important en molts processos biològics, incloent l'organogènesi, la modificació de teixits, la trombosi i la migració dels leucòcits. Són els principals receptors que intervenen en les interaccions d'alta força amb altres cèl·lules i amb la matriu extracel·lular. Les principals característiques d'aquestes integrines es descriuen a la Taula 4 [60, 61].

De totes les integrines existents, les integrines B2 (CD11/CD18) s'expressen exclusivament en els leucòcits i són crítiques en la migració d'aquests leucòcits als llocs d'inflamació. Són importants en l'adhesió de leucòcits a altres cèl·lules i a l'endoteli vascular.

### **c) Superfamília de las immunoglobulines**

S'anomenen així per la seva estructura similar a la de les immunoglobulines; són fonamentals en l'adhesió dels leucòcits amb els seus principals receptors, les integrines. Aquest grup comprèn un gran nombre de molècules importants en la resposta immune i inflamatòria i en el desenvolupament embriogènic i del sistema nerviós; algunes participen directament en el reconeixement de l'antigen i unes altres són les molècules del MHC. Els membres d'aquesta família són crucials en l'adherència cel·lular, els més coneguts són: ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1 i el PECAM-1 que tenen un paper important en l'adhesió entre la cèl·lula endotelial i els leucòcits. Les principals característiques d'aquestes immunoglobulines es descriuen a la Taula 4 [62, 63, 64].

#### **1.4.1.1.5.1. Relació de la inflamació i les molècules d'adhesió**

La seqüència d'esdeveniments pels quals els leucòcits s'adhereixen a l'endoteli és la següent: la cèl·lula endotelial ràpidament respon als mediadors inflamatoris i en conseqüència la P-selectina migra del seu emmagatzematge intern a la superfície cel·lular; per tant, la primera fase de rodament sembla ser depenent de les interaccions de la P- i E- selectines amb lligands de carbohidrats en els leucòcits. A més, el lligand per a la L-selectina s'indueix en la superfície endotelial ocasionant major estancament dels leucòcits. Aquest fenomen de rodament ocasiona canvis en la conformació de les integrines, el que afavoreix la unió d'alta afinitat amb els seus lligands respectius. L'adhesió ferma és facilitada per la interacció entre

VLA-4 i VCAM-1 i LFA-1 i ICAM-1. La diapedesi i la transmigració depenen d'un gradient quimioattractiu i de l'activació de PECAM-1, localitzat en les unions intercel·lulars. També els monòcits activats tenen la capacitat d'adherir-se a l'endoteli inactiu mitjançant l'acció de la proteïna-1 quimioattractiu de monòcits (MCP-1) per la regulació en l'expressió de les integrines independent de l'expressió de les selectines. Les teràpies actuals i futures dirigides a inhibir aquestes interaccions adhesives poden ser útils per a suprimir el desenvolupament de la placa ateromatosa, limitar la seva activació o atenuar la resposta trombòtica que acompanya la seva activació; també són d'utilitat en el tractament d'algunes malalties autoimmunes (Figura 6).

[65]

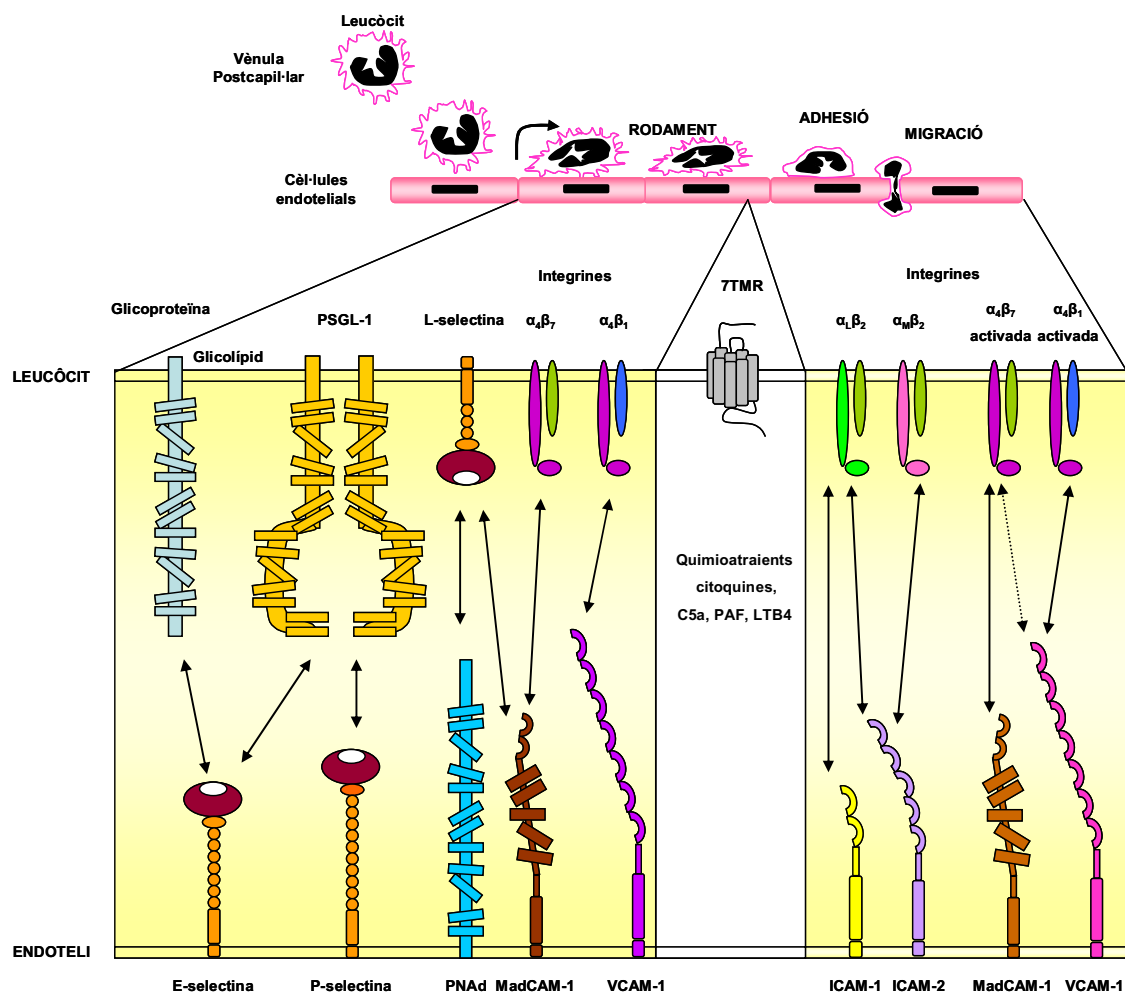


Figura 6. Procés seqüencial i molècules d'adhesió implicades en les interaccions leucòcit-endoteli. Modificada de von Andrian, U.H [61].

Les principals molècules d'adhesió endotelials i leucocitàries i les seves funcions en el procés de la inflamació es descriuen en la Taula 4.

## Introducció

TAULA 4. Molècules d'adhesió endotelials i leucocitàries					
Tipus	Nom alternatiu	Distribució	Lligand	Regulació	Funció
<b>Selectines</b>					
E-selectina (CD62-E)	ELAM-1	Endoteli activat	Sialil Lewis X (CD15s) Sialil Lewis A, L-selectina LFA-1, CD66, ESL-1 CLA (antigen cutani leucocitari)	Expressió augmentada per IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, substància P, LPS	Rodament
L-selectina (CD62-L)	LECAM-1, Leu-8 Mel-14Ag	Leucòcits en repòs	E-selectina, P-selectina GlyCAM (PNAd), CD34 MAdCAM-1, PSGL-1 Sialil Lewis X	S'augmenta ràpidament després de l'activació	Rodament
P-selectina (CD62-P)	GMP-140, PADGEM)	Plaquetes activades, endoteli activat	Sialil Lewis X (CD15s) Lewis X (CD15), PSGL-1 L-selectina, PNAd	Expressió augmentada per trombina, histamina, PAF, C5a, LPS, ROIs	Rodament
<b>Integrines</b>					
LFA-1	CD11a/CD18	Tots els leucòcits	ICAM-1, 2 i 3 E-selectina	PAF, IL-3, 5, 6 GM-CSF	Adhesió Migració
MAC-1	CD11b/CD18, CR3	Monòcits, granulòcits, limf. grans granulars	C3bi, ICAM-1, CD23 Factor X, fibrinògeno	PAF, IL-3, 5, 6 GM-CSF, LTB4	Adhesió Migració
p150,95	CD11c/CD18, CR4	Monòcits, granulòcits, limf. grans granulars, plaquetes i alguns Limf. B	C3bi, fibrinogen, CD23	PAF, IL-3, 5, 6 GM-CSF, LTB4	Adhesió Migració
VLA-4	CD49d/CD29, LPAM-1	Limfòcits, monòcits, endoteli, basòfils, mastòcits, fibroblasts	Fibronectina, VCAM-1	Els antígens augmenten la seva activitat	Adhesió
a4b7	CD49f/CD104	Alguns Limf. T de memòria, eosinòfils, basòfils, endoteli	MadCAM-1, VCAM-1, Fibronectina	—	Rodament Adhesió
<b>Superfamília de les Immunoglobulines</b>					
ICAM-1	CD54	Endoteli, fibroblasts epitelis, monòcits limfòcits, cél. dendrítiques condrocits	LFA-1, Mac-1 CD43 (leucosialina)	Expressió constitutiva; augmenta per IL-1, TNF- $\alpha$ IFN- $\gamma$ , LPS. Disminueix per IL-6	Adhesió Migració
ICAM-2	CD102	Endoteli, limfòcits monòcits, plaquetes	LFA-1	Expressió constitutiva	Adhesió Migració
VCAM-1	CD106	Endoteli, monòcits cèl·lules dendrítiques fibroblasts, estroma medul·la òssia	VLA-4, a4b7, LPAM-1	Augmenta l'expressió per IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-4 IL-13, LPS	Adhesió Migració
PECAM-1, EndoCAM	CD31	Endoteli, plaquetes leucòcits, múscul	CD31, Heparina, aVb3	Té formes molt polimòrfiques	Adhesió Migració
MadCAM-1	—	Endoteli de mucoses, vènules de làmina pròpia i plaques de Peyer, melsa	LPAM-1 (a4b7) L-selectina	Expressió augmentada per IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$	Adhesió Migració

## 1.4.2 CÈL·LULES IMMUNES

### 1.4.2.1 Limfòcits

Els limfòcits són les cèl·lules responsables de les respostes immunitàries. Es desenvolupen a partir de progenitors limfoides immadurs i es divideixen en dos grans grups, limfòcits B i limfòcits T, segons si aquests progenitors limfoides maduren a la medul·la òssia (B) o en el timus (T), respectivament. Els limfòcits B són especialitzats en la producció d'anticossos. Els limfòcits T són responsables de les respostes immunes intervingudes per cèl·lules, així com de funcions de cooperació perquè es desenvolupin totes les formes de respostes immunes, incloses les respostes d'anticossos pels limfòcits B. Clàssicament es venen distingint dos tipus de limfòcits, tipus 1 o Th1 i tipus 2 o Th2, que es diferencien per les seves característiques funcionals i el perfil de citoquines que produeixen. Les subpoblacions de limfòcits es poden diferenciar pel que, genèricament, es denominen antígens de diferenciació de leucòcits humans i es designen com CD (clúster de diferenciació; el terme clúster fa referència al grup d'anticossos monoclonals que els detecten).

S'han descrit diversos subtipus de cèl·lules T, cada un d'ells amb una funció distintiva [66]:

- **Limfòcits T citotòxics (CTL) o limfòcits CD8<sup>+</sup>** encarregats de les funcions efectores de la immunitat cel·lular, mitjançant la interacció amb un complex "pèptid-MHC-I"; els CTL reconeixen les cèl·lules infectades pel patògen per al qual són específics o cèl·lules tumorals, i les destrueixen segregant una sèrie de molècules (perforina, granzimes, FasL) que activen l'apoptosi de la cèl·lula diana.
- **Limfòcits T cooperadors o limfòcits CD4<sup>+</sup> o *helper T cells*** s'encarreguen d'iniciar la cascada de la resposta immune coordinada mitjançant la interacció amb un complex "pèptid-MHC-II". Quan s'activen, els limfòcits CD4<sup>+</sup> s'especialitzen, diferenciant-se al seu torn en limfòcits efectors, que es distingeixen pel tipus de citoquines que produeixen:
  - **Th1**, indueixen activació de la immunitat cel·lular o citotòxica, per a protegir l'organisme front a virus o altres patògens intracel·lulars. Aquesta resposta està definida fonamentalment per la producció de IFN- $\gamma$ , IL-2 i TNF- $\alpha$  i l'activació de macròfags.
  - **Th2**, que roman sobretot en els teixits limfoides i col·labora en l'activació dels limfòcits B; segreguen principalment IL-4 (que estimula la secreció d'IgE, que al

## Introducció

seu torn activa els mastòcits) i IL-5 (que activa els eosinòfils); els Th2 són importants en les reaccions al·lèrgiques i en la defensa davant paràsits i potencien la producció d'anticossos per fer front als patògens tissulars.

- **Th17**, denominats així perquè segreguen IL-17, a més d'IL-22; són els principals mitjancers en algunes reaccions al·lèrgiques, i semblen estar implicats en el desenvolupament de malalties com l'esclerosi múltiple, l'artritis reumatoide i la malaltia inflamatòria intestinal.

La diferenciació en Th1, Th2 o Th17 no és a l'atzar, sinó que depèn dels estímuls que rebí el limfòcit T4 verge quan contacti amb un antigen estrany.

- **Limfòcits T de memòria** són cèl·lules que es generen després de l'activació dels limfòcits T, per exposició a un antigen estrany. Tenen vida llarga, són funcionalment inactius, i poden circular durant mesos o anys, preparats per respondre a noves exposicions al mateix microbi.
- **Limfòcits T reguladors (cèl·lules Treg)**, anteriorment coneguts com a cèl·lules T supressores. La seva funció principal és eliminar la immunitat mitjançada per cèl·lules al final de la reacció immune i eliminar cèl·lules T autoreactives que van escapar del procés de selecció negativa en el timus.
- **Cèl·lules T natural killers (NK)** són un tipus especial de limfòcits, situats entre la resposta immune adaptativa i la resposta immune innata. Provenen del mateix precursor hematopoètic que la resta dels limfòcits T, però no expressen el TCR.

Durant el seu desenvolupament, és necessari que la cèl·lula NK reconegui amb els seus receptors inhibidors el MHC-I per convertir-se en cèl·lula assassina. L'expressió dels receptors inhibidors és a l'atzar, de manera que s'expressen en absència de lligand. A més, les cèl·lules NK són "anèrgiques", és a dir, no són funcionals en absència d'activació. Una vegada activades, aquestes cèl·lules poden realitzar funcions relacionades tant amb els limfòcits T4 com amb els T8: producció de citokines i alliberament de molècules citolítiques capaces de destruir la cèl·lula diana. Les cèl·lules NK, per tant, destruiran totes aquelles cèl·lules que manquin de molècules MHC-I, ja que aquestes són cèl·lules que s'identifiquen com potencialment nocives: infectades o tumorals.

- **Cèl·lules T gamma/delta.** Són un petit grup de cèl·lules T que tenen un TCR específic a la seva superfície. La major part dels limfòcits tenen un TCR compost per dues cadenes glucoproteïques denominades  $\alpha$  i  $\beta$ . Tanmateix, a les cèl·lules  $\gamma\delta$ , el TCR està format per una cadena  $\gamma$  i una cadena  $\delta$ . Aquest grup de limfòcits és molt poc freqüent (5% del total), però són abundants en la mucosa de l'intentí, formant part d'una població de limfòcits denominada limfòcits intraepiteliais. Els antígens que activen aquests limfòcits són desconeguts. Tanmateix, els limfòcits no presenten restricció MHC, i sembla que reconeixen proteïnes completes en lloc de pèptids, encara que alguns reconeixen molècules MHC-IB [66].

### 1.4.2.2 Cèl·lules dendrítiques

La resposta immune resulta de la interacció entre la immunitat innata inespecífica i la immunitat adaptativa antigen específica. Cèl·lules i molècules de la immunitat innata utilitzen vies de reconeixement no clonals com lectines i receptors de tipus toll (TLR). En canvi, el sistema immune adaptatiu, limfòcits T i B utilitzen receptors clonals que reconeixen antígens de manera altament específica. Entre la immunitat innata i l'adaptativa existeix un nexa d'unió organitzador que transfereix la informació des de l'exterior fins a la immunitat adaptativa. Aquest nexa són les **cèl·lules dendrítiques** (CDs), una població heterogènia de cèl·lules immunocompetents que s'han especialitzat en la captura, processament i presentació d'antígens als limfòcits T per induir immunitat o tolerància [67].

Les CDs constitueixen al voltant d'un 1 % de les cèl·lules limfoïdes. Tot i que diversos tipus cel·lulars expressen les molècules de MHC de classe I i II necessàries per a la presentació d'antigen, les CDs apareixen per ser l'únic tipus cel·lular que pot activar eficientment, o preparar (*priming*), les cèl·lules T naïve [68, 69]. Tenen un paper crucial en la inducció o regulació de la resposta immune [70], i són considerades unes de les cèl·lules immunoreguladores més potents descobertes. Expressen alts nivells de MHC-I i MHC-II, molècules coestimuladores, com CD40, CD80 i CD86, requerides per a l'activació de cèl·lules T, i produeixen una varietat de citoquines que inclouen IL-1, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , que estimulen una resposta de tipus Th1 i per tant de tipus cel·lular [68], així com IL-4 i IL-10 que indueixen una resposta de tipus Th2 iniciant la resposta mitjançada per limfòcits B [71, 72]. Provoquen una potent resposta al·logènica [73], (100 vegades superior a altres APC) i expressen de 10 a 100 vegades nivells més alts de MHC respecte monòcits o limfòcits B. Tenen la propietat de generar una forta resposta T amb un nombre baix de CDs i baixes concentracions d'antigen, tant de cèl·lules quiescents, memòria i naïve [74]. A més poden

## Introducció

induir tolerància [75], delecio de cèl·lules T autoreactives, timòcits i anèrgia en cèl·lules T madures [76].

Les CDs van ser descobertes per primera vegada per Langerhans en l'epidermis a finals del segle XIX (cèl·lules de Langerhans), posteriorment, van ser R.M. Steinman i Z.A. Chon qui al 1973 les van descriure i localitzar en diferents teixits, denominant-les en general cèl·lules dendrítiques [77]. El coneixement del paper de les CDs en les respostes immunes ha suposat un llarg camí des que Steinmann i els seus col·laboradors les van descriure. La extensa recerca durant aquest període ha permès adquirir un bon coneixement de la complexitat del sistema de les CDs i el seu paper crucial en la immunitat. També ha permès clarificar com interaccionen els diferents subtipus de CDs i s'autoregulen i com les poblacions de CDs afecten la funció d'altres cèl·lules del sistema immunitari. En l'actualitat es comença a conèixer el paper de les CDs, no només com a APCs, sinó com a reguladores en la reparació de teixits, en el rebuig a trasplantaments i en la iniciació i manteniment de la resposta inflamatòria. La millora del coneixement del seu paper en les respostes immunes ha guiat cap a la idea que la modulació de les funcions de les CDs, per exemple, per agents farmacològics podria ser utilitzat com una aproximació terapèutica potent en algunes condicions patològiques. L'actual aplicabilitat i el potencial terapèutic de totes aquestes aproximacions han de ser demostrades. No obstant, models animals de malalties humanes han aportat molta ajuda en l'avaluació de CDs manipulades com un nou tractament en malalties com càncer, autoimmunitat o asma. Resultats antitumorals prometedors en ratolins utilitzant CDs com adjuvants naturals van potenciar el seu ús en humans [78]. Alguns assajos han estat publicats, en els quals s'ha destacat la seva seguretat d'ús i respostes clíniques evidents i esperançadores [79].

### **1.4.2.2.1. Origen i classificació de les cèl·lules dendrítiques**

Les CDs constitueixen una rara i heterogènia població fenotípicament diferent dels macròfags (CD14<sup>+</sup>). S'originen en els progenitors del moll d'os [80] i estan caracteritzades per la seva característica morfologia dendrítica, tenen àmplies extensions citoplasmàtiques, baixa densitat i l'habilitat de presentar antígens a les cèl·lules T.

Inicialment es van caracteritzar CDs hematopoètiques, després CDs madures que provenien de sang perifèrica (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), que proveïa d'una font de CDs per al seu ús clínic. En l'actualitat existeixen un gran nombre de fonts de CDs amb característiques heterogènies i amb diferències substancials entre els diferents subtipus, tant humans com murins [81] i distingim diferents subtipus de CDs que difereixen entre si tant en la via de diferenciació i d'activació com en algunes de les seves funcions específiques i perfils

migratoris [82]. Tots els subtipus de CDs són capaços de captar, processar i presentar l'antigen actuant com potents estimuladors dels limfòcits T i B, o com a inductores de respostes de tolerància, per la qual cosa són considerades les sentinelles del sistema immunitari [70, 83]. Alguns investigadors atribueixen les característiques de les CDs d'acord al seu llinatge. No obstant altres investigadors les han classificades d'acord a l'ambient en el qual es troben.

Es localitzen en els fol·licles de quasi tots els òrgans com CDs intersticials, en òrgans no limfoides com epitelis, en forma de cèl·lules de Langerhans, en la sang com CDs de sang perifèrica, en àrees riques en limfòcits T d'òrgans limfoides secundaris com CDs interdigitants, en la medul·la tímica com CDs tímiques i en els fol·licles dels limfòcits B dels òrgans limfoides secundaris com CDs de centres germinals o CDs fol·liculars [84]. Recentment, hi ha hagut una evidència creixent que les CDs es poden originar tant de precursors mieloides (CDs tipus 1) com limfoides (CDs tipus 2), essent aquest últim resident típicament en el timus, on apareixen per tenir funcions immunoreguladores [77].

Tots els subtipus de CDs, com totes les cèl·lules sanguínies, deriven de cèl·lules mare hematopoètiques (HSC, *hematopoietic stem cells*). Les HSC es regeneren a si mateixes en la medul·la òssia i poden diferenciar-se en precursors hematopoètics mieloides, limfoides i eritroides. Els dos subtipus de CDs són: les CDs mieloides (CDmi) procedents del llinatge mioide i les CDs plasmacitoides (CDp), d'origen limfoide [71]. Aquests dos subtipus de CDs presenten diferent distribució tissular, producció de citoquines i necessitats de creixement [86]. Les CDmi són formades a partir de precursors mieloides CD11c<sup>+</sup>, expressen els marcadors mieloides CD13<sup>+</sup> i CD33<sup>+</sup> i requereixen del factor estimulador de granulòcits (GM-CSF) per sobreviure [86], mentre que les CDp s'originen a partir de progenitors limfoides CD11c<sup>-</sup> en els òrgans limfoides [71], expressen el receptor de la cadena  $\alpha$  de IL-3 (CD123), i a diferència de les CDs mieloides, requereixen IL-3 per no de GM-CSF per sobreviure [87].

Dins del llinatge mioide existeixen dues vies de desenvolupament a partir de progenitors CD34<sup>+</sup>, una via origina CDs derivades de monòcits conegudes també com CDs CD14<sup>dim</sup>CD1a<sup>+</sup> i l'altre via es caracteritza per ser CD14<sup>neg</sup>CD1a<sup>+</sup>. Les CD14<sup>+</sup> humanes també poden ser generades a partir de monòcits de sang perifèrica, aquest és el mètode per generar CDs per a estudis *in vitro* i per protocols d'immunoteràpia dirigits contra el càncer i altres malalties [88 i 89]. Finalment CDs d'origen plasmacitoide van ser descrites inicialment en teixits limfoides, per la seva morfologia similar a les cèl·lules plasmàtiques. En humans les CDp provinents de PBMC es caracteritzen per una manca de marcadors de llinatge mioide com CD11b, CD11c, CD13 i CD33.



## Introducció

Molts estudis realitzats sobre les CDs s'han dut a terme mitjançant l'obtenció *ex vivo* d'ambdós subtipus cel·lulars. Les CDmi s'obtenen a partir de monòcits de sang perifèrica en presència de IL-4 i GM-CSF. En canvi les cèl·lules CDp humanes s'obtenen mitjançant cultiu amb IL-3 [90, 91 i 92], INF- $\gamma/\beta$  i TNF $\alpha$  [93]. En la Figura 7 es mostren els diferents subtipus de CDs que deriven dels progenitors CD34<sup>+</sup> mieloides i limfoides.

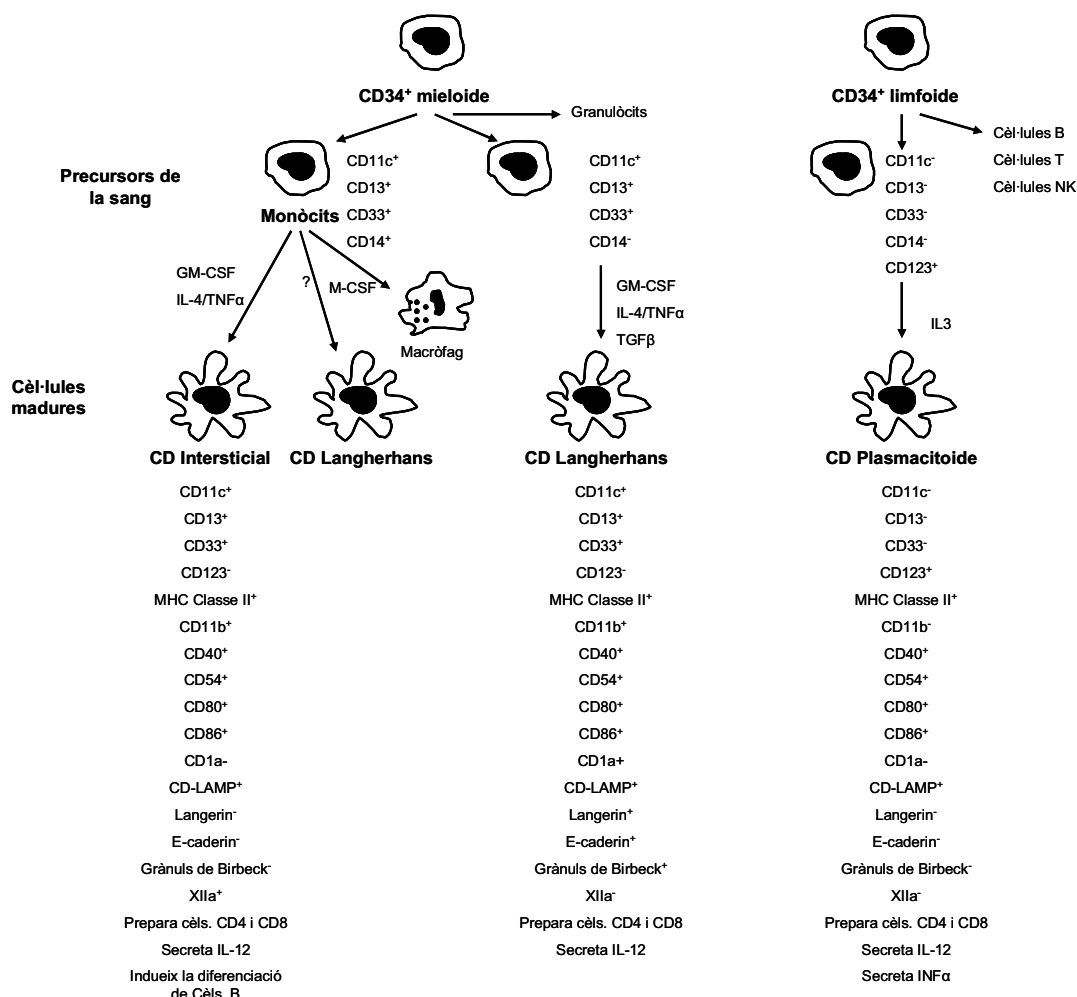


Figura 7. Esquema de la derivació dels subtipus de CDs humans dels progenitors CD34<sup>+</sup> mieloides i limfoides. CDs poden ser propagades a partir de progenitors de la medul·la òssia i precursors de la sang utilitzant diverses combinacions de factors de creixement, com per exemple GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-4, TGF- $\beta$  i IL-3. Modificada de Lipscomb M.F. [94].

### 1.4.2.2.2. Fenotip de les cèl·lules dendrítiques

Les CDs deriven de HSC CD34<sup>+</sup> i emigren als diferents teixits com cèl·lules dendrítiques immadures (CDi) distingint-se pel seu fenotip. Ambdós tipus cel·lulars, CDmi i CDp, es troben estratègicament localitzades en l'organisme amb objecte de dur a terme la seva funció. Les CDmi provenen d'un progenitor mioide, es caracteritzen per l'expressió de

CD11c amb alta intensitat o *high* (CD11c<sup>alt</sup>) [95, 82], i es troben en els òrgans limfoides secundaris, teixits perifèrics i en els llocs d'inflamació [96].

Les CDp comparteixen un progenitor comú (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD7<sup>+</sup>) amb els limfòcits T, B, i NK [97, 98, 99, 100]. Es troben principalment en els òrgans limfoides secundaris i expressen l'antigen CD11c amb baixa intensitat o *low* (CD11c<sup>baix</sup>) [92]. En humans les CDp també presenten una sèrie de característiques que fan que es diferenciïn clarament de les CDmi, com són la manca d'expressió de marcadors mieloides [101], l'expressió de marcadors limfoides com el CD123, i l'alta producció de IFN tipus I després d'interaccionar amb alguns microorganismes [96, 102].

Les característiques funcionals de les CDs varien en funció del seu estat de diferenciació. Així que les CDs immadures (CDi) romanen en els teixits amb l'objecte de captar l'antigen estrany. Quan té lloc la invasió de patògens, els precursors (monòcits CD14<sup>+</sup>) de les CDmi són atrets als llocs d'inflamació mitjançant citoquines [103]. Aquests precursors es diferencien a CDi, que són especialment eficients a l'hora de captar l'antigen. Després de la captació d'antigen, les CDi mieloides abandonen el teixit cap als nòduls limfàtics, durant aquesta migració es produeixen diversos passos de maduració intermèdia i l'expressió entre altres del receptor CCR7 (*CC-chemokine receptor 7*) que afavoreixen aquesta migració [104]. Les pCD en canvi, romanen en els òrgans limfoides secundaris en estat immadur on capten i presenten l'antigen a les cèl·lules T [105, 71].

Les CDmi es caracteritzen per ser cèl·lules CD11c<sup>alt</sup> i per expressar marcadors mieloides com són CD13, CD33 i CD11b [106], són CD123<sup>baix</sup> [83] i presenten expressió de receptors de tipus Toll (TLRs) com són TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 i TLR8 [107]. Aquestes molècules pertanyen a un grup de receptors que es caracteritzen per unir-se i reconèixer patrons de molècules associades a diferents patògens.

Les CDp, no obstant, són cèl·lules CD11c<sup>baix</sup> i no expressen marcadors mieloides [106], expressen nivells baixos de MHC i molècules coestimuladores [92], a més són CD123<sup>Brillant</sup> [107]. En quant als receptors de tipus Toll, aquestes es caracteritzen per presentar l'expressió de TLR7 i TLR9, que reconeixen components virals i després de la seva interacció donen lloc a una gran quantitat d'IFN de tipus I [107]. Les CDmi, en canvi, són capaces de reconèixer components bacterians i donar lloc a la producció de citoquines proinflamàtiques com TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-12 [107].

Les CDi d'origen mioide són CD14<sup>-</sup>, CD1a<sup>+</sup>, MHCII<sup>baix</sup>, CD86<sup>baix</sup>, CD80<sup>baix</sup>, CD83<sup>-</sup> [108], mentre que les d'origen plasmacitoide són CD11c<sup>-</sup>, CD13<sup>-</sup>, CD33<sup>-</sup>, CD123<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>baix</sup> [82]. Les CD madures (CDm) d'origen mioide són CD83<sup>+</sup>, CD1a<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>,

## Introducció

MHCII<sup>baix</sup> [108], CD11c<sup>baix</sup>, CD33<sup>baix</sup>, CD11b<sup>+</sup> [82], mentre que les d'origen plasmacitoide són CD83<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD33<sup>baix</sup> [82].

Les CDs han estat també classificades com CD1 i CD2, respectivament, a causa que es creia que les CDmi induïen diferenciació dels limfòcits T cap a cèl·lules efectores Th1 productores de INF- $\gamma$ . Mentre que les CDp induïen només diferenciació cap a Th2 productores de IL-4 [92]. No obstant, s'ha pogut veure que les CDp també són capaces d'induir una resposta Th1 [109, 110]. *In vitro*, les CDp poden diferenciar-se a CDs madures capaces d'induir a les cèl·lules T indiferenciades CD4<sup>+</sup> cap a una resposta Th1 o Th2 [92, 109, 93, 110, 111]. Per múltiples estudis això sembla dependre de múltiples factors com la naturalesa de l'estímul antigènic i la seva via d'entrada, el microambient i la proporció d'APCs i limfòcits T.

### **1.4.2.2.3. Lligam entre la captura d'antigen, la migració i la maduració**

#### **1.4.2.2.3.1. Reclutament de precursors de Cèl·lules Dendrítiques**

Les CDs són un sistema integral per l'inici de la regulació de la resposta immune [68]. L'objectiu de la presentació d'antigen mitjançant les CDs és determinat per l'estadi de maduració, el qual pot ser induït per la seva interacció amb senyals de perill.

TAULA 5. Expressió de receptors de quimioquines per les cèl·lules dendrítiques	
Receptor	Lligand
<b>CD immadures</b>	
CCR1	MIP-1a, RANTES, MCP-3, MIP-5
CCR2	MCPs
CCR4	TARC, MDC
CCR5	MIP-1a, MIP-1b, RANTES
CCR6 (només LC)	MIP-3a
CXCR1	IL-8
CXCR4	SDF-1
<b>CD madures</b>	
CCR7	MIP-3b, SLC (6CKine)

Taula 5. Expressió de receptors de quimioquines per les CDs: MIP, *macrophage inflammatory protein*; RANTES, *regulated on activation, normal T expressed and secreted*; MCP, *monocyte chemoattractant protein*; TARC, *thymus and activation-regulated chemokine*; MDC, *monophage derived chemokine*; SDF, *stromal derived factor*; IL, *interleukion*; SLC, *secondary lymphoid-tissue chemokine*.

Dins dels teixits del cos, les CDs es troben tant com cèl·lules immadures com madures. En estat immadur de desenvolupament les CDs resideixen en teixits perifèrics on exploren l'ambient per detectar senyals d'infecció. Es denominen cèl·lules velades per presentar

vellositats en lloc de dendrites. Les CDs estan presents en la sang on elles i els precursors dels macròfags existeixen com a poblacions fenotípicament, morfològicament i funcionalment diferents dels monòcits expressant nivells baixos de CD2. Aquestes CDi migren cap a teixits no limfoides en resposta a estímuls antigènics. Aquest reclutament implica la interacció de les CDs amb l'endoteli vascular i la matriu extracel·lular via molècules d'adhesió i quimioatracients. Les CDi expressen molècules d'adhesió i receptors de quimioquines CC (CCR) que dirigeixen la migració cel·lular [112]. Diferents subtipus de CDs disposen d'una sensibilitat única per certes quimioquines. En la Taula 5 es mostren com diferents CDi responen a un ampli espectre de quimioquines a través del seus receptors específics.

### ***1.4.2.2.3.2. Captació, processament i presentació d'antígens***

L'inici i la propagació de les respostes immunes depenen normalment de l'habilitat de les CDs de capturar antígens, convertir proteïnes en pèptids, carregar-los intracel·lularment en els MHC i aleshores alliberar els complexos pèptid-MHC en la membrana plasmàtica. Les CDi (plasmacitoides i mieloides) són cèl·lules especialitzades en la captura de l'antigen via pinocitosi, endocitosi i fagocitosi, actuant com a cèl·lules sentinelles. No obstant tenen disminuïda la capacitat de presentar aquests antígens de manera eficient a les cèl·lules T [113].

La captació d'antígens la realitzen per diferents mecanismes com:

- 1) macropinocitosi, dependent de citoesquelet, que permet la captura de grans volums de fluid i soluts,
- 2) endocitosi mitjançada per receptors de tipus lectina com el receptor de manosa (CD206) o DEC-205 (CD205) [114], que s'expressen tant en CDmi [115] com en les CDp [116], DC-SING (DC *specific intracellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin* o CD209) i receptors Fc. Aquest últim receptor es degrada després de la internalització, mentre que el receptor de manosa es recicla, el que permet l'acumulació de lligands per un reduït nombre de receptors,
- 3) captura de cossos apoptòtics a través del receptor de vitronectina [117].

Les CDs reconeixen patògens tant de forma directa com indirecta via factors endògens com són citoquines i quimioquines, les quals són produïdes per altres tipus cel·lulars en resposta a la infecció. Tot i que els senyals indirectes en forma de factors endògens alerten les CDs, la seva activació directa mitjançant patrons moleculars associats a patògens (PAMP) és crucial per a la inducció de respostes primàries de cèl·lules T [118 119, 120].

## Introducció

Per realitzar el procés de captació de l'antigen les CDs reconeixen a les partícules microbianes mitjançant diferents receptors, com són els receptors de reconeixement (PRR) de patrons incloent als *Toll-like receptors* (TLR) principalment TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-8 i TLR-9, receptors de manosa i receptor *scavenger* i els receptors de tipus lectin-C (CLR) que reconeixen components estructurals de patògens i discriminen entre molècules pròpies i externes. A més, les CDs són capaces d'endocitar els complexos immunològics que contenen antigens opsonitzats per immunoglobulines i productes d'activació del complement. Aquests interaccionen amb receptors Fc per als anticossos i receptors del complement (CRs) expressats per les CDs. Els principals receptors per fagocitar immuno-complexos són CR3, receptor per al C3 i derivats, i FcγRs, receptors per a la IgG. Els microorganismes coberts per fragments derivats del C3 adquireixen la capacitat d'unir-se eficientment als receptors de complement [121, 122] i C3, que juntament amb altres molècules d'adhesió, faciliten l'entrada de diferents tipus de cèl·lules diana [123]. Els TLR detecten components de la paret cel·lular de bacteris, fongs i protozous en la superfície cel·lular o estructures bacterianes o d'àcids nucleics virals en un compartiment endosomal especialitzat, mentre que els CLR s'uneixen a estructures de carbohidrats associades a la paret cel·lular dels patògens [124, 125].

Després de la captació d'antigen, les CDs ràpidament creuen l'endoteli dels vasos limfàtics i migren cap a òrgans limfoides drenants secundaris. Durant la migració, les CDs pateixen un procés de maduració caracteritzat per una disminució de la capacitat de capturar antigen i un augment del processament i presentació d'antigen, de l'expressió de molècules coestimuladores com CD40 i CD86, un augment de la morfologia dendrítica i la secreció de diverses citokines i quimioquines que inicien i/o amplifiquen la resposta mitjançada per limfòcits T i B. Les característiques de les CDi i les CDm es descriuen en la Figura 8.

Tant les CDp com les CDmi estan especialment dissenyades, després del processament de l'antigen ingerit a pèptids, per dur a terme l'activació de les cèl·lules T naïve (sense contacte previ amb l'antigen específic). Els pèptids són carregats en les molècules de MHC I i II essent després transportats a la superfície cel·lular. S'ha demostrat que les molècules de MHC-II, després de la captació de l'antigen, desapareixen del compartiment endosomal de les CDs i incrementen en la membrana plasmàtica de manera que romanen durant un període de temps major en la membrana plasmàtica, per tal d'induir l'estimulació de les cèl·lules T [126]. En les àrees de cèl·lules T dels nòduls limfàtics, quan es dona la transformació definitiva a CDs madures (CDm), apareix l'expressió de molècules coestimuladores com CD80-CD86, que són crucials per a que les cèl·lules actuïn com a APC [127].

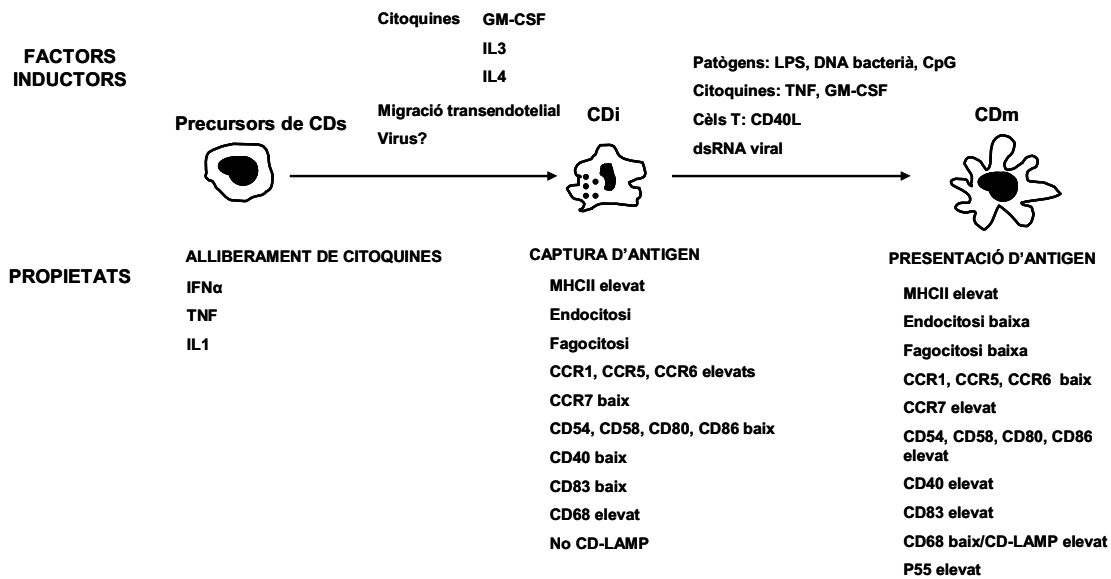


Figura 8. Maduració de les CDs. En la part superior de la figura es mostren els factors que indueixen la progressió d'un estat a un altre. (GM-CSF, *granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*; IL, interleucina; LPS, lipopolisacàrid; TNF, *tumor necrosis factor*; dsRNA, *double-stranded RNA*); la part inferior mostra les principals característiques de cada estat de diferenciació/maduració (IFN, interferó; MHCII complex major d'histocompatibilitat II; LAMP, *lysosome-associated membrane protein*).

En contrast amb les CDM, les CDi, tant plasmacitoides com mieloides, expressen menys quantitat de molècules MHC II i no expressen molècules coestimuladores, essent així incapaces d'induir l'activació de les cèl·lules T.

#### 1.4.2.2.3.3. Capacitat de captació d'antígens i fagocitosi de les Cèl·lules Dendrítiques

Una de les principals funcions de les CDM és que són potents APCs capaces d'activar a les cèl·lules T *helper* memòria i indiferenciades, cèl·lules T citotòxiques i cèl·lules B [70]. Les CDM poden estimular a les cèl·lules T per processament i presentació de pèptids antigènics dins del context de les molècules MHC de classe I i II [128].

La capacitat fagocítica de les CDi és menor que en altres cèl·lules fagocítiques, com per exemple els macròfags. Les CDi tenen capacitat fagocítica tot i que la seva funció no és la d'eliminar als microorganismes, sinó la presentació de l'antigen. No obstant, necessiten de la fagocitosi i dels mecanismes d'eliminació del microorganisme per processar i presentar els antígens en el context del MHC de classe I i II. Els fagocits professionals han evolucionat cap a la internalització i eliminació de bacteris. Pel contrari, les CDi limiten la seva capacitat fagocítica després de la ingestió del microorganisme o antígens estranys, tant pel programa de

## Introducció

maduració com el de l'activitat migratòria [129]. Per aquesta raó la capacitat fagocítica de les CDs madures està altament disminuïda. Diversos estudis han demostrat que les CDi poden fagocitar eficientment una sèrie de partícules antigèniques, com poden ser diversos llevats com el *Sacharomyces cerevisiae* i bacteris com *Corynebacterium parvum*. També fagociten partícules de zymosan i partícules de làtex d'un diàmetre entre 0.5 i 6 µm [130]. No obstant, la seva capacitat fagocítica es veu disminuïda front a altres tipus de bacteris, per exemple *Streptococcus gordonii*, que indueixen la maduració de les CDi, per la qual cosa la capacitat fagocítica es veu disminuïda després de la ingesta de la mateixa [129].

Les CDs òbviament destrueixen els patògens ingerits. Tot i que utilitzin alguns dels mecanismes típics de mort propis dels fagocits professionals, la principal funció de les CDs és la captació d'antígens per al seu processament, i així dur a terme la presentació dels mateixos a les cèl·lules T. Les CDi internalitzen major quantitat d'antigen que les CDm, ja que actuen com sentinelles per als patògens entrants, mentre que la presentació d'antigen a les cèl·lules T és dut a terme per les CDm, que tenen disminuïda la seva capacitat fagocítica en favor de la seva funció com a APCs [131].

### **1.4.2.2.3.4. Activació de les cèl·lules dendrítiques i maduració**

La maduració de les CDs és un procés continu que s'inicia en els teixits perifèrics quan la CD entra en contacte amb l'antigen i/o amb citoquines inflamatòries, i es completa durant la interacció CD-limfòcit T. Constitueix una sèrie de canvis coordinats, que inclouen la disminució de la macropinocitosi i els receptors Fc, la transició dels compartiments rics en MHC-II a la superfície cel·lular en forma de complexos peptídics, l'augment de molècules accessòries coestimuladores, secreció de citoquines, canvis en el patró de receptors per quimioquines, canvis morfològics, etc. En la Figura 8 es mostren els canvis que experimenta la CD en passar a l'estadi de maduresa. La maduració representa un punt de control per l'inici de la immunitat [68]. La maduració de les CDs està íntimament lligada amb la seva migració des dels teixits perifèrics cap als òrgans limfoides.

Molts factors estan implicats en la inducció de la maduració:

- Productes derivats de patògens virals o microbians, del tipus LPS, CpG DNA, o dsRNA. Per molts d'aquests els receptors TLR juguen de manera directa o indirecta un paper crític. La presència de receptors TLR en la maduració proporciona un mecanisme atractiu pel qual les CDs actuarien de nexa entre la immunitat natural i l'adquirida.

- Citoquines proinflamatòries tals com TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, i prostaglandines com per exemple PGE<sub>2</sub> [132]. La interacció a través dels receptors de la família TNF per aquestes citoquines, provoca l'activació de NF- $\kappa$ B [133].
- La interacció amb els limfòcits T, també provoca la maduració de la CD, via CD40L, i per la secreció de IFN- $\gamma$  que sinergitza amb altres senyals maduratives i estimula la secreció de IL-12 [134, 135].
- Altres situacions poden provocar la maduració de les CDs, com és la presència de proteïnes d'estrès tèrmic (HSP-70) [136], com a resultat d'una destrucció tissular. En els cultius *ex-vivo*, s'ha descrit que la pròpia disgregació dels contactes cèl·lula-cèl·lula provoca la maduració [137, 138].

De manera continuada es descriuen factors nous que provoquen o modulen la maduració. Per contra alguns factors s'han descrit com a inhibidors de la maduració de les CDs, i per tant de la seva funcionalitat. La presència de IL-10 en el moment d'induir la maduració inhibeix l'expressió de CD80, CD86, i de les molècules de MHC-II. També té un efecte inhibitori en l'expressió de CD83 i de la secreció de citoquines, en concret IL-12 (quan han estat activades amb LPS), i TNF- $\alpha$ . La IL-10 no té el mateix efecte en cèl·lules plenament madures, i no sembla afectar a la seva funcionalitat.

Major controvèrsia susciten les prostaglandines (en concret PGE<sub>2</sub>). Alguns estudis la presenten com una molècula inhibidora de la maduració, mentre que en altres situacions esdevé un factor clau en la maduració "total" de les CDs. No sembla afavorir la secreció de IL-12 [139], però incrementa tant l'expressió de les molècules coestimuladores, així com l'expressió *de novo* del receptor de quimioquines CCR7, que està associat a la capacitat de les CDs per migrar a través de l'endoteli limfàtic i concentrar-se dins de les àrees riques en cèl·lules T [103, 140, 141, 142]. És molt possible que el benefici que aporta en l'augment de la capacitat estimuladora de les CDm la presència de PGE<sub>2</sub> [143], pugui contrarestar l'efecte antagonístic que té sobre la IL-12 [144].

Els canvis morfològics que acompanyen a la maduració de les CDs inclouen una pèrdua d'estructures d'adhesió, reorganització del citoesquelet, i adquisició d'elevada motilitat cel·lular.

Es requereixen diversos agents estimuladors, principalment d'estímuls bacterians (LPS, CpG) amb ajuda de la senyalització T a través de CD40-CD40L [145], per assolir la maduració completa de la CD i molt possiblement la secreció de la forma activa de la IL-12 només tingui lloc dins una curta finestra d'activació (8-16 hores).



## Introducció

La família de les molècules coestimuladores B7, també es veu fortament regulada durant la maduració i influencia la polarització cap a Th1 o Th2. Per exemple, CD86 augmenta marcadament durant la maduració, i s'expressa *de novo* en els conjunts de MHC-pèptids. Altres molècules que augmenten són B7-DC/PD-L2, que estimulen la producció de citoquines de tipus Th1 per limfòcits T immadurs [146] i B7-H3, una molècula homòloga a B7, clonada en CDs, la qual estimula la producció de IFN- $\gamma$ . Per contra, durant la maduració disminueix la expressió del lligand de ICOS, el qual potencia la polarització cap a Th2. A més s'expressen diverses molècules d'adhesió que inclouen CD2, CD11a, CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA-3) i les integrines  $\beta 1$  i  $\beta 2$  (90). Així, les CDs activades alliberen citoquines com IL-12, la qual modula i estimula la producció de IFN- $\gamma$  per les cèl·lules T i NK, activen a cèl·lules T, les quals migren als fol·lícles de cèl·lules B, via activació de molècules d'adhesió que interactuen amb cèl·lules B antígen-específiques. Producte d'aquesta interacció es produeix una expansió clonal de cèl·lules B, les quals arriben a les àrees riques en cèl·lules T i als centres germinals (91). La resposta mitjançada per limfòcits T i B inclou:

- 1) inducció de limfòcits T CD4<sup>+</sup> i diferenciació en els subtipus Th1 i Th2,
- 2) activació i augment de la citotoxicitat mitjançada per limfòcits T CD8<sup>+</sup>,
- 3) maduració de limfòcits B, canvi de la classe d'immunoglobulines i producció d'anticossos [84].

Un concepte molt recent que s'està introduint és l'estadi semi-madur de les CDs [148]. Les CDs en aquest estadi podrien induir tolerància. Entre els factors que induirien aquest estadi de semi-maduració hi hauria: el TNF- $\alpha$ , la flora intestinal, les cèl·lules apoptòtiques, etc. Les CDs semi-madures expressarien nivells elevats de molècules presentadores d'antigen, alts nivells de molècules coestimuladores, però no produirien les citoquines responsables de la generació d'una resposta per part dels limfòcits T. Les CDs en aquest estat serien el major component de l'homeòstasi immunitària, donant lloc a l'establiment d'una tolerància activa i permanent i a la inducció de limfòcits T CD4<sup>+</sup> reguladors. En aquest estat, les cèl·lules són susceptibles de respondre a estímuls de tipus LPS, a través de TLRs, acabar la seva maduració i generar en aquest cas una resposta immunitària.

### ***1.4.2.2.3.5. Migració de les cèl·lules dendrítiques: CCR7 i CCL21***

Les CDs migren des dels teixits perifèrics als nòduls limfàtics per estimular els limfòcits T en aquestes àrees i activar la resposta immune. La migració de les CDs cap a les àrees de les cèl·lules T requereix la sobrerregulació del receptor de quimioquines CCR7, un esdeveniment que té lloc durant el procés de maduració de les CDs, juntament amb CCR3, les quimioquines CCL21 i CCL19 i molècules d'adhesió com ICAM-1, ICAM-3, tenint un paper crucial en la migració de les CDs.

Les quimioquines són petites citoquines quimiotàctiques (8-10 kDa) que regulen la migració i la localització dels leucòcits en diferents teixits [149]. Diferents tipus cel·lulars, incloent cèl·lules de l'estroma, epitelials i endotelials, secreten quimioquines, tant sota condicions inflamatòries com homeostàtiques. Les quimioquines s'uneixen als dominis 7 transmembrana de receptors acoplats a proteïna G (GPCR). Entre aquests receptors, CCR7 és altament expressat en CDm, i els seus lligands, CCL21 i CCL19 són expressats als nòduls limfàtics i a la melsa [120]. A més, CCL19 s'expressa en les CDm, i CCL21 és expressat per cèl·lules endotelials dels vasos limfàtics aferents i de les venes altes endotelials. A més, CCL21 i CCL19 són potents estimuladors de la maduració de les CDs. La importància d'aquest receptor en les respostes immunes s'ha vist clarament en ratolins deficientes en CCL19 i CCL21 o CCR7 que mostren un tràfic defectuós de CDs i respostes immunes alterades [120, 150, 151]. Recentment s'ha suggerit que CCR7 expressat en diferents línies de cèl·lules metastàtiques poden dirigir aquestes cèl·lules als seus nínxols.

Els receptors de quimioquines confereixen a les cèl·lules l'habilitat de detectar i moure's de forma direccional cap a l'estímul quimiotàctic. Sovint els receptors de quimioquines regulen la velocitat de migració de les cèl·lules (també denominat migració a l'atzar o velocitat no direccional). Tot i la importància cardinal de CCR7 en la resposta immune, poc és conegut dels senyals induïts per aquest receptor i com són integrats en les funcions motrius de les CDs. No està clar si les vies de senyalització que regulen la quimiotaxis i la velocitat de migració estan unides o bé són independents l'una de l'altra.

Alguns estudis recents han mostrat funcions addicionals de CCR7 en les CDs, a part de la quimiotaxi. S'ha vist que l'estimulació de CDs per part de CCR7 indueix l'aparició de dendrites, indicant que CCR7 pot regular la citoarquitectura d'aquestes cèl·lules [151]. També s'ha vist que l'estimulació de CCR7 amb els lligands CCL19 i CCL21 regula positivament la velocitat d'endocitosis de les CDm [151], restablint en aquestes cèl·lules l'habilitat d'incorporar antígens exògens, un tret típic de les CDi [151]. Aquest fet també s'ha vist en les molècules coestimuladores CD40 i B7-CD.

## Introducció

L'estimulació de CCR7 en les CDm protegeix aquestes cèl·lules de l'apoptosi, de manera que regula la seva supervivència i pot contribuir en la ruta o dins dels nòduls limfàtics en l'extensa longevitat d'aquestes cèl·lules i a una millora de la resposta immune [151].

Recentment s'ha vist que l'estimulació de CCR7 augmenta el fenotip madur de les CDs exposades prèviament a un estímul microbià, guiant la secreció de citoquines inflamàtores, un increment en els nivells de MHC i molècules coestimuladores, i la potenciació de l'habilitat de les CDs per activar limfòcits T naive [151]. Mitjançant diferents estudis s'ha vist que les tres funcions controlades per CCR7 en CDs, supervivència, velocitat de migració i quimiotaxi estan regulats per tres mòduls de senyalització independents, tal i com es descriu a la Figura 9 [150, 151]. La quimiotaxi està regulada pels tres membres de la família de les MAPK, ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kianses*), JNK i p38 [150, 151]. La velocitat de migració està regulada per la via de senyalització Rho/Pyk2/cofilin. Mentre que la supervivència de les CDs està regulada per la via PI3K/Akt i el factor de transcripció NF- $\kappa$ B [151].

Altres autors han indicat que l'endocitosi regulada per CCR7 està controlada per un conjunt de molècules que són independents d'aquelles que regulen la quimiotaxi [152]. Es desconeix si el control de la maduració i de la citoarquitectura es dur a terme amb algun dels mòduls o no.

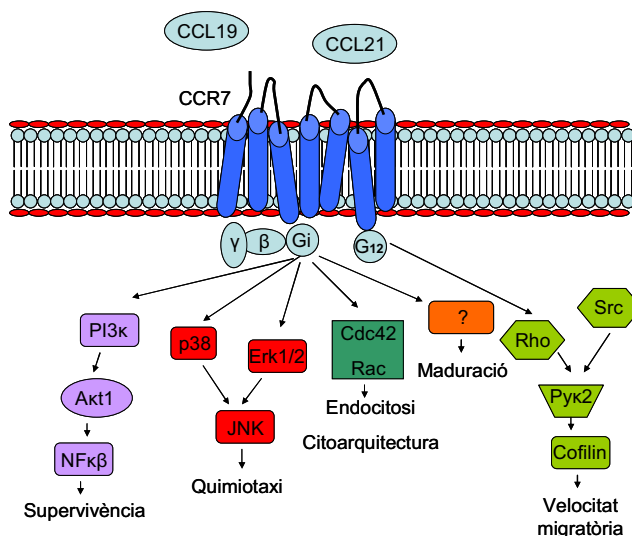


Figura 9. Funcions que exerceix CCR7 sobre les CDs: control de la supervivència, quimiotaxi i velocitat migratòria. Es desconeix el mecanisme de control de la maduració, l'endocitosi i la citoarquitectura. Figura adaptada de Sánchez-Sánchez N. [151].

### 1.4.2.2.4. Interacció Cèl·lula Dendrítica-Limfòcit T

Durant l'activació de la cèl·lula T es requereix d'un contacte denominat "sinapsi immunològica" [153]. Per a què es doni una eficient resposta immune, el TCR en el limfòcit, s'uneix a la CD per mitjà de la molècula MHC formant-se el complex pèptid/MHC (senyal 1).

Aquests complexos es troben inicialment en la perifèria de l'anell d'unió, però al cap de pocs minuts s'acumulen en el centre de la sinapsi. La segona fase d'aquesta interacció té lloc als pocs segons. Senyals de calci, seguits pel reclutament de molècules de senyalització com LCK, ZAP70, PIK3 i la seva fosforilació, activen la cascada intracel·lular. Al cap de 5-30 minuts d'una contínua interacció es forma una unió cèl·lula-cèl·lula, definida com una segregació molecular que condueix a una zona central que és acompanyada per un reclutament d'una gran quantitat de molècules accessòries que expressen les CDs com CD80, CD86 i CD40, i la seva interacció amb els lligands de les cèl·lules T (CTLA-4, CD28 i CD40L respectivament), coneguda aquesta com senyal 2. En la Figura 10 podem observar les molècules implicades en la sinapsi immunològica.

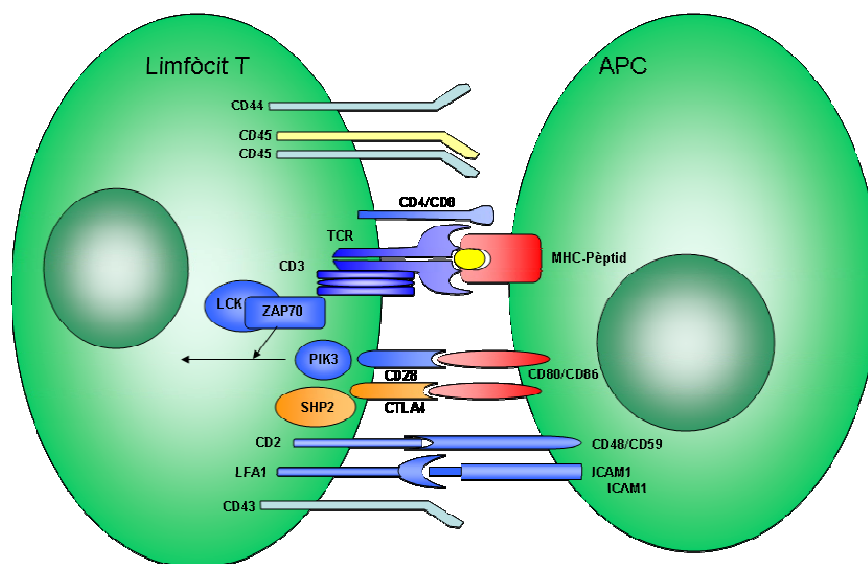


Figura 10. Sinapsi immunològica.

Molècules involucrades en la interacció de la cèl·lula presentadora d'antigen (APC) y la cèl·lula T. Figura modificada de Huppa J.B. [154].

Per últim la resolució d'aquesta unió té lloc quan la cèl·lula T i la CD són separades, donant com a resultat la migració d'aquestes últimes [155].

Les CDs secreten per si soles nombroses citokines durant el procés de maduració, entre les quals destaquen IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i IL-12. Aquesta última és essencial per a l'activació i la polarització dels limfòcits cap al subtipus Th1 els quals secreten principalment IL-2 i IFN- $\gamma$  que promouen la immunitat cel·lular, mentre que els limfòcits Th2 secreten IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10, que faciliten la resposta humoral. Aquest és el denominat senyal 3 implicat en la sinapsi immunològica donat pel microambient en el qual té lloc la interacció.

## Introducció

### **1.4.2.2.5. Les cèl·lules dendrítiques com a inductores de tolerància**

La tolerància definida també com absència d'autoimmunitat antígen-específica és atribuïda a la manca d'accessibilitat de l'antigen, absència de cèl·lules T (deleció) o manca de senyals d'activació suficient, durant el procés de selecció clonal en el timus. A més existeixen altres mecanismes implicats en la tolerància a nivell perifèric que inclouen anèrgia o apoptosi de cèl·lules T reactives, inducció de cèl·lules T reguladores i citoquines immunoreguladores secretades per cèl·lules T [114].

Les cèl·lules T regulen o suprimeixen a altres cèl·lules T efectores per mitjà de cèl·lules T naturalment reguladores (Treg), cèl·lules T *helper* tipus 3 (Th3), i cèl·lules T reguladores de tipus 1 (Tr1) que bloquegen la funció d'altres cèl·lules efectores CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>. El terme Treg s'utilitza per denominar les cèl·lules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, que són generades en l'epiteli cortical del timus i que migren a la perifèria després de patir la selecció negativa. Constitueixen aproximadament el 5-10% de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> de sang perifèrica. Es caracteritzen per expressar constitutivament el receptor de glucocorticoides induït per TNF (GITR), la proteïna relacionada amb la família de la L-selectina (CD62L), CTLA-4 (CD152), CD45RB, la integrina  $\alpha_4\beta_7$ , i el factor transcripcional Foxp3. En canvi el terme Tr1 és utilitzat per les cèl·lules T reguladores induïdes, els precursors dels quals són CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> generats en la perifèria, i que són productors de IL-10 i TGF $\beta$ , controlant la funció de les cèl·lules T de memòria i suprimint la resposta Th1 i Th2 [156]. Les cèl·lules reguladores Th3 són l'únic subgrup que primàriament secreten TGF $\beta$ , donant ajuda per a la síntesi de IgA i disposant de propietats supressives a cèl·lules Th1 i Th2 [157].

Les CDs també estan implicades en la inducció de tolerància central i perifèrica. En absència de senyals inflamatoris o estímuls infecciosos, denominat "*steady-state*", moltes CDs es mantenen en estat immadur, amb capacitat d'endocitar, processar i presentar antígens en la forma de complexos pèptid-MHC classe I o II, però incapaces d'iniciar la diferenciació de cèl·lules T efectores i de memòria. Aquestes CDs "*steady-state*" són responsables de diferents formes de tolerància perifèrica, com deleció, anèrgia o l'expansió de cèl·lules T reguladores [158], tal i com es pot veure a la Figura 11.

Tant les CDi plasmacitoides com mieloides han estat descrites com inductores de tolerància de les cèl·lules T [76, 114, 159]. En absència d'inflamació o infecció hi ha evidències que les CDi controlen la tolerància perifèrica. S'ha vist que les CDs poden induir la producció de IL-10, principal citoquina antiinflamatòria, secretada principalment per limfòcits T, monòcits i macròfags, donant lloc a cèl·lules CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> reguladores [160]. En consonància amb això s'ha descrit que tractaments *in vitro* de CDi exposades a IL-10 mostren

una capacitat fortament reduïda per estimular una resposta de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>, que a la vegada secreten IL-10 i suprimeixen la resposta *in vitro* de cèl·lules T naïve [161]. Pretractaments de CDs amb IL-10 inhibeixen la maduració d'aquelles que sota estimulació de LPS secreten citocines proinflamatòries que inclouen IL-1β, IL-6, IL-12p70 i TNFα, regulant positivament l'expressió de molècules coestimuladores com CD80, CD86 i també CD40 i indueixen la proliferació de limfòcits T [162]. No obstant, altres investigadors han demostrat que les CDs pretractades amb IL-10 romanen inalterades en l'expressió de molècules coestimuladores i en la seva capacitat fagocítica. En canvi, per a que la immunitat mitjançada per CDs es desenvolupi, aquestes cèl·lules han d'estar exposades a estímuls de maduració, com el desencadenat pel CD40.

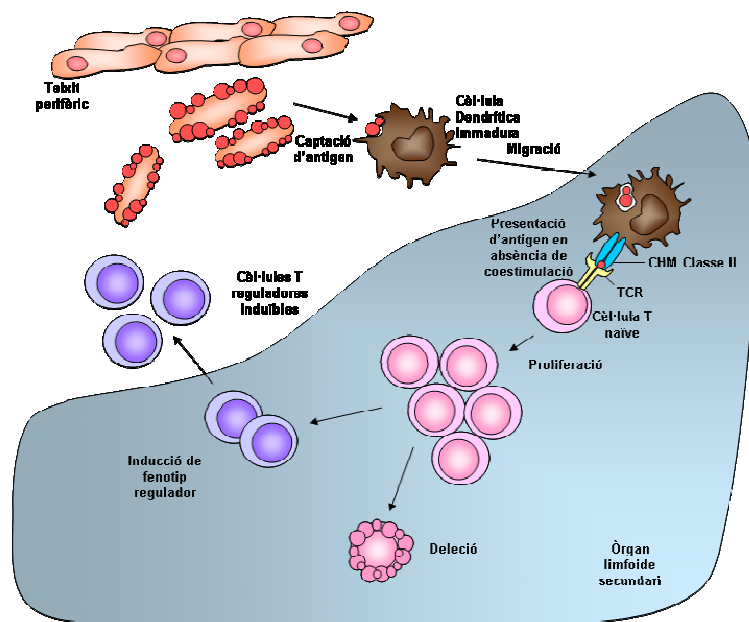


Figura 11. Generació de Tolerància. Cèl·lules dendrítiques en estat immadur o en absència de coestimulació condueixen a tolerància per deleció de cèl·lules T autoreactives o inducció de cèl·lules T reguladores. Modificada de Banchereau J. [163].

La presència de CDs en la medul·la del timus suggereix que poden participar en l'establiment de tolerància central. A més a més, la unió d'anticossos antigen específics a algunes molècules de la superfície de les CDs indueix tolerància específica de cèl·lules T.

En el trasplantament d'òrgans, la tolerància és definida com un estat en el qual es troba absència de tota reacció de rebuig eficient contra un antigen i de les estructures cel·lulars relacionades. Estudiant el mecanisme de la tolerància central i perifèrica, un procés fisiològic el qual actua per eludir una possible activació de cèl·lules T autoreactives, nombrosos estudis experimentals han documentat el paper central jugat per les CDs en aquest procés.

En el context del trasplantament, està ben documentat que les CDs són iniciadores clau de la resposta immunitària que condueix al rebuig agut. A més a més, la presentació d'antigen

## Introducció

per CDs de l'hoste cap a les cèl·lules T durant l'al·loreconeixement indirecte, ha estat suggerit per ser parcialment responsable d'induir rebuig crònic. Donades aquestes circumstàncies, la manipulació de CDs ha esdevingut una idea molt atractiva per induir tolerància permanent en el trasplantament.

### ***1.4.2.5.1. Manipulació farmacològica per a la generació de cèl·lules dendrítiques tolerogèniques***

Hi ha una gran varietat d'agents farmacològics que inhibeixen la maduració de les CDs, adquirint així propietats tolerogèniques. S'ha mostrat que la vitamina D3 inhibeix la maduració de les CDs, la seva funció estimuladora de cèl·lules T i la seva capacitat de secretar IL-12. Aquest compost exerceix la seva acció unint-se a un receptor específic (receptor de vitamina D, VDR) expressat en CDs immadures. La senyalització de VDR indueix el manteniment del fenotip immadur en CDs derivades de monòcits *in vitro*. A més, s'ha vist que la inhibició de la maduració per la vitamina D3 en ratolins que els manca el receptor VDR és absent. El mecanisme derivat de VDR és associat amb la inhibició de la sobrerregulació de CD86, CD80 i CD40, capacitat danyada de CDs per estimular cèl·lules T al·logèniques i la inhibició de IL12-p75 donant lloc a una menor resposta cel·lular. Quan les CDs derivades de donadors condicionats amb vitamina D3 s'injecten *in vivo* en receptors al·logènics, indueixen la supervivència prolongada d'empelts de pell [164].

L'immunosupressor 15-deoxispergualina permet la prevenció del rebuig de l'empelt i indueix tolerància en models murins d'al·lotrasplantament. Té un efecte tolerogènic en CDs immadures. Quan les CDs són exposades *in vitro* a aquest immunosupressor abans de la maduració amb TNF- $\alpha$  o LPS, les cèl·lules fallen en la sobrerregulació dels seus marcadors superficials (MHC-II, CD86, CD80, CD40) i mostren una producció de IL-12 destacada. [164].

## **1.5. CD40-CD40L, NEXE ENTRE LA IMMUNITAT INNATA I LA IMMUNITAT ADQUIRIDA**

La unió de CD40 amb la molècula CD40L participa, juntament amb CD28-B7, en la coestimulació de la cèl·lula T, i alhora, condueix a l'activació de les APCs a través de la inducció de la sobreexpressió de diferents molècules d'adhesió (E-selectina, V-CAM i I-CAM), l'alliberament de citoquines proinflamàtores (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL8, IL-10 i IL-12) i l'expressió, en la superfície cel·lular, de MHC-II, Fas i altres molècules coestimuladores com, CD32, CD80 i CD86. Tot això, finalment, resulta en l'increment de la funció de presentació d'antigen per part d'aquestes cèl·lules.

La interacció entre CD40 i CD40L juga un paper important en diferents aspectes de la resposta immunitària humoral i cel·lular. Aquesta interacció és essencial en l'activació dels limfòcits T [165, 166], per a potenciar la capacitat de presentació d'antigen de les APCs, en l'activació de les cèl·lules B (induint la seva proliferació i en el control del canvi d'isotip de les IgG) i en l'activació de cèl·lules epitelials i endotelials, involucrades en processos inflamatoris.

La importància de la interacció CD40-CD40L en la resposta immune es va posar de manifest per primera vegada en pacients amb Síndrome Hyper IgM (HIM), on mutacions en CD40L que impedeixen la seva unió a CD40, causen una immunodeficiència que es manifesta per una elevada susceptibilitat a infeccions bacterianes, a causa de la incapacitat de dur a terme una resposta immune humoral adequada.

### **1.5.1 CARACTERÍSTIQUES DEL CD40 I DEL CD40L**

#### **1.5.1.1 CD40**

**CD40** és una glicoproteïna de membrana de 45-50 kDa membre de la superfamília de receptors del Factor de Necrosi Tumoral (TNFR). També rep el nom de TNFRSF5 (*tumor necrosis factor receptor superfamily 5*).

##### **1.5.1.1.1 Estructura de CD40**

La proteïna CD40 humana va ser identificada en limfòcits B l'any 1984 utilitzant anticossos monoclonals, encara que el cDNA no va ser aïllat fins 5 anys després a partir d'una genoteca de cèl·lules Raji derivada d'un limfoma de Burkitt.

El gen que codifica pel CD40 es troba en el cromosoma 20 (q11-q13.2). El seu mRNA té 1.5 kb i està format per 9 exons i 8 introns [167].



## Introducció

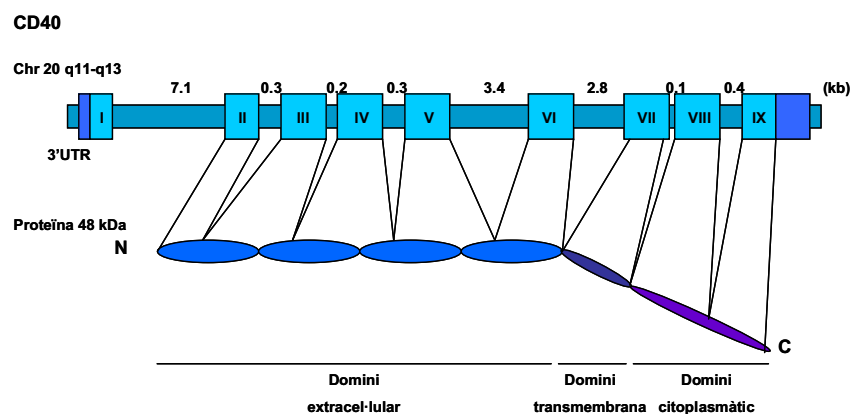


Figura 12. Estructura i organització del gen i la proteïna de CD40. Modificat de van Kooten C.[175].

La regulació de la via de senyalització de CD40 està mitjançada per diferents mecanismes de control endògens i és específica del tipus cel·lular. L'expressió de CD40 està regulada posttranscripcionalment i s'han descrit múltiples isoformes del mRNA de CD40 generades per *splicing* alternatiu.

La transcripció del gen dona lloc a una proteïna de 255 aa dels quals 22 formen part d'un domini transmembrana que connecta amb un domini extracel·lular de 171 aa i un domini intracel·lular de 62 aa. Tal i com es dona en altres membres de la família de TNF-R, la proteïna CD40 es caracteritza per presentar 4 dominis extracel·lulars enriquits en cisteïna, de 45 aa cadascun, amb 6 residus de cisteïna formant 3 ponts disulfur [168]. La molècula de CD40 presenta dos llocs de glicosilació altament conservats en la seva seqüència (Asn153, Asn180).

El domini intracel·lular de la proteïna CD40, que no presenta semblança amb el d'altres membres de la família, conté diferents dominis d'unió a proteïnes adaptadores que serien importants en la transducció de senyals.

### 1.5.1.1.2 Expressió de CD40

CD40 va ser descrit per diferents grups de manera independent l'any 1984, els quals identificaven un polipèptid d'aproximadament 50 kDa en la superfície dels limfòcits B de carcinoma [169]. Inicialment se li va donar el nom de p50 o Bp50, més tard CDw40 i finalment l'any 1989 es va anomenar CD40. Posteriorment s'ha vist que CD40 s'expressa de forma constitutiva en una àmplia varietat de tipus cel·lulars. A més de les APCs (cèl·lules B, CDs, monòcits/macròfags), també expressen CD40 les cèl·lules T, cèl·lules epitelials, cèl·lules endotelials, queratinòcits i fibroblasts [170, 171, 172]. L'estimulació d'aquestes cèl·lules amb les citoquines proinflamàtores IL-1, IL-3, TNF- $\alpha$ , GM-CSF i INF- $\gamma$ , incrementa l'expressió de CD40 *in vitro* [170]. Aquesta expressió induïda de CD40 s'observa 6-12 hores després de

l'estimulació, assolint un màxim d'expressió a les 24 hores que persisteix fins a 24-72 hores després.

### 1.5.1.2. CD40 L

El lligand de CD40, **CD40L** (CD154, TNFSF5, gp39), és una glicoproteïna de membrana de tipus II de 32-39 kDa, membre de la superfamília del Factor de Necrosi Tumoral (TNF).

#### 1.5.1.2.1 Estructura del CD40L

El cDNA del CD40L es va aïllar inicialment en limfòcits de sang perifèrica. El gen que codifica pel CD40L humà es troba en el cromosoma X (q26.3-q27.1) i consta de 5 exons i 4 introns (Figura 13). Una vegada transcrit, aquest gen dóna lloc a un mRNA de 2,3 kb que codifica per a una proteïna de 261 aa. El domini intracel·lular aminoterminal (22 aa), el domini transmembrana (24 aa) i una petita part del domini extracel·lular enriquit en cisteïna, estan codificats per l'exó I, mentre que els exons II-V codifiquen per la resta del domini extracel·lular de la proteïna (215 aa). De la mateixa manera que altres membres de la família de TNF, CD40L s'uneix al seu receptor com a un complex multiproteic.

A més de la forma transmembrana de 39 kDa, CD40L existeix en forma soluble (sCD40L). S'han caracteritzat tres fragments biològicament actius, de 31, 18, i 14 kDa obtinguts a partir de la seva divisió proteolítica del domini extracel·lular de la proteïna ancorada a la membrana en el moment de l'activació dels limfòcits T [173]. La forma soluble majoritària de CD40L té un pes molecular de 18 kDa i es troba en forma oligomèrica i sobretot trimèrica [174].

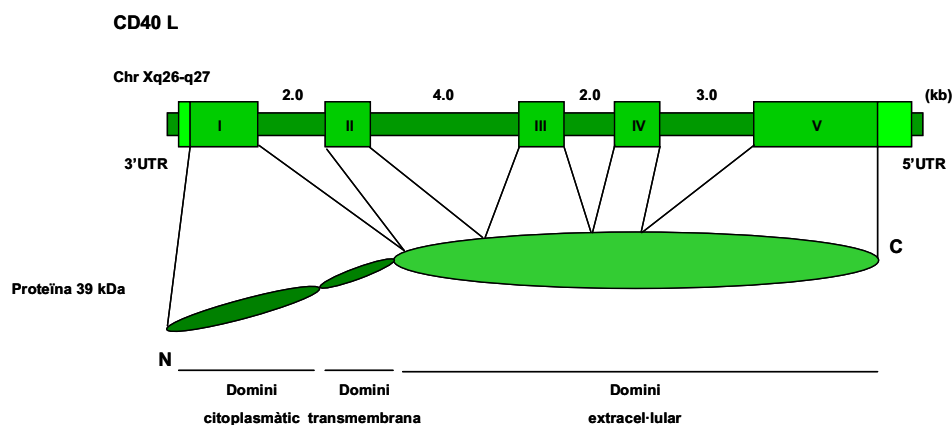


Figura 13. Estructura i organització del gen i la proteïna de CD40L. Modificat de van Kooten C. [175].

## Introducció

### **1.5.1.2.2 Expressió de CD40L**

CD40L s'expressa predominantment en cèl·lules T CD4 activades, però també s'ha descrit en cèl·lules T CD8 i altres tipus cel·lulars com plaquetes, eosinòfils, mastòcits, basòfils, cèl·lules NK, cèl·lules endotelials, CDs, cèl·lules de la musculatura llisa i macròfags [171, 172].

A diferència de CD40, aquestes cèl·lules no expressen el lligand de forma constitutiva, sinó que la seva expressió és induïble. En limfòcits T l'expressió de CD40L és transitòria, la proteïna s'expressa en la superfície cel·lular 5 minuts després de la seva activació, però a partir de les 6 hores té lloc una disminució de la seva expressió, que desapareix completament a les 12-24 hores postactivació. Aquest patró de regulació també ha estat descrit per altres tipus cel·lulars que expressen la proteïna. En limfòcits T aquesta expressió està regulada principalment a través del TCR però també hi intervenen altres molècules coestimuladores i molècules accessòries presents en les APCs. A més de la senyalització a través del TCR, les citoquines proinflamàtores IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$  o INF- $\gamma$ , i glucocorticoides, indueixen l'expressió de CD40L en limfòcits T, probablement per activació dels factors de transcripció AP1 i NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) [176, 177]. S'ha descrit que CD40L és capaç d'induir la seva pròpia expressió després de la unió al seu receptor [178].

### **1.5.1.2.3. Altres potencials lligands de CD40**

CD40 interacciona amb el seu lligand, CD154 que es troba principalment en les cèl·lules T, jugant un paper clau en les respostes immunes tant humoral com mitjançades per cèl·lules. L'activació de CD40 en les cèl·lules B a través del lligand CD154 causa la proliferació, diferenciació i el canvi d'isotip de les cèl·lules B, la formació de centres germinals i l'estimulació de la resposta de la memòria humoral. S'ha vist que CD40 fa de mitjancer en una àmplia varietat de respostes immunes i inflamàtores [176]. Dins la cèl·lula, la molècula de CD40 actua com a transductor de la senyal transmembranal que porta a l'activació de quinases intracel·lulars i factors de transcripció.

Becker l'any 2002 [179] va trobar que macròfags de ratolí que expressaven específicament CD40 s'unien i internalitzaven HSP70 humà (*Heat-shock 70 kDa protein 1A*) amb el seu pèptid d'unio. La unió d'aquest complex HSP70-pèptid al domini exoplasmic incrementava en presència del substrat peptídic, i la unió induïa la via de senyalització de p38 (MAPK14, *Mitogen-activated Protein Kinase 14*). El grup de Becker va concloure que CD40 té el paper de mitjancer en la captació dels complexos HSP70-pèptid per macròfags i CDs.

L'any 2003, l'equip de Brodeur [180] va identificar una proteïna de 23 kDa que s'unia a CD40 com a C4BP $\alpha$ . L'anàlisi per Citometria de Flux demostrava la unió de C4BP a línies humanes de cèl·lules B que expressaven CD40, però no a cèl·lules procedents de pacients deficients en CD40. L'anàlisi d'unió competitiu mostrava que CD40L i C4BP s'unien a diferents llocs de CD40. C4BP induïa la proliferació i incrementava la regulació de l'expressió superficial de CD54 (ICAM-1) i CD86, i, juntament amb la síntesi de IL-4, la síntesi d'IgE en cèl·lules B normals, però no en cèl·lules B de pacients amb deficiències en CD40 o IKBKG (*Inhibidor de kappa light polypeptide gene enhancer in B cells, kinase of, gamma*). Anàlisis immunohistoquímics mostraven la colocalització de C4BP amb CD40 en cèl·lules B en els centres germinals tonsil·lars. L'equip de Brodeur va proposar que C4BP era un lligand activant per CD40 i representa la interfase entre el complement i l'activació de cèl·lules B. Les seves troballes van suggerir que C4BP podia proporcionar una via alternativa per l'activació de cèl·lules B a través del receptor CD40.

No obstant, un estudi recent [181] del 2007 mitjançant anàlisis de “*surface plasmon resonance*” (Biacore) amb proteïnes purificades suggereixen que C4BP no s'uneix a CD40, però forma complexos estables d'alt pes molecular amb el CD40L soluble (sCD154 o sCD40L). Van veure que C4BP pot modular la interacció CD40/sCD154 a través de la presentació d'un complex sCD154/C4BP multimèric d'alt pes molecular que suprimeix vies de senyalització intracel·lular crítiques i inhibeix completament l'apoptosi mitjançada per CD40, permetent la supervivència cel·lular sense induir proliferació. A més afirmen que C4BP no s'uneix directament a CD40. La presència de C4BP no preveu la unió de sCD154 a CD40. Aquests resultats demostren un mecanisme nou a través del qual components del sistema immune innat poden modular la supervivència de cèl·lules epitelials durant la inflamació i la infecció.

### 1.5.1.3 Transducció de senyals de CD40

Tal i com es dona en altres membres de la família de TNF-R, l'activació efectiva de la via de senyalització de CD40 requereix de la multimerització d'aquest receptor. Inicialment es pensava que la trimerització del receptor depenia de la seva unió amb el lligand CD40L (*the ligand induced trimerization model*). Estudis més recents suggereixen que, prèviament a la unió del lligand, cada molècula de CD40 podria associar-se amb ella mateixa formant una estructura trimèrica a través d'un domini anomenat PLAD (*pre-ligand binding assembly domain*) present a l'extrem N-terminal del domini d'unió al lligand en la seva regió extracel·lular. Per tant, el receptor CD40 podria expressar-se a la superfície cel·lular com un

## Introducció

complex preformat en comptes de com subunitats monomèriques (*the pre-ligand assembly model*) [182].

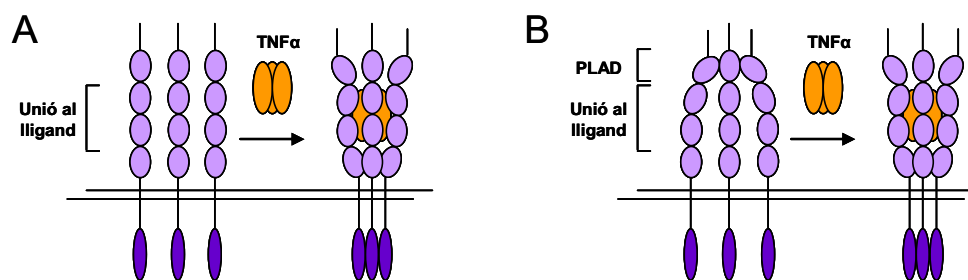


Figura 14. Model de senyalització per TNFR. A) *The pre-lig assembly model* i B) *The pre-ligand binding assembly domain*. Modificat de Chan F.K. [182].

Malgrat que la proteïna CD40 no presenta un domini intracel·lular amb activitat catalítica, l'oligodimerització del receptor CD40 induïda per la interacció amb el lligand CD40L desencadena el reclutament de molècules TRAF i/o altres proteïnes intracel·lulars, com són membres de la família dels STATS (*signal transducers and activators of transcription*), que s'uneixen al domini citoplasmàtic del receptor. Les proteïnes TRAFs o factors associats a la família de receptors de TNF són molècules adaptadores utilitzades per una àmplia varietat de receptors de superfície, entre ells el CD40, per transduir senyals intracel·lulars. Aquestes proteïnes TRAFs s'acoblen formant un complex de senyalització multiproteic que desencadena l'activació de cascades de quinases, com les MAPKs, Erk1/Erk2 i la via JNK, i fosfatases i l'estimulació de factors de transcripció de la família NF- $\kappa$ B (incloent els membres p50, RelA i c-Rel) [183], AP-1 i NFAT que finalment regulen la transcripció de gens implicats en la proliferació, diferenciació i apoptosi.

### 1.5.1.4 Funcions biològiques de CD40-CD40L

Les interaccions CD40/CD40L són claus en la regulació de nombrosos processos d'activació del sistema immune, l'expressió d'aquestes molècules en diversos teixits així ho confirma. En la immunitat humoral, la unió del CD40 amb el CD40L és important en la resposta immune primària i secundària als antígens T dependents, en la creació de cèl·lules B de memòria i en la generació i manteniment dels centres germinals [184, 185]. De la mateixa manera, les interaccions d'aquest parell lligand-receptor estan implicades en l'activitat d'altres APCs com les CDs, on modulen la producció de certes citoquines (IL-8, MIP-1a, TNF- $\alpha$  i IL-12) i en monòcits on l'estímul amb la proteïna quimèrica CD154-CD8 indueix l'expressió de CD54, molècules del MHC classe II i CD40 [185].

Els estudis que han investigat el paper de les interaccions CD40/CD40L en la maduració tímica dels limfòcits suggereixen que CD40 pot participar en el procés de selecció negativa només quan el superantigen utilitzat s'expressa de forma endògena. Resultats similars es van obtenir amb la utilització de ratolins transgènics [184]. Nombrosos assaigs *in vivo* i *in vitro* indiquen que l'expressió de CD154 en cèl·lules T CD4 i CD8 és important per a la seva sensibilització, expansió i maduració cap a cèl·lules efectores capaces de produir citokines i tenir activitat lítica [188]. També s'ha trobat que l'estímul a través del CD40 és fonamental per a la maduració de les CDs i les cèl·lules B, i podria intervenir en l'augment de la supervivència de les cèl·lules T [186].

La coestimulació per mitjà de CD40/CD40L regula la producció d'IL-12 per les CDs i macròfags, necessària per al desenvolupament de les respostes Th1. Si bé no s'ha observat en tots els sistemes, el bloqueig de les interaccions CD40/CD40L desvia el patró de producció de citokines cap a Th2, un fenomen que en alguns animals d'experimentació millora la simptomatologia clínica d'algunes malalties autoimmunes com la colitis, i en altres models com la infecció per *Leishmania* causa susceptibilitat a la infecció per aquest paràsit intracel·lular [185, 187].

També s'han investigat els efectes de les interaccions CD40/CD40L en el control de les funcions efectores d'algunes cèl·lules immunes. La lligació del CD40 en monòcits és important per a la producció d'IL-1a, IL-1b, TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-8, així com per al rescat dels monòcits circulants de la mort apoptòtica. En macròfags, la unió CD40/CD40L es requereix per a la producció d'òxid nítric i IL-12. Així mateix, les cèl·lules NK que expressen CD40L lisen cèl·lules que expressen CD40 [185]. S'ha vist a més que durant la seva expansió les cèl·lules T poden requerir, en alguns casos, la coestimulació CD40/CD40L per madurar cap a cèl·lules efectores, i que els limfòcits T efectors han de trobar secundàriament l'antigen en el context d'aquest parell lligand-receptor per iniciar la secreció de citokines [187].

### 1.5.1.5. Interacció CD40-CD40L en cèl·lules presentadores d'antigen. Un procés clau en la regulació de la resposta immunoinflamatòria

CD40 té una història remarcable com un prominent activador de cèl·lules immunes [188]. CD40 és conegut com el mitjancer clau del canvi d'isotip de les immunoglobulines en els limfòcits B. També serveix com a activador majoritari de les APCs professionals, com macròfags i CDs.

## Introducció

Les CDs poden induir resposta immune i també tolerància. Això depèn bàsicament de la presència o absència (o bloqueig) de molècules coestimuladores, participants en l'activació del limfòcit T. Si es dona aquest segon cas, la CD no activa el limfòcit T sinó que el toleritza.

Tot i que la interacció CD-cèl·lula T s'ha observat tradicionalment de manera unidireccional, existeixen evidències recents que les cèl·lules T juguen un paper important en l'activació de les CDs, en particular via CD40. La senyalització de CD via CD40 provoca la secreció de múltiples citoquines (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ ). La producció de IL-12 per aquestes cèl·lules desvia la maduració de la cèl·lula T cap a la via Th1. A més, la interacció CD40-CD40L altera considerablement el fenotip d'aquestes APCs en incrementar l'expressió d'altres molècules coestimuladores com CD54/ICAM-1, C58/LFA-3, CD80/B7-1, CD86/B7-2/17. Per tant, l'activació dels receptors CD40 és una senyal crítica per completar la maduració de les CDs que es converteixen en les APCs més potents, incrementant-se la seva supervivència [189]. Finalment, la interrupció de la interacció bidireccional CD40-CD40L *in vitro* en cocultius de cèl·lules T amb CDs provoca una reducció en la proliferació de cèl·lules T així com un increment en la seva producció de citoquines. *In vivo*, el bloqueig de la interacció CD40-CD40L en les APCs pot provocar una presentació inadequada d'antigen, una deficiència en l'entorn inflamatori, respostes parcials de les cèl·lules T implicades i, en alguns casos, tolerància de dites cèl·lules. De fet, s'ha postulat que els efectes causats pel bloqueig de CD40L en la immunitat cel·lular són conseqüència d'un defecte en la maduració de les CDs [190]. Un coneixement més exhaustiu del procés de maduració de les CDs permetrà noves estratègies de manipulació d'aquest nexa crític de control entre la immunitat i la tolerància.

Més recentment, es va descobrir que CD40 s'expressa en molts tipus de cèl·lules humanes incloent-hi cèl·lules estructurals de teixits, com fibroblasts, cèl·lules epitelials, i cèl·lules endotelials [191 i 192]. En aquestes cèl·lules, com en cèl·lules immunes clàssiques, la unió de CD40 incita la producció de molècules d'adherència, citoquines, quimioquines, i importants mediadors inflamatoris [192 i 193].

El lligand natural per a CD40, CD40L, pot ser expressat, després de l'activació, a la superfície d'uns quants tipus cel·lulars, incloent limfòcits T i plaquetes [191, 193 i 194]. Hi ha molt interès en l'activació de la cèl·lula endotelial mitjançant CD40L a causa de les conseqüències potencials d'aquest esdeveniment, com per exemple la progressió ateroscleròtica, inflamació crònica, i rebuig de l'empelt. Inicialment, el bloqueig de CD40L es va proposar com a diana terapèutica en certes malalties inflamatòries, i en el rebuig de l'empelt com una via per induir tolerància immunològica. No obstant, a causa de l'expressió de CD40L

en plaquetes humanes, s'han donat esdeveniments tromboembòlics en els primers estudis clínics utilitzant anticossos contra CD40L, complicant l'ús d'aquesta molècula com a diana terapèutica [195 i 196]. Malgrat aquests efectes imprevistos no desitjats, la senyalització via CD40 és utilitzada com a diana ja que s'ha vist que és un mitjà per atenuar l'activació endotelial no desitjada i d'altres tipus cel·lulars.

Referent a això, el nostre grup es va centrar en els esdeveniments que tenen lloc després de la interacció de CD40L, expressat en cèl·lules T activades, amb cèl·lules humanes endotelials. Dues aproximacions complementàries van ser utilitzades simultàniament per analitzar les conseqüències derivades de la senyalització de CD40 en cèl·lules endotelials. Es va utilitzar una línia de cèl·lules T humanes que expressa de forma constitutiva el lligand de CD40, CD40L, per activar cèl·lules humanes endotelials que expressen CD40. Mitjançant l'ús de RNAi contra CD40 i la tecnologia dels arrays es van identificar molts gens nous dels quals es desconeixia que estaven regulats per la via CD40-CD40L, demostrant la importància de CD40 com a activador clau de gens i vies de senyalització implicats en la inducció de la resposta inflamatòria [197].

Així, es va demostrar la resposta ràpida i global de les cèl·lules endotelials després de l'activació per cèl·lules T, incloent canvis coordinats en factors de transcripció i en quinases que afecten la inflamació, la motilitat de les cèl·lules, i el to vascular. Cal destacar dos descobriments de particular interès. El primer implica un pèptid vasoactiu anomenat apelin [197 i 198]. L'expressió del gen d'apelin es va trobar altament inhibida en cèl·lules endotelials després de la interacció CD40-CD40L. Apelin sembla jugar un paper important com un dilatador de vasos sanguinis i pot tenir efectes cardioprotectors. Aquesta inhibició de l'expressió endotelial d'apelin en un ronyó trasplantat inflammat pot ser un factor important en la desregulació de l'homeostasi de fluids associada al rebuig en transplantament renal. El segon descobriment destacat consisteix en què les cèl·lules endotelials estimulades via CD40 augmenten l'expressió de gens implicats en la defensa de l'hoste front a virus. Aquests gens inclouen gens implicats en la detecció de RNA viral, com per exemple TLR3, resultant en l'activació de l'expressió de la quimioquina IL-8 i la síntesi de IFN- $\beta$  [197]. També és d'interès el descobriment de la inhibició, mitjançada per CD40, de l'expressió de certes proteïnes que permeten l'entrada viral. Aquestes inclouen CXCR4, un receptor de quimioquines important per l'entrada de HIV a les cèl·lules [197]. Aquests esdeveniments coordinats semblen amplificar la immunitat innata mitjançant la resposta immune adquirida a partir de les cèl·lules T.



## Introducció

Aquest treball proporciona molta informació nova referent a l'activació de la cèl·lula endotelial humana via CD40. De tota manera, les cèl·lules endotelials difereixen d'òrgan a òrgan i fins i tot dintre del mateix òrgan [199]. A més, l'activació de les cèl·lules endotelials via CD40L pot diferir depenent de l'estímul on s'associa, ja sigui limfòcits T, plaquetes o d'altres. Això obre les portes a noves dianes en la via de senyalització CD40-CD40L en les cèl·lules endotelials.





## **2. ANTECEDENTS**



La inflamació és un procés tissular constituït per una sèrie de fenòmens moleculars, cel·lulars i vasculars de finalitat defensiva enfront d'agressions físiques, químiques o biològiques. Els aspectes bàsics que es destaquen en el procés inflamatori són: en primer lloc, la focalització de la resposta, que tendeix a circumscriure la zona de lluita contra l'agent agressor; en segon lloc, una resposta immediata, d'urgència i per tant, preponderantment inespecífica, encara que pot afavorir el desenvolupament posterior d'una resposta específica; i en tercer lloc, l'atracció de les cèl·lules immunes dels teixits propers al focus inflamatori. Les alteracions vasculars permeten, a més, l'arribada des de la sang de molècules immunes. El procés inflamatori s'estableix quan els leucòcits que viatgen pel torrent sanguini s'adhereixen a l'endoteli, atrets per molècules que produeix el propi endoteli i altres cèl·lules inflamatòries; després el leucòcit migra entre les cèl·lules endotelials i arriba al focus inflamatori, on produirà la destrucció tissular. Entre les principals característiques de la inflamació es troba l'augment del flux sanguini, l'augment de la permeabilitat capil·lar i la mobilització de cèl·lules inflamatòries cap al focus on s'ha produït el dany [51]. Per tant, en la inflamació tant les cèl·lules de la vasculatura com les cèl·lules immunes són components essencials.

Amb anterioritat l'endoteli era considerat una simple barrera física que separava la sang dels teixits subjacents. Actualment se sap que és un òrgan altament especialitzat i metabòlicament molt actiu; exerceix un paper molt important no només en el manteniment del to i de la permeabilitat vascular sinó també en el tràfic dels leucòcits i en la modulació de l'homeòstasi i la trombosi. La cèl·lula endotelial participa en totes les fases de la inflamació aguda o crònica, produeix mediadors de la vasodilatació i expressa molècules d'adhesió que faciliten l'adherència i transmigració dels leucòcits [61].

Les cèl·lules dendrítiques (CDs) són un sistema integral del sistema limfohematopoiètic. Distribuïdes per tot el cos, actuen com a sentinelles especialitzades en capturar antígens, migrar cap a òrgans antígen-específics als quals presenta l'antigen processat, iniciant així les respostes immunes [70].

CD40 és una proteïna de membrana que s'expressa en totes les cèl·lules presentadores d'antigen entre elles les CDs i les cèl·lules endotelials [175]. El seu lligand, el CD40L és una glicoproteïna de membrana de tipus II que s'expressa en limfòcits T activats [200, 201]. Existeixen dues isoformes, una forma transmembrana (mCD40L) i una forma soluble (sCD40L) provinent de la divisió proteolítica de la proteïna de membrana [178]. Les interaccions CD40/CD40L són claus en la regulació de nombrosos processos d'activació del sistema immune. Estudis previs realitzats en el nostre grup van posar de manifest la rellevància de la interacció mCD40L-CD40 en l'activació proinflamatòria endotelial [197]. Mitjançant un

## Antecedents

siRNA dirigit contra el receptor CD40 humà [202] i la informativitat dels microarrays en la determinació i comparació de perfils globals d'expressió gènica en cèl·lules endotelials activades via mCD40L, s'ha pogut confirmar el paper de CD40-CD40L com a “activador” cel·lular. Mitjançant anàlisi d'ontologia gènica (GO) s'ha determinat que la majoria dels gens regulats estan involucrats en la resposta immune i processos inflamatoris, com molècules d'adhesió cel·lular (E-selectina, ICAM-1, VCAM-1), citokines i quimioquines proinflamàtòries (CCL2, CXCL1, IL-8), gens antiapoptòtics (BIRC-3), factors de creixement, factors de transcripció (NFκB, RelB) i gens implicats en la presentació d'antígens (TAP-1), confirmant el paper de la senyalització via CD40 i de les cèl·lules endotelials en l'inici i el desenvolupament dels processos immunoinflamatoris [197].

No obstant, les plaquetes activades secreten també moduladors inflamatoris, com el lligand de CD40 soluble (sCD40L) al qual li manca la regió transmembrana i part del domini extracel·lular, però manté completa la regió homòloga al domini TNF-α i, per tant, és capaç d'unir-se a CD40 [203]. Interaccionant amb CD40, sCD40L pot provocar l'alliberament de mediadors inflamatoris, conduir cap a una activitat augmentada de metal·loproteïnases de la matriu, i activar la cascada de coagulació. Estudis recents han demostrat que sCD40L és un marcador poderós i independent de síndromes coronaris aguts [204, 205]. L'elevació de nivells de lligand de CD40 soluble indica un risc agreujat d'esdeveniments cardiovasculars com l'aterosclerosi i la inflamació crònica.

Una de les qüestions que van sorgir va ser si sCD40L, a nivell funcional, tenia rellevància en l'activació endotelial, tal i com s'havia observat en mCD40L, o si era un simple subproducte provinent de l'escissió proteolítica de plaquetes activades i romandria només el seu potencial diagnòstic. Per tant, es va realitzar un anàlisi d'expressió gènica mitjançant microarrays en cèl·lules HUVEC electroporades amb un siRNA-antiCD40 i estimulades durant 4h amb sCD40L. Posteriorment es va dur a terme un anàlisi comparatiu de l'expressió gènica d'aquestes cèl·lules estimulades amb mCD40L vers sCD40L.

Per altra banda, es coneix la importància fonamental de les cèl·lules dendrítiques en la resposta immune ja que constitueixen un nexa d'unió entre la immunitat innata i l'adquirida. A més, evidències recents suggereixen que les CDs tenen un paper fonamental en la determinació del destí de les respostes immunes cap a la immunitat o tolerància [206]. Així, en les cèl·lules immunes està establerta la importància del binomi CD40-CD40L en la diferenciació/maduració (activació) de les CDs, ja que l'activació del receptor CD40 per la interacció amb cèl·lules T CD40L<sup>+</sup> és un senyal crític per completar la seva maduració de manera que es converteixen en les cèl·lules presentadores d'antigen més potents [199, 207].

En trasplantament d'òrgans, els esforços actuals es centren en l'estudi de la capacitat de les CDs (immadures o semimadures) per silenciar la reactivitat immune amb la intenció de prevenir el rebuig de l'empelt i de disminuir la dependència de fàrmacs immunosupressors potencialment nocius. Una de les estratègies fonamentals implica generar CDs reguladores (o tolerogèniques) *ex vivo* i la seva posterior reinfusió (teràpia cel·lular) [208].

El sistema del complement és un component clau de la immunitat innata. A més de ser un sistema de protecció front microorganismes invasors a través de les seves activitats opsonitzants, inflamatòries i lítiques, també incrementen la immunitat adquirida i participa en el procés d'eliminació de cèl·lules apoptòtiques. L'activació del complement pot iniciar-se per tres vies: la via clàssica s'activa per la unió antígen-anticòs; la via alternativa s'activa per productes bacterians; i la via de la lectina s'inicia per l'enllaç de la lectina d'unió de manosa (MBL) a la superfície dels bacteris que contenen polisacàrids rics en aquests carbohidrats. Donat el potencial lesiu del sistema del complement, aquest es troba estretament regulat per diversos mecanismes i molècules, l'objecte de la qual és evitar la lisi de les cèl·lules autòlogues. Els principals reguladors del complement són la proteïna C4BP que actua sobre la via clàssica i la via de la lectina, i el factor H, una proteïna plasmàtica homòloga a C4BP que actua sobre la via alternativa.

S'ha suggerit que la senyalització via CD40 pot alterar-se per canvis en les respostes immunes innates. Recentment s'ha reportat que C4BP seria lligand del receptor CD40 en limfòcits B, induint la seva proliferació, la sobreexpressió de CD54 (ICAM-1) i CD86, així com el canvi d'isotip IgE dependent de IL-4 [180]. Es desconeix la influència de C4BP en l'activació d'altres cèl·lules presentadores d'antigen, com les CDs, cèl·lules endotelials, etc i el seu efecte en la senyalització via CD40. Per tant, es va voler determinar si aquest regulador del complement podia tenir una contribució potencial en la diferenciació/maduració de les CDs.

Finalment, es va voler comprovar si el factor H també afectava aquests processos en les CDs.





### **3. OBJECTIUS**



Els factors solubles alliberats per l'organisme que actuen sobre cèl·lules rellevants en condicions immunoinflamatòries, com les cèl·lules endotelials i les cèl·lules dendrítiques, són claus tant per la progressió com pel control d'aquest procés. Així, els nostres esforços s'han dirigit cap a l'anàlisi del comportament de la proteïna plasmàtica sCD40L i dels inhibidors solubles del complement C4BP i Factor H en l'activació proinflamatòria d'ambdós tipus cel·lulars.

Per tant, els objectius concrets han estat:

- En cèl·lules endotelials.-

1- Clarificar la funció biològica de la isoforma soluble de CD40L (sCD40L) analitzant el perfil global d'expressió gènica, mitjançant microarrays, de cèl·lules endotelials humanes induïdes pel sCD40L en les quals s'inactiva específicament la senyalització via CD40 per RNAi. Identificar vies metabòliques i gens específics regulats per aquesta via de senyalització rellevants en processos immunoinflamatoris.

2- Realitzar una anàlisi comparativa dels perfils globals resultants de la interacció d'ambdues isoformes de CD40L (sCD40L i mCD40L) amb el receptor CD40 en cèl·lules endotelials.

- En cèl·lules dendrítiques.-

3- Analitzar la capacitat de C4BP i del factor H d'influir en el procés de diferenciació i/o maduració de les cèl·lules dendrítiques induïdes *in vitro* a partir de monòcits de sang perifèrica, caracteritzant exhaustivament el seu fenotip i funcionalitat.

4- Caracteritzar el domini de C4BPA responsable de la seva funció reguladora sobre les cèl·lules dendrítiques.



## **4. MATERIALS I MÈTODES**



## **4.1. LÍNIES CEL·LULARS I CULTIUS**

El cultiu primari de cèl·lules endotelials HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) (Advancell) es van créixer en EGM bullet kit (Clonetics), que consta de medi EBM (*Endothelial Basal Medium*), suplementat amb 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Linus), rhEGF (*Human Epidermal Growth Factor*) (Linus), hidrocortisona, BBE (*Bovine Brain Extract*), GA-100 (gentamicina), L-glutamina (2 mM) (Invitrogen), i antibiòtics (penicil·lina 100 unitats/ml i estreptomycinina 100 µg/ml) (Invitrogen).

La línia cel·lular Jurkat D1.1 es van fer créixer en RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) (Invitrogen) suplementat amb 10 % FBS (Linus), L-glutamina (2 mM) (Invitrogen), i antibiòtics (penicil·lina 100 unitats/ml i estreptomycinina 100 µg/ml) (Invitrogen).

El cultiu primari de cèl·lules dendrítiques es van créixer en diferents tipus de medi de cultiu:

a) RPMI (*Roswell Park Memorial Institut*) (Invitrogen) suplementat amb 10 % FBS (Linus), L-glutamina (2 mM) (Invitrogen), i antibiòtics (penicil·lina 100 unitats/ml i estreptomycinina 100 µg/ml) (Invitrogen).

b) X-VIVO (Invitrogen) 15 suplementat amb 2 % *Human Serum AB* (Invitrogen), L-glutamina (2 mM) (Invitrogen), i antibiòtics (penicil·lina 100 unitats/ml i estreptomycinina 100 µg/ml) (Invitrogen).

Totes les cèl·lules es van fer créixer en una estufa d'atmosfera humida a 37°C i 5%CO<sub>2</sub>.

## **4.2. COMPTATGE CEL·LULAR**

El comptatge i la viabilitat cel·lular van ser calculats mitjançant la tinció amb el marcador blau tripà (*Trypan Blue Solution*, Sigma Aldrich) que és el mètode més comú utilitzat per discriminar entre cèl·lules vives i mortes. El blau tripà penetra la membrana de les cèl·lules mortes i les tenyeix de blau, mentre que les cèl·lules vives no l'incorporen. La suspensió cel·lular va ser diluïda 1:2 amb blau tripà afegint 10 µl de la suspensió cel·lular a 10 µl de marcador. Es va utilitzar una cambra de comptatge de Neubauer o hemocitòmetre i un microscopi de contrast de fases. Es va comptar el nombre de cèl·lules viables (no tenyides) en els quatre quadrats de les cantonades mitjançant la fórmula que es mostra a continuació [209].



## Materials i Mètodes

$$\text{Concentració cel·lular} = \frac{\text{Mitja del nombre de cèl·lules per quadrat} \times 10^4}{\text{n}^\circ \text{ de quadrats comptats}} \times 2$$

$$\text{N}^\circ \text{ total de cèl·lules} = \text{Concentració cel·lular} \times \text{Volum de suspensió cel·lular}$$

### **4.3. CRIOPRESERVACIÓ DE LES CÈL·LULES**

Tant les cèl·lules endotelials HUVEC com les cèl·lules Jurkat D1.1, les PBMC, els monòcits i limfòcits extrets van ser congelats en volums de 1 ml de medi de congelació. Els pelets van ser resuspesos en 90% de FBS i 10% de DMSO (Dimetil Sulfòxid, Fluka), la suspensió cel·lular es va repartir en alíquotes de 1 ml en criovials els quals es van emmagatzemar a -80°C dins d'un contenidor amb 2-propanol fins a l'endemà. Al dia següent, els criovials van ser transferits al tanc de nitrogen líquid per al seu emmagatzematge a llarg termini a -196°C.

### **4.4. DESCONGELACIÓ DE CÈL·LULES CRIOPRESERVADES**

Els criovials de 1 ml de cèl·lules criopreservades van ser recuperats del nitrogen líquid i desglaçats ràpidament en un bany d'aigua a 37°C. El seu contingut es va transferir a un falcon de 15 ml que contenia 9 ml de PBS o medi de cultiu. El tub es va centrifugar immediatament a 1000 rpm durant 10 min. Els pelets cel·lulars es van resuspendre en el medi de cultiu corresponent preescalfat a 37°C.

### **4.5. CÈL·LULES ENDOTELIALS HUVEC**

#### ***4.5.1. ESTIMULACIÓ D'HUVEC AMB CÈL·LULES JURKAT D1.1 O LA PROTEÏNA CD40L***

Per tal d'activar les cèl·lules endotelials via CD40-CD40L, un cop transfectades, les cèl·lules del cultiu primari HUVEC van ser activades per coincubació amb cèl·lules Jurkat D1.1 o tractant-les amb la proteïna recombinants CD40L a una concentració de 10 µg/ml (rhuCD40L, Prospec) durant 4 hores. Les cèl·lules Jurkat D1.1 són un subclon de cèl·lules Jurkat que expressa de forma constitutiva el lligand de CD40 de membrana, mCD40L. Al cultius de cèl·lules HUVEC es van afegir Jurkat D1.1 amb una relació T/EC (cèl·lula T/cèl·lula endotelial) de 10:1 o sCD40L durant 4 hores prèviament a l'anàlisi.

48 hores post-transfecció, aquests cocultius eren rentats exhaustivament amb PBS per tal d'eliminar les Jurkat D1.1 que havien quedat adherides a la monocapa d'HUVEC. Després, les cèl·lules HUVEC, tant estimulades amb les cèl·lules Jurkat D1.1 com amb la proteïna recombinant sCD40L, eren recollides per a ser analitzades.

#### 4.5.2. DISSENY DEL siRNA anti-CD40

La seqüència del siRNA2 anti-CD40 humà es va obtenir a partir del cribatge de 8 siRNAs dissenyats i sintetitzats per transcripció *in vitro* mitjançant el kit *Silencer™ siRNA Construction Kit* (Ambion) [202]. Pel disseny d'aquests siRNAs es van buscar seqüències de 21 parells de bases (pb), 19 de les quals són complementàries al gen diana, del tipus AA(19)TT al llarg del cDNA de CD40 humà (GenBank Acc.nº X60592) i evitant les regions 5' i 3' no traduïdes i les regions properes al codó d'inici de traducció, ja que poden ser riques en llocs d'unió a proteïnes reguladores que podrien interferir amb la unió del complex RISC.

Un cop escollides les seqüències dels diferents siRNAs, i per tal d'evitar efectes *off-target* en altres gens i assegurar l'especificitat d'unió d'aquests siRNAs al gen diana, es va comprovar que la seqüència del siRNA2 no presentava homologia amb cap altra seqüència publicada en la base de dades de GenBank utilitzant el programa BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Les seqüències d'aquests siRNA2 anti-CD40 i siRNAControl (msiRNA2, mutat per transversió de 5 nucleòtids centrals) es mostren a la Taula 6:

TAULA 6. Seqüències de siRNA2 i msiRNA-2	
siRNA2	msiRNA-2
5'-GCGAAUCCUAGACACCUGUU-3'	5'-GCGAAUUC <u>G</u> AUCUCACCUGUU-3'
3'-UUCGCUUAAGGAUCUGUGGAC-5'	3'-UUCGCUUAAG <u>C</u> UAGAGUGGAC-5'

#### 4.5.3. TRANSFECCIÓ DE siRNAs

La membrana plasmàtica cel·lular té la funció vital de separar el contingut molecular de la cèl·lula del seu ambient exterior. Les membranes estan formades de lípids amfifílics els quals s'autoassemblen en forma de bicapa. Existeixen diferents estratègies per introduir DNA en cèl·lules eucariotes: transfecció per mètodes químics, transfecció per mètodes físics o transducció amb virus. En aquest apartat es descriuen els mètodes que s'han utilitzat per transfectar diferents línies cel·lulars humanes amb siRNAs.

## Materials i Mètodes

### 4.5.3.1. Electroporació del cultiu primari de cèl·lules HUVEC

En aquest estudi es va utilitzar l'electroporació com a sistema de transfecció d'un cultiu primari de cèl·lules HUVEC. L'electroporació indueix permeabilitat reversible de membranes plasmàtiques quan les cèl·lules són exposades a polsos curts de camps elèctrics externs forts. La formació de porus hidrofílics és un resultat de la reorientació de lípids en la membrana en forma de bicapa. El mecanisme molecular d'aquest fenomen encara és desconegut. Mentre que petites molècules simplement es difonen a través dels porus cap al citoplasma, molècules més grans, com àcids nucleics, són conduïts a dins de la cèl·lula per forces electroforètiques. La presència d'àcids nucleics facilita la formació de porus.

Per a l'electroporació del cultiu primari de cèl·lules HUVEC es va emprar l'electroporador ECM 830 *Electropulse Generator System* (BTX). La transfecció es va fer utilitzant el tampó siPORT siRNA *Electroporation Buffer* (Ambion), un medi d'electroporació amb baixa conductivitat. El protocol següent va ser el següent: es van transferir 400 µl de la suspensió cel·lular de HUVEC ( $2 \times 10^6$  cèl·lules) i 100 nM de siRNA a una cubeta d'electroporació de 4 mm de pas (BTX), es va barrejar i incubar en gel 10 min. Després es va aplicar un camp elèctric de 160 V durant 70 msec per induir l'entrada del siRNA dins les cèl·lules. Un cop electroporades, les cèl·lules es van incubar en la cubeta 10 minuts més a temperatura ambient i a continuació es van transferir a una placa de 10 cm de diàmetre amb 10 ml de medi EBM complet. A les 48 hores posttransfecció, es van recollir les cèl·lules per analitzar l'expressió gènica [202].

## **4.6. CÈL·LULES DENDRÍTIQUES**

La transfusió d'hemoderivats forma part de la pràctica clínica diària de múltiples especialitats en la medicina actual. Malgrat els avenços en immunohematologia i de la rigorosa normativa en matèria de seguretat transfusional, persisteix el risc, encara que baix, de transmissió d'infeccions mitjançant la transfusió o bé que s'originin altres efectes adversos. Per altra banda, es tracta d'un bé escàs a causa del baix nombre de donants, per l'augment de les necessitats a causa de la complexitat de la medicina actual i per no disposar-se de productes alternatius comercials.

Tant el risc com l'escassetat són raons que han motivat el desenvolupament de metodologies de fraccionament de la sang total que permeten reduir en part el risc patològic i optimitzar l'ús de la sang al màxim. D'una donació de sang total, es poden obtenir els següents components: concentrat d'hematies, concentrat de plaquetes, plasma fresc i crioprecipitat.

Un dels productes de desfet que s'obtenen en la producció d'aquests components és la capa leucoplaquetària, també coneguda com *Buffy Coat*. En aquesta fracció de desfet es troben grans quantitats de plaquetes, eritròcits i leucòcits. Convenientment tractat, el *buffy coat* es pot utilitzar per a l'obtenció de grans quantitats de cèl·lules dendrítiques (CDs) a partir dels monòcits que es troben en el mateix. És convenient realitzar el procés de purificació i cultiu dels monòcits abans de les 24 hores següents a l'extracció sanguínia.

### **4.6.1. OBTENCIÓ I PURIFICACIÓ DE CÈL·LULES DENDRÍTIQUES**

#### **4.6.1.1. Obtenció i purificació dels monòcits: obtenció de cèl·lules mononucleades**

Grans quantitats de cèl·lules mononuclears poden ser fàcilment recol·lectades de la sang perifèrica mitjançant leucafèresi. Els monòcits poden ser aïllats d'altres leucòcits recol·lectats per afèresi amb alta puresa per adherència, elutriació o utilitzant boles immunomagnètiques [210]. Els monòcits es van purificar recollint la fracció de PBMC adherent al plàstic o utilitzant anticossos monoclonals anti-CD14 acoplats a perles magnètiques emprant el sistema de MiniMacs, *MACS CD14 isolation kit* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanya) o el *EasySep Human CD14 Selection Kit* (StemCell Technologies, Grenoble, France).

#### **a) Aïllament de PBMC de sang perifèrica**

El primer pas a realitzar és l'aïllament de la fracció de cèl·lules mononucleades (principalment limfòcits, monòcits i cèl·lules NK) presents en el *Buffy coat* i separar-les de les plaquetes, dels eritròcits i dels polimorfonuclears (granulòcits).

A partir d'una mostra de 50-60 ml de la capa leucoplaquetària (*Buffy Coat*), es va realitzar l'aïllament de la fracció de PBMC de sang perifèrica de donants sans per gradients de Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences AB; Uppsala, Suècia). Primer es va deplaquetar la mostra realitzant una dilució 1:2 en PBS preescalfat a 37°C i centrifugant a 900 rpm durant 10 minuts. Aquest pas té com a objectiu purificar la fracció cel·lular al màxim i eliminar el plasma. Si es realitza bé i la sang es troba en bones condicions, en acabar la centrifugació s'obtidran dues fases: una superior d'un color groguenc (fase plasmàtica) i una altra inferior de color vermell (fase cel·lular). En cas contrari ambdues fases seran vermelloses a causa de la lisi d'eritròcits en la fase plasmàtica. Per tant, es va descartar la fracció superior del tub que contenia la suspensió plaquetària, i la part inferior es va diluir en PBS (dilució 1:2) i es va

## Materials i Mètodes

transferir a un tub falcon de 50 ml que contenia 15 ml de ficoll, amb cura de no barrejar la suspensió cel·lular amb el ficoll (la sang no ha de caure directament sobre ell sinó sobre el tub i anar relliscant de forma que es dipositi suaument sobre el mateix mantenint-se les dues fases). En cas contrari, la fracció sanguínia penetraria en el ficoll contaminant amb eritròcits la purificació mononuclear. A continuació els tubs es van centrifugar a 400 g durant 40 min. Després d'aquest pas s'obtenen dues fases separades per un anell blanquinós, la fase superior que conté grans quantitats de plaquetes i la fase inferior vermellova on hi haurà la majoria d'eritròcits. En la zona on es toquen ambdues fases es forma una capa blanca de cèl·lules que conté cèl·lules mononucleades barrejades amb plaquetes.

Utilitzant una pipeta pasteur, es va transferir l'anell blanc de la interfase, corresponent a la fracció de PBMC entre el ficoll i el plasma, a un altre tub de 50 ml. Es van realitzar rentats amb PBS per eliminar l'excés de ficoll que pugui haver quedat en realitzar l'extracció de la capa, centrifugant 5-10 min a 1400 rpm. Els pelets resultants es van resuspendre en el medi RPMI no suplementat amb FBS però sí amb L-glutamina (2 mM) (Invitrogen), i antibiòtics (penicil·lina 100 unitats/ml i estreptomina 100 µg/ml) (Invitrogen), si es realitza la purificació per adherència al plàstic, o bé amb medi RPMI suplementat amb 10% FBS, L-glutamina (2 mM) (Invitrogen), i antibiòtics (penicil·lina 100 unitats/ml i estreptomina 100 µg/ml) (Invitrogen) si pel contrari es fa la purificació mitjançant anticossos monoclonals anti-CD14 acoplats a perles magnètiques. Es va avaluar la viabilitat cel·lular amb blau de tripà i es va realitzar el comptatge en una cambra de Neubauer. Es solen obtenir entre  $10^9$  i  $0.5 \times 10^9$  PBMC per *Buffy Coat* compostos per un 90% de limfòcits i un 10% de monòcits. Després es va procedir a la purificació dels monòcits.

### **b) Purificació dels monòcits: Separació de monòcits i limfòcits**

-Per adherència al plàstic de la placa de cultius

Un cop s'han separat les plaquetes, la banda mononucleada està formada principalment per limfòcits i monòcits. Normalment hi haurà un 90% de limfòcits i un 10% de monòcits. Els monòcits presenten una capacitat d'adherència al plàstic molt major que els limfòcits per la qual cosa es pot utilitzar aquest paràmetre per aconseguir una purificació parcial. Normalment amb aquest sistema es pot arribar a obtenir una purificació de monòcits que oscil·la entre el 35% i el 70% depenent de diversos factors tals com els rentats, la qualitat del *Buffy Coat* o la variabilitat de les fonts. La principal avantatge és que els limfòcits rentats poden ser aprofitats

per altres experiments. El seu inconvenient és un rendiment en ocasions molt inferior al de les boles magnètiques.

Es van sembrar en plaques de 60-100 cm<sup>2</sup> o plaques de 6 pous cm<sup>2</sup> en medi lliure de sèrum i es van incubar a 37°C i amb un 5% CO<sub>2</sub> durant 2 hores. La fracció de cèl·lules no adherents va ser eliminada realitzant rentats suaus amb PBS atemperat per eliminar el nombre màxim de limfòcits. La fracció adherent, formada per la població de monòcits, va ser cultivada en diferents condicions de cultiu.

-Separació mitjançant boles magnètiques

La separació cel·lular mitjançant boles magnètiques ha esdevingut una tècnica més ràpida i fàcil. En minuts, cèl·lules en suspensió poden ser separades magnèticament amb una elevada puresa d'acord amb els seus antígens de superfície. Aquesta tecnologia permet separar un ampli rang de productes.

La purificació amb boles magnètiques s'ha realitzat mitjançant l'ús d'anticossos monoclonals anti-CD14 acoplats a perles magnètiques utilitzant el sistema de MiniMacs, *MACS CD14 isolation kit* (Miltenyi Biotec) o bé el sistema *EasySep Human CD14 Positive Selection kit* (StemCell Technologies) i avaluant la puresa de la població per citometria de flux.

### **1. Tecnologia *MACS CD14 isolation kit***

L'aïllament de monòcits es dur a terme realitzant una selecció positiva marcant aquestes cèl·lules amb boles magnètiques recobertes amb l'anticòs anti-CD14 que és un marcador de monòcits (*super-paramagnetic MACS MicroBeads*) i recuperant la fracció positiva. Després del marcatge magnètic, les cèl·lules es passen a través d'una columna MACS LS col·locada en un fort imant permanent. Aquestes columnes permeten obtenir un màxim de 10<sup>8</sup> cèl·lules magnèticament marcades, les quals són retingudes en la columna i separades de les no marcades, que passen a través d'ella. La fracció retinguda pot ser eluïda, de manera que ambdues fraccions cel·lulars, les marcades i les no marcades, poden ser completament recuperades. Aquest mètode permet obtenir una població enriquida únicament en monòcits, obtenint-se purificacions del 80% o més en monòcits. El seu principal inconvenient és el cost econòmic que suposa. A més, no és necessari eliminar les boles magnètiques ja que són biodegradables (formades per òxid de ferro i polisacàrids), de manera que no activen les cèl·lules ni influeixen en la seva funció ni viabilitat.

## Materials i Mètodes

El protocol que es va seguir va ser el següent: es van resuspendre les cèl·lules a raó de  $5-10 \times 10^7$  cèl·lules/ml en el tampó PBS suplementat amb EDTA (Àcid etilendiaminotetraacètic) 2 mM i 0.5% de BSA (*Bovine serum albumin*). Es va afegir 20  $\mu$ l de la suspensió d'anticòs per cada  $10^7$  PBMC i es va incubar 15 min a 4°C. Durant aquest temps es va equilibrar la columna LS amb tampó descrit anteriorment descartant l'eluent. Es va aplicar la suspensió cel·lular per aquesta, de manera que els monòcits marcats amb l'anticòs anti-CD14 van quedar retinguts a la columna mentre que la resta de PBMC van ser rentats afegint més tampó per la columna. Es van recuperar els monòcits afegint 1 ml del tampó a la columna i amb l'ajuda de la xeringa. Aquesta suspensió cel·lular es va rentar centrifugant les cèl·lules 5 min a 1200 rpm. Es va descartar el sobrenedant i el pelet resultant es va resuspendre en el volum de medi necessari.

### **2. Tecnologia *EasySep Human CD14 Positive Selection kit***

L'aïllament de monòcits es va dur a terme realitzant una selecció positiva. Es van marcar aquestes cèl·lules amb nanopartícules magnètiques cobertes de dextrà utilitzant Complexes d'anticossos tetramèrics (TAC) biespecífics que reconeixen tant el dextrà com l'antigen de superfície cel·lular diana, en aquest cas el CD14. La petita grandària de les partícules d'iman dextrà magnètiques permet una unió eficient a cèl·lules marcades amb els complexos TAC, i no interfereixen en el subsegüent anàlisi per citometria de flux. Les cèl·lules marcades magnèticament són separades de les cèl·lules no marcades utilitzant un iman EasySep.

En aquest cas es va realitzar un pas previ a la separació per gradients de Ficoll-Paque de depleció dels limfòcits  $CD3^+$  de la sang sencera mitjançant el *RosetteSep<sup>®</sup> Human CD3<sup>+</sup> Depletion Cocktail* (StemCell Technologies, Grenoble, France). Aquest producte conté Complexes d'anticossos tetramèrics (TAC) biespecífics que reconeixen cèl·lules hematopoiètiques humanes (CD3) de la sang humana sencera i la glicoporina A en múltiples glòbuls vermells de la sang (RBCs), de manera que es formen immunorosetes de cèl·lules no desitjades amb RBCs. Això permet augmentar la densitat de cèl·lules no desitjades ja que quedaran unides als glòbuls vermells formant un pelet en la separació per gradients de Ficoll-Paque. Les cèl·lules desitjades no s'uneixen a l'anticòs i són fàcilment recol·lectades com una població enriquida en la interfase entre el plasma i el ficoll.

El protocol que es va seguir va ser el següent: abans de realitzar el pas de la separació per gradients de Ficoll-Paque es va afegir *RosetteSep<sup>®</sup> Human CD3 Depletion Kit* a una concentració de 50  $\mu$ l/ml de sang total i es va incubar 20 min a temperatura ambient. Es va diluir la sang en un volum igual de PBS i es realitza la separació per gradient de Ficoll-Paque

(explicat a l'apartat de Materials i Mètodes 4.6.1.1). Una vegada recuperada la interfase entre el plasma i el ficoll es va passar a la selecció positiva de les cèl·lules CD14<sup>+</sup> preparant la suspensió de cèl·lules mononuclears a una concentració de  $1 \times 10^8$  cèl·lules /ml en PBS. Les cèl·lules es van traspasar a un tub de poliestirè i es va afegir *EasySep<sup>®</sup> Positive Selection Cocktail* a una concentració de 100 µl/ml de cèl·lules (per exemple, per 2 ml de cèl·lules afegir 200 µl del còctel). Es va barrejar i incubar 15 min a temperatura ambient. Aleshores es va barrejar les nanopartícules per assegurar-nos que constitueixen una suspensió uniforme pipetejant unes 5 vegades i es van afegir a una concentració de 50 µl/ml de cèl·lules (per exemple, per 2 ml de cèl·lules afegir 100 µl de nanopartícules) realitzant una incubació de 10 min a temperatura ambient. Es va portar la suspensió cel·lular fins a un volum final de 2.5 ml afegint PBS, i es va barrejar i col·locar el tub dins de l'iman durant 5 min. Passat aquest temps es va invertir l'iman i el tub en un moviment continu, traient la fracció sobrenedant. Les cèl·lules marcades magnèticament van romandre enganxades a les parets del tub gràcies al camp magnètic creat pel *EasySep<sup>®</sup> Magnet*. Es va treure el tub de l'iman i es van recuperar les cèl·lules enganxades mitjançant 2.5 ml de PBS. Es va tornar a col·locar el tub dins l'iman durant 5 min més i es van recuperar les cèl·lules marcades magnèticament enganxades a les parets del tub amb medi de cultiu.

Un cop acabada la purificació, es va comprovar la puresa de la població realitzant el marcatge d'unes  $2 \times 10^5$  cèl·lules mitjançant l'anticòs anti-humà CD14 marcat amb ficoeritrina (PE, IM0650U, Clone RMO52, Beckman-Coulter) a una concentració de 4 µg/ml per avaluar la puresa per citometria de flux seguit per l'utilització de *Perfect-Count Microspheres<sup>™</sup>* (Cytognos) a un volum igual al volum de cèl·lules marcades (per exemple, 20 µl de cèl·lules, afegir 20 µl de *Perfect-Count Microspheres*) que permet realitzar comptatges absoluts de cèl·lules utilitzant també la citometria de Flux. L'avantatge d'aquesta estratègia és la seva capacitat inherent per identificar positivament totes les cèl·lules d'interès i així excloure les cèl·lules contaminants. Aquest sistema es pot combinar amb anticossos monoclonals conjugats amb diferents fluorocroms, la qual cosa permet identificar positivament les cèl·lules d'interès.

*Perfect-Count Microspheres* és un sistema de plataforma simple basat en microesferes (A i B) que assegurin la precisió dels resultats de comptatge absoluts. El seu sistema únic de control de qualitat intern conté dos tipus d'esferes amb densitats per sobre i per sota de les densitats de les cèl·lules de la sang. Aquest sistema pot ser utilitzat com un estàndard doble de referència, ja que assegura la precisió de l'assaig i el càlcul acurat del nombre de cèl·lules per µl.



## Materials i Mètodes

Els dos tipus d'esferes tenen diferent dispersió de la llum, diferents fluorescències i característiques de flotació. Ambdós tipus d'esferes romanen estables durant un llarg període de temps i són fàcilment detectables i diferenciades pel citòmetre de flux a causa de les seves diferents intensitats de fluorescència:

-Microesferes de tipus A són esferes fluorescents de 6,4 µm excitable a 506 nm.

-Microesferes de tipus B són esferes fluorescents de 6,36 µm excitable a longituds d'ona que van de 365 a 650 nm.

La proporció i el rang que es considera acceptable per a la proporció d'esferes A i B present en el vial s'especifica en el full tècnic del producte. Un cop adquirida la mostra en el citòmetre de flux cal comprovar que la proporció entre les subpoblacions de les esferes de referència són el mateix o cauen dins del rang acceptable de variabilitat dins de la proporció existent en la solució inicial.

El càlcul del nombre absolut de la població cel·lular d'interès es calcula mitjançant la següent fórmula:

$$\text{Comptatge absolut (Cèls/}\mu\text{l)} = \frac{\text{Nombre de cèl·lules de la subpoblació diana comptada}}{\text{Nombre total de microesferes comptades}} \times \text{Nombre de Perfect-Count/}\mu\text{l} \quad (\text{valor especificat pel fabricant})$$

### 4.6.1.2. Diferenciació de monòcits a cèl·lules dendrítiques

Un cop obtingudes les cèl·lules i sembrades en les plaques corresponents, es van fer créixer en medi RPMI (Invitrogen) + 10 % FBS (Linus), L-glutamina (2 mM) (Invitrogen), i antibiòtics (penicil·lina 100 unitats/ml i estreptomicina 100 µg/ml) (Invitrogen).

Els monòcits es van incubar a 37°C i amb un 5% CO<sub>2</sub> en plaques de 6-12-24 pous a una densitat de 1x10<sup>6</sup> cèl·lules/ml en presència de 500 U/ml de IL-4 (interleuquina 4, Gentaur) i 800 U/ml de GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, Gentaur). Als 2-3 dies es va afegir medi fresc suplementat amb 500 U/ml de IL-4 i 800 U/ml de GM-CSF. La morfologia de les CDs immadures es va comprovar per microscopia de contrast de fases a dia 5. La presència de marcadors de CDs immadures es va avaluar per citometria de flux als dies 5 i 7 del cultiu.

#### 4.6.1.3. Maduració de cèl·lules dendrítiques immadures a cèl·lules dendrítiques madures

A causa que les CDs madures són superiors a les CDs immadures per l'estimulació de cèl·lules T citotòxiques, CDi derivades de monòcits són sovint tractades amb diversos estímuls exògens coneguts per induir la maduració de les CDs incloent lipopolisacàrid (LPS) i IFN- $\gamma$ . A dia 5 de cultiu es va canviar el medi de cultiu per medi fresc addicionant diferents tipus d'estímuls de maduració i afegint els suplementes 500 U/ml de IL-4 i 800 U/ml de GM-CSF durant 48 hores per afavorir la maduració de les CDs; com a control negatiu es van utilitzar cèl·lules sense estímulo de maduració. La morfologia de les cèl·lules es va comprovar per microscopia de contrast de fases a dies 5 i 7. La presència de marcadors de CDs immadures es va avaluar per citometria de flux al dies 5 i 7 del cultiu i el de CDs madures al dia 7.

Els estímuls de maduració que s'han utilitzat al llarg d'aquest estudi són:

- a) Lipopolisacàrid (LPS, *Lipopolysaccharides from Escherichia coli* 055:B5, Sigma L2880), a una concentració de 5 $\mu$ g/ml.
- b) Còctel Ribomunyl que conté 1000 U/ml de INF- $\gamma$ , 500 ng/ml de rHusCD40L/TRAP i 9,5  $\mu$ l/ml de ribomunyl.

#### 4.6.2. EFECTE DE C4BP EN LA MADURACIÓ I DIFERENCIACIÓ DE LES CÈL·LULES DENDRÍTIQUES

Les isoformes plasmàtiques purificades  $\alpha$ 7 $\beta$ 1 i  $\alpha$ 7 $\beta$ 0 de la proteïna C4BP i la proteïna recombinant C4BP  $\alpha$  (reca6 $\beta$ 0) es van afegir en tres moments diferents de la diferenciació de monòcit a CDs: des de l'inici de l'extracció fins a la maduració inclosa, únicament fins el procés de diferenciació de monòcit a CD o bé només en el moment de la maduració de CDi a CDm afegint-les al començament de la maduració.

##### 4.6.2.1. Assaig de *Binding*

Aquest protocol permet avaluar si les isoformes plasmàtiques purificades  $\alpha$ 7 $\beta$ 1 i  $\alpha$ 7 $\beta$ 0 de la proteïna C4BP s'uneixen específicament a la membrana de les CDs. Per realitzar aquest estudi s'han utilitzat monòcits extrets de sang perifèrica, tant purificats per adherència al plàstic de la placa de cultius com per separació mitjançant boles magnètiques utilitzant el sistema de MiniMacs, *MACS CD14 isolation kit*, i CDs en estat immadur. Aquestes cèl·lules han estat tractades amb diferents concentracions de les dues isoformes plasmàtiques purificades de C4BP.

## Materials i Mètodes

El protocol que es va dur a terme va ser el següent: primer de tot es van rentar les cèl·lules en PBS per eliminar qualsevol resta de FBS. Es va fer un últim rentat amb el tampó que s'utilitza per realitzar l'assaig. Es van incubar  $4 \times 10^5$  cèl·lules diluïdes en 100  $\mu$ l de tampó que facilita la unió (*binding buffer*, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>) amb quantitats incrementades de  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$  (2  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml i 10  $\mu$ g/ml en l'assaig realitzat en monòcits; i 2  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml i 20  $\mu$ g/ml en l'assaig en CDi) durant 30 min a temperatura ambient. Es van rentar les cèl·lules amb 1-2 ml de *binding buffer* i es van incubar amb l'anticòs *rabbit anti-human C4BPA Ab* (PK 9008, cedit per la Dra. Ana Blom) a una proporció de 2:1 (Ac:C4BPA) en un volum final de 100  $\mu$ l durant 30 min. Es van rentar les cèl·lules amb 1-2 ml de *binding buffer* i es van incubar amb l'anticòs secundari *goat F(ab')<sub>2</sub> fragment anti-rabbit IgG (H + L)-FITC* (eBioscience) a una concentració de 5 ng/ $\mu$ l en un volum final de 100  $\mu$ l durant 30 min. Finalment es van rentar les cèl·lules amb 1-2 ml de *binding buffer* i es va resuspendre el pelet final amb 300  $\mu$ l de tampó FACS (composició descrita en l'apartat 4.6.9.1 de Materials i mètodes). Les mostres es van analitzar per citometria de flux mitjançant el programa CellQuestPro.

Com a controls negatius es van utilitzar cèl·lules marcades amb *rabbit anti-human C4BPA Ab* + l'anticòs secundari *goat F(ab')<sub>2</sub> fragment anti-rabbit IgG (H + L)-FITC* a les mateixes proporcions que les proteïnes testades i cèl·lules marcades només amb l'anticòs secundari. Es van realitzar triplicats de cada mostra i el resultat es van obtenir calculant la mitja de la *Median Fluorescence Intensity* (MFI) de les cèl·lules tractades amb les proteïnes a testar.

### 4.6.2.2. Efecte en la diferenciació

Es va afegir des del moment de l'extracció dels monòcits diferents estímuls en medi RPMI 10% FBS suplementat amb les citoquines IL-4 i GM-CSF per comprovar el seu paper en la diferenciació de les CD.

Es van utilitzar diverses condicions per obtenir a dia 5 de cultiu diferents fenotips:

- 1) CDs immadures: cultiu en presència d'IL-4 i GM-CSF i en absència d'estímuls de maduració.
- 2) CDs estimulades amb les formes de C4BP:  $\alpha 7\beta 1$  o  $\text{re}\alpha 6\beta 0$  des del primer dia de cultiu.

Els estímuls utilitzats per realitzar aquests assajos es descriuen a la Taula següent:

TAULA 7. Estímuls de diferenciació utilitzats	
Estímul	Concentració
$\alpha 7\beta 1$	2 $\mu\text{g/ml}$
	5 $\mu\text{g/ml}$
reca6 $\beta$ 0	2 $\mu\text{g/ml}$
	5 $\mu\text{g/ml}$

Es van comprovar a dia 5 la morfologia cel·lular per microscopia de contrast de fases i la presència de marcadors superficials per citometria de flux.

#### 4.6.2.3. Efecte en la maduració

Es van afegir al dia 5 de cultiu diferents estímuls de maduració en medi RPMI 10% FBS suplementat amb IL-4 i GM-CSF, els quals es mostren en la Taula 8, per comprovar el seu paper en la maduració de les CDs.

Es van utilitzar diverses condicions per obtenir al dia 7 de cultiu diferents fenotips:

- 1) CDs immadures: cultiu en presència d'IL-4 i GM-CSF i en absència d'estímuls de maduració.
- 2) CDs madures: cultius en presència d'IL-4 i GM-CSF i addició de LPS o les isoformes de C4BP:  $\alpha 7\beta 1$  o reca6 $\beta$ 1 el dia 5 de cultiu.

Els estímuls utilitzats per realitzar aquests assajos es descriuen a la Taula següent:

TAULA 8. Estímuls de maduració utilitzats	
Estímul	Concentració
LPS	5 $\mu\text{g/ml}$
$\alpha 7\beta 1$	2 $\mu\text{g/ml}$
	5 $\mu\text{g/ml}$
reca6 $\beta$ 0	2 $\mu\text{g/ml}$
	5 $\mu\text{g/ml}$

Es van comprovar a dia 7 la morfologia cel·lular per microscopia de contrast de fases i la presència de marcadors superficials per citometria de flux.

#### 4.6.2.4. Efecte en la diferenciació i maduració

##### a) Efecte en la diferenciació i maduració de les isoformes plasmàtiques purificades $\alpha 7\beta 1$ i $\alpha 7\beta 0$ de la proteïna C4BP i de la proteïna recombinant C4BP $\alpha$ (reca6 $\beta$ 0)

Es van afegir des del primer dia de cultiu les isoformes plasmàtiques purificades  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$  de la proteïna C4BP i de la proteïna recombinant C4BP  $\alpha$  (reca6 $\beta$ 0) en medi de cultiu

## Materials i Mètodes

RPMI 10% FBS suplementat amb IL-4 i GM-CSF a les concentracions de 2 µg/ml i 5 µg/ml i es va anar renovant el medi cada 2-3 dies afegint les proteïnes a les concentracions esmentades.

A dia 5 també se'ls va afegir l'estímul de maduració LPS (5 µg/ml).

Es van utilitzar diverses condicions per obtenir al dia 7 de cultiu diferents fenotips:

1) CDs immadures: cultiu en presència d'IL-4 i GM-CSF i en absència d'estímuls de maduració.

2) CDs madures: cultiu en presència d'IL-4 i GM-CSF i addició de les isoformes  $\alpha7\beta1$ ,  $\alpha7\beta0$  i  $\text{re}\alpha6\beta0$  de la proteïna plasmàtica C4BP a partir del primer dia i de LPS el dia 5 de cultiu.

Els estímuls utilitzats per realitzar aquests assajos es descriuen a la Taula següent:

TAULA 9. Estímuls utilitzats			
Dia 0		Dia 5	
Estímul	Concentració	Estímul	Concentració
-	-	LPS	5 µg/ml
$\alpha7\beta1$	2 µg/ml	$\alpha7\beta1$ + LPS	2 µg/ml
	5 µg/ml		5 µg/ml
$\text{re}\alpha6\beta0$	2 µg/ml	$\text{re}\alpha6\beta0$ + LPS	2 µg/ml
	5 µg/ml		5 µg/ml
$\alpha7\beta0$	2 µg/ml	$\alpha7\beta0$ + LPS	2 µg/ml
	5 µg/ml		5 µg/ml

Es van comprovar a dia 7 la morfologia cel·lular per microscopia de contrast de fases, la presència de marcadors superficials per citometria de flux i l'expressió gènica.

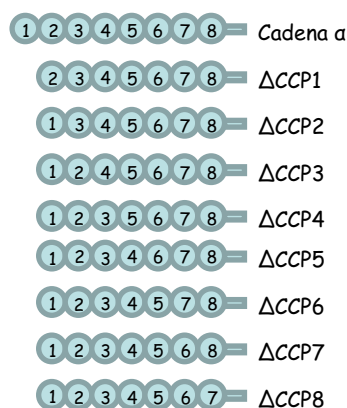
### **b) Efecte dels mutants de la cadena $\alpha$ de la proteïna C4BP en la diferenciació i maduració**

El grup de la Dra. Blom va construir i caracteritzar funcionalment un total de 8 mutants recombinants de la cadena  $\alpha$  de la proteïna C4BP als quals els mancava els dominis CCPs de forma individual ( $\Delta$ CCP).

El mètode d'obtenció d'aquests mutants es descriu en l'article [211] i l'estructura dels mutants es descriu en la Figura 15.

Es va afegir des del primer dia de cultiu després de l'extracció els 8 mutants recombinants diferents, cedits per la Dra. Anna Blom, en medi de cultiu RPMI 10% FBS suplementat amb IL-4 i GM-CSF a les concentracions de 2 µg/ml i es va anar renovant el medi cada 2-3 dies afegint les proteïnes a les concentracions esmentades.

Figura 15. Estructura dels mutants de la cadena  $\alpha$  de la proteïna C4BP. Modificat de Bloom A. [211].



A dia 5 també se'ls va afegir l'estímul de maduració LPS (5  $\mu$ g/ml).

Es van utilitzar diverses condicions per obtenir al dia 7 de cultiu diferents fenotips:

- 1) CDs immadures: cultiu en presència d'IL-4 i GM-CSF i en absència d'estímuls de maduració.
- 2) CDs madures: cultiu en presència d'IL-4 i GM-CSF i addició dels diferents mutants a partir del primer dia i de LPS el dia 5 de cultiu.

Els estímuls utilitzats per realitzar aquests assajos es descriuen a la Taula següent:

TAULA 10. Estímuls utilitzats			
Dia 0		Dia 5	
Estímul	Concentració	Estímul	Concentració
-	-	LPS	5 $\mu$ g/ml
$\Delta$ CCP1	2 $\mu$ g/ml	$\Delta$ CCP1 + LPS	2 $\mu$ g/ml
$\Delta$ CCP2	2 $\mu$ g/ml	$\Delta$ CCP2 + LPS	2 $\mu$ g/ml
$\Delta$ CCP3	2 $\mu$ g/ml	$\Delta$ CCP3 + LPS	2 $\mu$ g/ml
$\Delta$ CCP4	2 $\mu$ g/ml	$\Delta$ CCP4 + LPS	2 $\mu$ g/ml
$\Delta$ CCP5	2 $\mu$ g/ml	$\Delta$ CCP5 + LPS	2 $\mu$ g/ml
$\Delta$ CCP6	2 $\mu$ g/ml	$\Delta$ CCP6 + LPS	2 $\mu$ g/ml
$\Delta$ CCP7	2 $\mu$ g/ml	$\Delta$ CCP5 + LPS	2 $\mu$ g/ml
$\Delta$ CCP8	2 $\mu$ g/ml	$\Delta$ CCP6 + LPS	2 $\mu$ g/ml

Es van comprovar a dia 7 la morfologia cel·lular per microscopia de contrast de fases, la presència de marcadors superficials per citometria de flux i l'expressió gènica.

#### 4.6.2.5. Medició de citoquines en el medi extracel·lular

En resposta a la detecció per part de les CDs de l'antigen extracel·lular es produeix l'activació de mecanismes de secreció de citoquines entre les quals es troben IL-10 i IL-12. Aquestes dues citoquines es troben a concentracions màximes en els medis extracel·lulars a les 24 hores d'haver entrat en contacte la CD amb l'estímul. La concentració de IL-12p40/70, com

## Materials i Mètodes

inductor de resposta Th1, i de IL-10, com a citoquina inductora de resposta Th2, van ser determinades en els sobrenadants de cultius de CDs a dia 7, a una concentració de  $10^6$  cèl·lules/ml, en els diferents estats de maduració mitjançant *Human Inflammatory Cytoquines Multi-Analyte ELISArray Kit*: MEH-004A (Sabiosciences, Maryland, USA) i *Human Th1/Th2 11plex FlowCytomix Multiplex* (Bender-medsystems, Viena, Austria) on es detecten les següents citoquines i quimioquines:

-*Human Inflammatory Cytoquines Multi-Analyte ELISArray Kit*: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF

-*Human Th1/Th2 11plex FlowCytomix Multiplex*: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$

Totes les CDs que es van utilitzar per a la medició de secrecions de citoquines van ser obtingudes de *Buffy Coats* i purificades per adherència a la placa.

Amb el *Human Inflammatory Cytoquines Multi-Analyte ELISArray Kit* es van avaluar les mostres estimulades amb els mutants  $\Delta$ CCP6 i  $\Delta$ CCP8, mentre que amb el *Human Th1/Th2 11plex FlowCytomix Multiplex* es van avaluar els sobrenadants de les mostres estimulades amb les isoformes plasmàtiques purificades  $\alpha$ 7 $\beta$ 1 i  $\alpha$ 7 $\beta$ 0 de la proteïna C4BP i de la proteïna recombinant C4BP  $\alpha$  (reca6 $\beta$ 0).

Els estímuls es van afegir des del primer dia i després de 5 dies de cultiu amb IL-4 i GM-CSF, se'ls va afegir LPS a una concentració de 5  $\mu$ g/ml. A les 48 hores es van recollir els sobrenadants i es van congelar a -80°C immediatament per al seu ús posterior.

### **4.6.3. EFECTE DEL FACTOR H EN LA MADURACIÓ I DIFERENCIACIÓ DE LES CÈL·LULES DENDRÍTIQUES**

El Factor H (10-15-1106, Biopur, Suïssa) es va afegir en tres moments de la diferenciació de monòcit a CDs: des de l'inici de l'extracció fins a la maduració inclosa, únicament fins el procés de diferenciació de monòcit a CD o bé només en el moment de la maduració de CDi a CDm afegint-lo sol o en combinació amb l'estímul maduratiu LPS.

#### **4.6.3.1. Efecte en la diferenciació**

Es va afegir des del moment de l'extracció dels monòcits diferents concentracions de la proteïna Factor H (2  $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml i 10  $\mu$ g/ml) en medi RPMI 10% FBS suplementat amb IL-4 i GM-CSF per comprovar el seu paper en la diferenciació de les CDs.

Es van utilitzar diverses condicions per obtenir a dia 5 de cultiu diferents fenotips:

1) CDs immadures: cultiu en presència d'IL-4 i GM-CSF i en absència d'estímuls de maduració.

2) CDs immadures: cultiu en presència d'IL-4 i GM-CSF i addició de Factor H des del primer dia de cultiu.

Els estímuls utilitzats per realitzar aquests assajos es descriuen a la Taula següent:

TAULA 11. Estímuls de diferenciació utilitzats	
Estímul	Concentració
FH	2 µg/ml
	5 µg/ml
	10 µg/ml

Es van comprovar a dia 5 la morfologia cel·lular per microscopia de contrast de fases i la presència de marcadors superficials per citometria de flux.

#### 4.6.3.2. Efecte en la maduració

Es va afegir a dia 5 de cultiu diferents concentracions de la proteïna Factor H (2 µg/ml, 5µg/ml i 10 µg/ml) sola o combinada amb l'estímul maduratiu LPS (5µg/ml) en medi RPMI 10% FBS suplementat amb IL-4 i GM-CSF per comprovar el seu paper en la maduració de les CDs.

Es van utilitzar diverses condicions per obtenir al dia 7 de cultiu diferents fenotips:

1) CDs immadures: cultiu en presència d'IL-4 i GM-CSF i en absència d'estímuls de maduració.

2) CDs madures: cultius en presència d'IL-4 i GM-CSF i addició de Factor H sol o en combinació amb LPS el dia 5 de cultiu.

Els estímuls utilitzats per realitzar aquests assajos es descriuen a la Taula següent:

TAULA 12. Estímuls de maduració utilitzats	
Estímul	Concentració
LPS	5 µg/ml
FH	2 µg/ml
	5 µg/ml
	10 µg/ml

Es van comprovar la morfologia cel·lular per microscopia de contrast de fases i la presència de marcadors superficials per citometria de flux a dia 7.



## Materials i Mètodes

### 4.6.3.3. Efecte en la diferenciació i maduració

Es va afegir des del primer dia de cultiu després de l'extracció de monòcits, diferents concentracions de la proteïna Factor H (2 µg/ml, 5 µg/ml i 10 µg/ml) en medi RPMI 10% FBS suplementat amb IL-4 i GM-CSF i es va anar renovant el medi cada 2-3 dies afegint les proteïnes a les concentracions esmentades.

A dia 5 també se'ls va afegir l'estímul de maduració LPS (5 µg/ml).

Es van utilitzar diverses condicions per obtenir a dia 7 de cultiu diferents fenotips:

- 1) CDs immadures: cultiu en presència d'IL-4 i GM-CSF i en absència d'estímuls de maduració.
- 2) CDs madures: cultiu en presència d'IL-4 i GM-CSF i addició del Factor H a partir del primer dia i de LPS el dia 5 de cultiu.

Els estímuls utilitzats per realitzar aquests assajos es descriuen a la Taula següent:

TAULA 13. Estímuls de diferenciació-maduració utilitzats			
Dia 0		Dia 5	
Estímul	Concentració	Estímul	Concentració
-	-	LPS	5 µg/ml
FH	2 µg/ml	FH	2 µg/ml
	5 µg/ml		5 µg/ml
	10 µg/ml		10 µg/ml

Es van comprovar a dia 7 la morfologia cel·lular per microscopia de contrast de fases, la presència de marcadors superficials per citometria de flux i l'expressió gènica.

### 4.6.4. MICROSCOPIA ELECTRÒNICA D'ESCOMBRATGE

La microscòpia electrònica d'escombratge (SEM, *Scanning Electron Microscope*) consisteix en la generació d'una imatge d'electrons secundaris o retrodispersats de la mostra a observar mitjançant l'escombratge d'un feix d'electrons accelerats i enfocats sobre la seva superfície. La preparació de les mostres és relativament fàcil ja que la majoria de SEMs només requereixen que aquestes siguin conductores. Primer de tot es realitza una fixació de la mostra amb glutaralhid al 2.5% en Tampó Fosfat 0.1 M, durant 10 min. Passat aquest temps es retira la solució fixadora, i es torna a afegir de nova i es guarda a 4°C. Seguidament es realitzen rentats de la mostra amb el mateix tampó fosfat i es postfixa la mostra amb tetraòxid d'osmi a l'1% contenint ferricianur potàssic (0.8%) durant 1 hora a 4°C. Després de l'osmificació, la mostra es deshidrata en un gradient ascendent d'alcohols i al final es fan diversos canvis

d'alcohol 100%. Posteriorment es realitza el procés de punt crític (CPD) per tal d'assecar la mostra sense col·lapsament de les estructures (CPD 751 de VGmicrotech). Un cop assecada la mostra es realitza el seu muntatge amb plata col·loïdal i amb l'orientació que interressi. Finalment es realitza el procés de *sputtering* en el qual la mostra es recobreix amb una fina capa (aproximadament 14 nm) d'or. En el cas del microscopi electrònic d'escombratge la mostra és recoberta amb una capa de carbó o una capa prima d'un metall com l'or per donar-li propietats conductores a la mostra. Posteriorment és escombrada amb els electrons accelerats que viatgen a través del canó. Un detector mesura la quantitat d'electrons enviats que llança la intensitat de la zona de mostra, sent capaç de mostrar figures en tres dimensions, projectades en una imatge de TV o una imatge digital. Aquesta tècnica permet observar, a més de la topografia, canvis en la densitat i composició superficial de la mostra fins a profunditats màximes de l'ordre de 1  $\mu\text{m}$ . En tots els estudis s'utilitzen un microscopi Zeiss DSM940A amb un potencial de acceleració d'entre 10-15 kV, una intensitat de filament de 2.85 A i una intensitat electrònica sobre la mostra de 75 pA. Amb aquest equip s'aconsegueix resoldre detalls topogràfics de l'ordre d'1  $\mu\text{m}$ .

Amb aquesta tècnica es van generar imatges de les CDs en estat immadur, en estat madur i les tractades des del començament del cultiu amb les isoformes  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$  de la proteïna plasmàtica purificada C4BP, els mutants  $\Delta\text{CCP}6$  i  $\Delta\text{CCP}8$  i amb el FH, totes elles combinades amb LPS des del dia 5.

### **4.6.5. AVALUACIÓ DE LA CAPACITAT ENDOCÍTICA DE LES CDs**

La capacitat endocítica de les CDs va ser determinada per citometria de flux utilitzant DQ-Ovalbumin conjugada a BODIPY FL dye (Molecular PROBES, Leiden Netherland) que té una fluorescència d'excitació i d'emissió màxima de 505 a 515 nm.  $2 \times 10^5$  CDs en un volum final de 100  $\mu\text{l}$  de medi de cultiu van ser incubades amb 4  $\mu\text{l}$  de DQ-Ovalbumin a una concentració de 1 mg/ml a 37°C durant 15 min, en fosc. Per a determinar l'endocitosis no específica de DQ-Ovalbumin per les CDs, la mateixa quantitat de cèl·lules van ser incubades a 4°C durant 15 min en fosc (control negatiu). Passat el temps d'incubació les CDs van ser rentades 2 vegades amb tampó FACS i centrifugades a 16000 rpm durant 1 min a 4°C. Finalment, les cèl·lules es van resuspendre en 300-500  $\mu\text{l}$  de tampó FACS i es va realitzar l'anàlisi citomètric mitjançant citometria de flux. Les dades obtingudes van ser analitzades mitjançant el programa CellQuestPro.

### 4.6.6. ASSAIG DE QUIMIOTAXI

Es va voler determinar si la isoforma  $\alpha 7\beta 0$  de la proteïna plasmàtica C4BP i el Factor H eren capaços de reduir la quimiotaxi de les CDs en resposta a quimioquines. Aquesta va ser determinada mesurant la migració de les CDs a través d'un filtre de policarbonat (8  $\mu\text{m}$  de tamany de porus) en plaques de 12 pous denominades *12-wells Transwell chambers* (Costar Europe) utilitzant RPMI 10% FBS com a medi d'assaig. Primer de tot es va realitzar un període d'equilibri dels filtres, per tal de millorar la unió de les cèl·lules, afegint medi als *transwells* i incubant la placa durant una hora a la mateixa temperatura de creixement de les cèl·lules. A la part superior es van sembrar  $1 \times 10^5$  CDs estimulades amb LPS i no tractades o tractades durant tot el cultiu amb les proteïnes  $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 0$  o FH en 100  $\mu\text{l}$  de medi RPMI 1640 + 10% de FBS, i a la part inferior 400  $\mu\text{l}$  del mateix medi amb o sense quimioquines CCL21 (a una concentració de 200 ng/ml). Les cèl·lules van ser incubades durant 2 hores a 37°C i amb un 5% de CO<sub>2</sub>. La totalitat de cèl·lules que van migrar van ser comptades mitjançant citometria de flux adquirint events per un temps fix de 2 min i utilitzant el programa CellQuestPro (Beckton Dickinson). Cada experiment es va realitzar per triplicat. Els valors són donats com el percentatge del nombre mig de cèl·lules migrades respecte el total i relativitzats al valor de les CDm.

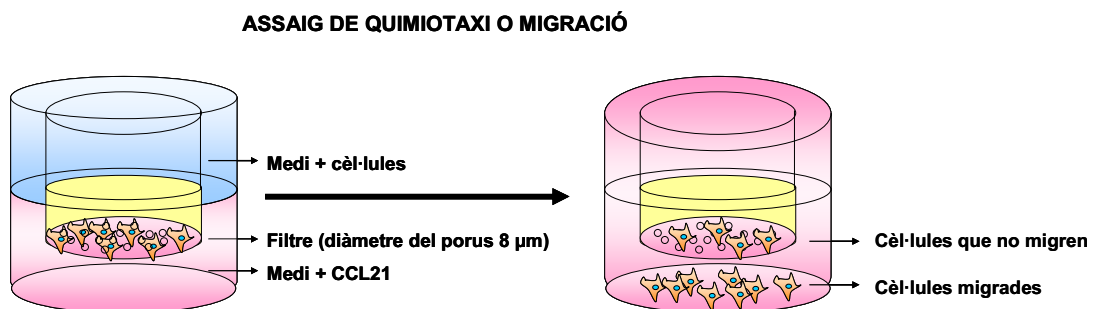


Figura 16. Esquema de l'assaig de quimiotaxis realitzat en CDs en estat madur i tractades amb  $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 0$  o FH des del principi del cultiu i afegint LPS a dia 5.

### 4.6.7. ESTUDIS D'APOPTOSI

Durant el procés de desenvolupament embrionari d'un organisme o durant els processos encaminats a mantenir l'homeòstasi d'aquest, és necessari eliminar cèl·lules no desitjades. Aquest procés es denomina mort cel·lular programada o apoptosi. L'apoptosi pot ser activada per diferents estímuls tals com dany al DNA, citoquines, pèrdua de matriu extracel·lular, etc...[212]. Dins del rang de processos comunament utilitzats en la detecció de l'apoptosi està la detecció de degradació del DNA, canvis en la simetria de la membrana cel·lular i activació de proteïnes específiques. Per a l'avaluació de toxicitats cel·lulars els mesuraments amb Blau

de tripà no són suficients ja que no permeten descartar a les cèl·lules apoptòtiques (que segueixen sent impermeables al Blau de tripà en els primers estadis d'apoptosi) de les necròtiques [213, 214]. Per això primerament s'ha estudiat el nombre de cèl·lules que són encara actives o viables. S'ha de tenir en compte que, encara que el procés apoptòtic pot durar des d'unes poques hores fins a uns dies, una vegada generat, les cèl·lules apoptòtiques tenen un temps de vida finit abans de desintegrar-se [215].

### 4.6.7.1. Detecció d'Annexin V/7-ADD

És un estudi d'apoptosi primerenca. En els primers estadis de l'apoptosi es produeix la pèrdua de la simetria de la membrana citoplasmàtica. En l'apoptosi la integritat de la membrana es manté, és a dir, la semipermeabilitat es troba present. No obstant això, es produeixen canvis en la simetria de la membrana. Un d'aquests canvis és la distribució de la fosfatidil serina, la qual és una molècula que es troba orientada cap a l'interior de la cèl·lula, i que, en activar-se el procés d'apoptosi, es transloca a la membrana externa. Un dels mètodes que permeten detectar la presència o absència de fosfatidilserina a l'exterior de la membrana cel·lular és el que utilitza Annexin V. Aquesta és una molècula que no és capaç de difondre a través de la membrana cel·lular. Té afinitat per la fosfatidil serina pel que queden marcades amb Annexin V aquelles cèl·lules que es trobin en els primers estadis de l'apoptosi.

El marcatge amb Annexin V precedeix la pèrdua d'integritat de membrana que acompanya les etapes més tardanes de mort de la cèl·lula que resulta en qualsevol procés apoptòtic o necròtic. Per això, el marcatge amb Annexin V és típicament utilitzat conjuntament amb un tint vital com 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) per permetre identificar cèl·lules apoptòtiques primerenques (Annexin V positives, 7-ADD negatives). 7-ADD permet distingir cèl·lules vives de les mortes [217, 218]. Per exemple, cèl·lules que són considerades viables són Annexin V i 7-ADD negatives; cèl·lules que estan en estat d'apoptosi primerenca són Annexin V positives i 7-ADD negatives; o cèl·lules que estan en apoptosi tardana o ja mortes són Annexin V i 7-ADD positives. Aquest assaig no distingeix, per se, entre cèl·lules que ja han sofert mort per apoptosi i aquelles que han mort com a resultat d'una via de necrosi, perquè en ambdós casos, les cèl·lules mortes es tenyiran amb Annexin V i 7-ADD.

Es mesura el grau de translocació de la fosfatidilserina en la membrana cel·lular amb marcatge mitjançant Annexin V-PE (Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I, 559763, BD Pharmigen<sup>TM</sup>) per determinar el grau d'apoptosi i 7-ADD (51-68981E, BD Pharmigen<sup>TM</sup>) per distingir les cèl·lules viables de les no viables. Les cèl·lules viables exclouen 7-ADD ja que tenen la membrana intacta, mentre que la membrana de les cèl·lules danyades o mortes és

## Materials i Mètodes

permeable a 7-ADD. Per realitzar aquest assaig es resuspenen les cèl·lules en 40 µl de tampó Annexin 1x (10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) a una concentració de 2x10<sup>5</sup> cèl·lules/ml. S'afegeixen 2.3 µl d'Annexin V-PE i 2.3 µl de 7-ADD a cada suspensió cel·lular i s'incuba en la foscor i a temperatura ambient durant 18 min. Després s'afegeixen 100 µl de PBS seguit de l'utilització de *Perfect-Count Microspheres*<sup>TM</sup> a un volum igual al volum de cèl·lules marcades. Es mantenen les mostres en gel procurant realitzar l'anàlisi en el citòmetre de flux el més aviat possible.

### **4.6.8. PROLIFERACIÓ DE LIMFÒCITS AUTÒLEGS**

Al mateix temps que es purifiquen monòcits per adhesió al plàstic, la fracció que no s'adhereix s'enriqueix en limfòcits. Les cèl·lules mononucleades no adherents que resulten d'una purificació per adherència al plàstic són principalment limfòcits en més d'un 90%. No obstant, també es poden obtenir limfòcits T a partir de sang perifèrica per purificació de la població CD3<sup>+</sup> mitjançant boles magnètiques, de manera que es poden obtenir poblacions enriquides entre un 95% i un 99% de cèl·lules CD3<sup>+</sup>.

CD3 pertany a la família de les immunoglobulines i és un tipus d'antigen CD propi del sistema immune de mamífers. La seva funció biològica és intervenir en la transducció de senyals, en l'expressió del TCR en la superfície de la cèl·lula i en l'associació a aquest últim receptor. S'expressa específicament en timòcits i cèl·lules T [218].

#### **4.6.8.1. Obtenció de limfòcits TCD3<sup>+</sup> de sang perifèrica**

Els limfòcits T CD3<sup>+</sup> es van seleccionar a partir de PBMC provinents de sang perifèrica (*Buffy Coat*) mitjançant boles magnètiques realitzant una selecció negativa amb el kit *EasySep Human T Cell Enrichment Kit* (19051, StemCell Technologies, Grenoble, France).

#### ***EasySep Human T Cell Enrichment Kit***

El protocol que es va seguir va ser el següent: es van resuspendre les cèl·lules a raó de 5x10<sup>7</sup> cèl·lules/ml en tampó PBS en un tub de poliestirè. Es va afegir *EasySep*<sup>®</sup> *Human T Cell Enrichment Cocktail* a 50 µl/ml de cèl·lules i es va incubar 10 min a temperatura ambient. Es van barrejar les *EasySep*<sup>®</sup> *Magnetic Nanoparticles* per assegurar-nos que formen una suspensió uniforme i es van afegir 50 µl/ml de cèl·lules. Es va incubar 10 min a temperatura ambient. Es va afegir PBS fins a un volum de 2.5ml i es va posar el tub dins l'iman durant 5 min. Es va recuperar la fracció sobrenedant on romanen les cèl·lules CD3<sup>+</sup> girant l'iman en un moviment continu sense treure el tub. Les cèl·lules marcades magnèticament romanen enganxades a les

parets del tub gràcies al camp magnètic creat pel *EasySep*<sup>®</sup> *Magnet*. Es va treure el tub de l'iman i es van recuperar les cèl·lules enganxades mitjançant 2.5 ml de PBS. Es va tornar a col·locar el tub dins l'iman, es va deixar 5 min més i es va invertir l'iman i el tub per recuperar la fracció sobrenedant. Les fraccions negatives es van juntar i centrifugar 5 min a 1200-1300 rpm i els pelets es van resuspendre en medi de cultiu.

La puresa de les cèl·lules T provinents de sang perifèrica va ser mesurada per citometria de flux després de marcar  $2 \times 10^5$  cèl·lules amb l'anticòs anti-humà CD3 conjugat amb el fluorocrom ficoeritrina (345765, Clone SK7, Becton Dickinson) a una concentració de 4 µg/ml seguit per l'utilització de *Perfect-Count Microspheres*<sup>TM</sup> a un volum igual al volum de cèl·lules marcades.

### 4.6.8.2. Marcatge intracel·lular dels limfòcits T amb CFSE

Per avaluar proliferacions limfocitàries s'utilitzen principalment dos mètodes: el marcatge amb timidina tritiada i el marcatge amb CFSE o un altre fluorocrom de característiques similars. Els partidaris d'un mètode o de l'altre aporten arguments contundents per defensar les seves postures i per invalidar el mètode contrari. El marcatge radioactiu és més ràpid de dur a terme i aporta paràmetres quantitius que permeten avaluar les proliferacions fàcilment. No obstant, no informen sobre el que passa en el cultiu. Únicament s'obtenen dades del punt inicial i el punt final, de manera que el que té lloc durant el procés és una incògnita.

En canvi, el marcatge amb CSFE permet una aproximació major al que passa realment en el cultiu. Permet saber si les cèl·lules estan o no proliferant i amb quina intensitat ho estan fent. Una contaminació del cultiu seria ràpidament detectada perquè és difícil que el contaminant es trobi ubicat en la mateixa zona del citograma que els limfòcits. A més, permet descartar limfòcits no viables que contínuament moren en proliferar les cèl·lules i que el mètode de la timidina tritiada té en compte com a vàlids si encara no han estat degradats per complet en el cultiu. La desavantatge del mètode citomètric és que l'anàlisi no és quantitatiu com el mètode radioactiu, per la qual cosa es fa necessari un anàlisi exhaustiu de les dades obtingudes per aconseguir resultats objectius.

És per això que s'està realitzant un gran esforç per proporcionar dades estadístiques que permetin avaluar objectivament les proliferacions mesurades amb CFSE. S'han desenvolupat programes com el FlowJo 5.7.2. (Tree Star, Inc; Ashland; USA) que, de manera totalment automatitzada, avalua i calcula les diferents generacions presents en l'histograma i també molts altres paràmetres estadístics, entre els quals es troba el percentatge de cèl·lules inicials que s'han dividit (percentatge de cèl·lules dividides, %CDs). Aquest paràmetre permet calcular

## Materials i Mètodes

mitjançant càlculs de creixements poblacionals reversos la proporció de limfòcits presents en la població primigènia que s'activen i donen lloc a la distribució de poblacions generacionals que mostra el citòmetre. Aquest paràmetre no coincideix amb el nombre real de limfòcits que s'activen ja que l'activació limfocitària provoca l'entrada en apoptosi de gran quantitat de limfòcits en cada duplicació, els quals són descartats en realitzar l'estudi. No obstant, si és un anàlisi objectiu dels resultats des del punt de vista comparatiu.

Per determinar la proliferació limfocitària produïda per les CDs es va avaluar l'estat de les CDs exclusivament, de manera que la proliferació únicament serà estudiada en relació a l'estat de la CD. Es va comparar les proliferacions tractades amb les proliferacions control.

El CFDA/CFSE és un compost capaç de difondre passivament a través de les membranes cel·lulars. El CFSE consisteix en una molècula de fluoresceïna amb dos grups acetat i un grup funcional èster succinimida. En aquest estat, és permeable, incolor i no fluorescent. Després d'entrar a la cèl·lula, esterases intracel·lulars eliminen els grups acetat, transformant el compost en Carboxifluoresceïna Succinimidil Èster, el qual és altament fluorescent i no permeable a la membrana cel·lular. A més el Succinimidil èster reacciona amb grups amina de proteïnes intracel·lulars, formant grups conjugats fluorescents que són ben retinguts a la cèl·lula. Les proteïnes que tenen una vida llarga, incloent alguns components del citoesquelet, són els que es creu que confereixen al CFSE la llarga durada de la seva tinció. L'excés de compost sense conjuguar i els productes col·laterals difonen passivament al medi extracel·lular, on poden ser rentats i eliminats.

Els aductes proteïna-CFSE que es formen a les cèl·lules marcades són retinguts per aquestes a través del seu desenvolupament, meiosi i fins i tot poden utilitzar-se *in vivo*. El marcatge és heretat per les cèl·lules filles després de la divisió cel·lular, o per fusió cel·lular i no és transferida a altres cèl·lules adjacents de la població. Limfòcits tenyits amb CFDA-SE poden ser detectats fins a vuit setmanes després de la injecció en ratolins en estudis de migració limfocitària; hepatòcits viables tenyits de forma similar van ser localitzats fàcilment mitjançant microscopia de fluorescència fins i tot 20 dies després del trasplantament intrahepàtic [219].

Els pics aproximats d'excitació i emissió d'aquest producte després de la hidròlisi són 492 nm i 517 nm respectivament. Les cèl·lules marcades amb CFDA-SE poden ser visualitzades amb microscopia de fluorescència. Es recomana que per a tincions a llarg termini (més de tres dies) o per a cèl·lules amb temps de divisió molt ràpids, la concentració no baixi de 5-10  $\mu\text{M}$ . En experiments més curts tals com assaigs de viabilitat, la concentració ideal oscil·la entre 0.5-5  $\mu\text{M}$ . Per mantenir la fisiologia cel·lular normal i reduir al màxim els

potencials artefactes produïts per una sobrecàrrega, es recomana mantenir sempre la concentració de tinció el més baixa possible. El marcatge amb CFDA-SE pot arribar a ser tòxic i pot induir parada en el creixement cel·lular així com apoptosi en alguns tipus cel·lulars si es troba en concentracions excessives.

En el tractament amb limfòcits, el marcatge amb CFSE permet diferenciar fins 8 o 10 divisions cel·lulars. Això ve determinat per l'autofluorescència dels limfòcits no tenyits. El temps que solen emprar els limfòcits en realitzar 6-7 divisions sol ser de 96 hores o 4 dies.

El procés que es va dur a terme per realitzar aquest assaig va ser el següent: el marcatge es va realitzar dissolent el CFDA-SE en estat sòlid en DMSO fins a tenir una concentració de 5 mM. Aquest compost va ser diluït en PBS 1x realitzant una dilució 1:4000. Tots els rentats després del marcatge es van realitzar amb RPMI 10% FBS. L'alta concentració de proteïna ajuda a inactivar el CFDA-SE que no ha reaccionat. Es van resuspendre les cèl·lules en PBS a una concentració de  $5 \times 10^6$  cèl·lules/ml. Els volums totals de reacció no haurien d'excedir els 4 ml en un tub de 15 ml pel qual les suspensions cel·lulars no han de ser superiors a 2 ml cada una. Es va barrejar la solució amb la suspensió cel·lular a volums 1:1 (suspensió cel·lular:CFSE 1:4000). Es van barrejar ambdues solucions, agitar suaument i incubar 12 min a temperatura ambient i en foscor. Una vegada realitzat el marcatge es van omplir els tubs amb medi de cultiu (RPMI 10% FBS) el màxim possible i es va centrifugar a 1200 rpm durant 5 min. Es van resuspendre les cèl·lules en 3 ml de RPMI 10% FBS i es van incubar al bany a 37°C durant 15 min. Això permet que el CFDA-SE que no hagi reaccionat difongui fora de les cèl·lules i pugui ser eliminat en el rentat final. Es van tornar a rentar les cèl·lules amb RPMI 10% FBS i es van centrifugar a 1200 rpm durant 5 min. Finalment es van resuspendre les cèl·lules en medi X-VIVO 15 suplementat amb 2 % *Human Serum AB*, L-glutamina (2 mM), i antibiòtics (penicil·lina 100 unitats/ml i estreptomina 100 µg/ml) a una concentració de  $1 \times 10^5$  cèl·lules/100 µl de medi i es va repartir en plaques de cultiu de 96 pous (U96 MicroWell™ Plates, Polystyrene Clear, Nunclon TM Surface. Roskilde, Denmark).

### 4.6.8.3. Enfrontament limfòcit-cèl·lula dendrítica

Les CDs carregades amb un determinat antigen poden activar la proliferació limfocitària en poblacions de limfòcits no activats prèviament. Aquestes proliferacions solen ser òptimes quan la relació dendrítica:limfòcit és de 1:10. Amb relacions menors tals com a 1:20 o 1:40 les proliferacions també es produeixen encara que amb menor intensitat. En canvi, les proliferacions sofreixen descensos acusats en passar de 1:40 a 1:80 o 1:160. En aquest punt



## Materials i Mètodes

es produeix un salt qualitatiu important en la capacitat d'activar proliferacions limfocitàries per part de la CD.

El procés que es va dur a terme es descriu a continuació: les CDs i els limfòcits es van cultivar conjuntament a raó de  $10^5$  limfòcits per pou i concentracions de CDs de  $2.5 \times 10^3$ ,  $1.25 \times 10^3$  i  $6.25 \times 10^2$  (relació dendrítica:limfòcit T 1:40, 1:80 i 1:160) en un volum final de 200  $\mu$ l de medi X-VIVO 15 suplementat amb 2 % *Human Serum AB*, L-glutamina (2 mM), i antibiòtics (penicil·lina 100 unitats/ml i estreptomomicina 100  $\mu$ g/ml). Es van realitzar 4 rèpliques de cada condició. Prèviament al cocultiu les CDs havien estat tractades amb diferents estímuls: les isoformes  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$  de la proteïna plasmàtica purificada C4BP i FH durant tot el cultiu i a dia 5 es va afegir l'estímul maduratiu LPS. Els limfòcits havien estat tenyits amb CFSE.

Després de ser cultivades 120 hores el contingut en CFSE de les cèl·lules va ser mesurat mitjançant citometria de flux. Els assaigs es van realitzar en plaques de 96 pous. Els controls que es van realitzar van ser els següents: limfòcits marcats i sense estimular per avaluar la possible toxicitat del CFDA-SE i limfòcits marcats i estimulats amb PMA (25 ng/ml) i ionomicina (250 ng/ml).

Com a control també es va utilitzar la vitamina D3, a una concentració de 2.4  $\mu$ M (calcitriol, Calcigex®, Abbott Laboratories, S.A.). La vitamina D3 inhibeix la proliferació de limfòcits T i la producció de citoquines ja que actua sobre la diferenciació i maduració de les CDs, donant lloc a la generació de CDs amb un fenotip tolerogènic.

Els limfòcits marcats amb CFSE no necessiten cap marcatge addicional. El propi CFSE és un compost cromogènic mesurable citomètricament, es resuspèn en tampó FACS després de dos rentats i es passen les cèl·lules directament pel citòmetre.

### **4.6.9. CITOMETRIA DE FLUX I ANÀLISI DE LES DADES**

Totes les anàlisis de fenotipatge per FACS (*Fluorescence activated cell sorting*) van ser realitzades emprant el citòmetre de flux FACSCalibur de Becton-Dickinson del servei científic-tècnic de l'IDIBELL (Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge). Mentre que els assajos de proliferació cel·lular i d'apoptosi es van realitzar amb el citòmetre de flux FACSCanto en el servei científic-tècnic del LIRAD (Laboratori d'Immunobiologia per a la Recerca i les Aplicacions Diagnòstiques).

#### 4.6.9.1. Citometria de Flux

Les cèl·lules van ser analitzades per la tècnica de citometria de flux utilitzant el citòmetre FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, USA) mirant dos fluorocroms (Isotiocianat de Fluoresceïna, FITC, i Ficoeritrina, PE), equipat amb un laser d'argó de 488nm i FACS CANTO Becton Dickinson, CA, USA) mirant diferents fluorocroms, equipat amb tres làsers: blau (488nm), vermell (633nm), i violeta (405nm). Entre 2.500 i 30.000 events van ser adquirits i analitzats mitjançant el programa CellQuestPro i FlowJo 5.7.2.

##### a) Determinació de l'expressió de marcadors superficials en cèl·lules dendrítiques

Per procedir al marcatge de les mostres, les CDs van ser recollides mitjançant tripsina 1x o rentats amb PBS. Després es van centrifugar 10 min a 1000 rpm i es van resuspendre els pelets en tampó FACS. Aquest tampó conté Azida sòdica la qual paralitza a la cèl·lula impedit-li endocitar els anticossos de marcatge. Un cop s'ha afegit el tampó FACS a les cèl·lules, la mesura citomètrica s'ha de realitzar durant les 24 hores següents de l'addició. Passat aquest temps les cèl·lules comencen a degradar-se.

Per a mesurar l'expressió de les molècules de superfície de les cèl·lules es va realitzar una tècnica de marcatge directa en la qual s'utilitzen anticossos conjugats directament a un fluorocrom que reconeixen cada marcador de superfície cel·lular. Els fluorocroms utilitzats presenten poc solapament, la qual cosa permet detectar cada emissió de manera separada mitjançant sistemes de filtres òptics. Els diferents fluorocroms utilitzats i les seves energies d'excitació i d'emissió es mostren en la següent Taula:

TAULA 14. Fluorocroms utilitzats		
Fluorocorm	Ex (nm)	Em (nm)
R-Phycoerythrin (PE)	480; 565	578
PE-Cy7 conjugates	480; 565; 743	767
Fluorescein (FITC)	495	519
APC-Cy7 conjugates	650; 755	767
Allophycocyanin (APC)	650	660

Els marcadors superficials que es van analitzar van ser CD14, CD1a, CD83, CD40, CD86, CD80, HLA-DR, CD206 i CCR7. Aproximadament  $7.5 \times 10^4$ - $2 \times 10^5$  cèl·lules van ser incubades amb els anticossos (de 2 a 5  $\mu$ l) durant 20 min en foscor, rentades dues vegades amb tampó FACS i centrifugades a velocitat màxima durant 1 min a 4°C. Finalment, les cèl·lules es van resuspendre en 300-500  $\mu$ l de tampó FACS i es va realitzar l'anàlisi citomètric.

## Materials i Mètodes

A causa de la sensibilitat dels citòmetres és convenient utilitzar controls negatius en les tincions. Els controls utilitzats van ser:

- Control isotípic: processar una part de la mostra utilitzant un anticòs del mateix isotip i conjugació que l'utilitzat en la tinció.
- Control d'autofluorescència: cèl·lules sense marcar.

El processament dels controls ha estat el mateix que el de les mostres. Per quantificar l'expressió de marcadors superficials es van fer servir els anticossos monoclonals humans que es descriuen en la Taula 15.

<b>TAULA 15. Anticossos monoclonals utilitzats en Citometria de Flux. Tots els anticossos són originats en ratolí.</b>					
<b>Especificitat</b>	<b>Clon</b>	<b>Isotip</b>	<b>Conjugació</b>	<b>Aplicació</b>	<b>Fabricant</b>
HLA-DR	Immu-357	IgG1	FITC	Primari	Beckman-coulter
Isotip control IgG1	4E02	IgG1	FITC	Primari	Beckman-coulter
CD83	HB15a	IgG2b	FITC	Primari	Beckman-coulter
Isotip control IgG	H2	IgG2b	FITC	Primari	Beckman-coulter
CD14	RMO52	IgG2a	FITC	Primari	Beckman-coulter
Isotip control IgG2	7T4-1F5	IgG2a	FITC	Primari	Beckman-coulter
CD40	MAB89	IgG1	PE	Primari	Beckman-coulter
CD1a	BL6	IgG1	PE	Primari	Beckman-coulter
CD80	MAB104	IgG1	PE	Primari	Beckman-coulter
Isotip control IgG1	4E02	IgG1	PE	Primari	Beckman-coulter
CD86	HA5.2B7	IgG2b $\kappa$	PE	Primari	Beckman-coulter
Isotip control IgG	H2	IgG2b	PE	Primari	Beckman-coulter
HLA-DR	1243	IgG2A	APC-Cy7	Primari	Becton-Dickinson
CD83	4B15e	IgG1 $\kappa$	APC	Primari	Becton-Dickinson
CD14	UCHT1	IgG1	PE	Primari	Beckman-coulter
CD14	M5E2	IgG2a	PE-Cy7	Primari	Becton-Dickinson
CD40	5C3	IgG1	PE	Primari	Becton-Dickinson
CD86	FUN-1, 2331	IgG1	FITC	Primari	Beckman-coulter
CCR7	TG8/CCR7	IgG2a $\kappa$	Alexa Fluor 488	Primari	Biologend
Isotip control IgG	MOPC-173	IgG2a $\kappa$	Alexa Fluor 488	Primari	Biologend
CD206	15-2	IgG1 $\kappa$	PE	Primari	Biologend

Un dels principals problemes en analitzar cèl·lules en un citòmetre és la presència de cèl·lules mortes i nuclis aïllats als quals s'uneixen de manera inespecífica els anticossos. Per solucionar aquest problema es va utilitzar Iodur de Propidi (IP) per tenyir les cèl·lules mortes i comprovar la viabilitat cel·lular. IP és un fluorocrom que s'intercala en els àcids nucleics incrementant sensiblement la seva fluorescència. La membrana de les cèl·lules vives no permet

el seu pas a l'interior del citoplasma, de manera que únicament tenyirà les cèl·lules que tinguin danyada la membrana (mortes) i els nuclis aïllats.

Es va afegir IP d'una concentració de 5 µg/ml a una dilució de 1:100.

Solucions:

-PBS 1X: KCl 0.20 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.20 g/L; NaCl 8g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 g/L.

-Tampó FACS: PBS; 0.1% Azida sòdica (NaNH<sub>3</sub>); 1% BSA (Albúmina sèrica bovina).

### **b) Avaluació de la capacitat endocítica de les cèl·lules dendrítiques**

La capacitat endocítica de les CDs en les diferents condicions experimentades va ser determinada per citometria de flux utilitzant DQ-Ovalbumin conjugada a BODIPY FL dye (D-12053, Molecular PROBES, Leiden Netherland) que té una fluorescència d'excitació i d'emissió màxima de 505 a 515 nm. El procediment dut a terme es descriu en l'apartat 3.6.5 de Materials i Mètodes.

### **c) Anàlisi d'apoptosi**

La viabilitat de les CDs en les diferents condicions experimentades va ser determinada per citometria de flux utilitzant la tinció per Annexin V-PE i 7-ADD que tenen unes energies d'excitació de 480/565 nm i 546 nm respectivament i unes energies d'emissió de 578 nm i 647 nm respectivament, de manera que presenten poc solapament i permet detectar cada emissió de manera separada mitjançant sistemes de filtres òptics.

El procediment dut a terme es descriu en l'apartat 7.6.7.1. de Materials i Mètodes.

### **d) Assaig de quimiotaxi**

Mitjançant citometria de flux adquirint events per un temps fix de 2 min i utilitzant el programa CellQuestPro (Beckton Dickinson) es va analitzar la capacitat de migració de les CDs en les diferents condicions experimentades.

El procediment dut a terme es descriu en l'apartat 4.6.6. de Materials i Mètodes.

### **e) Determinació de proliferació de Limfòcits T per CFSE**

Es va realitzar el cocultiu de CDs, prèviament tractades en les diferents condicions experimentades, amb limfòcits T CD3<sup>+</sup> procedents de sang perifèrica i marcats amb CFSE, a una proporció cel·lular 1:40, 1:80 i 1:160 en plaques de 96 pous durant 120 hores.

## Materials i Mètodes

Passat aquest temps es van recollir les cèl·lules i es van analitzar les proliferacions limfocitàries per citometria de flux tal i com es descriu en l'apartat 4.6.8. de Materials i Mètodes.

### 4.6.9.2. Anàlisi de dades

La Citometria de Flux és una tècnica que permet obtenir informació sobre les característiques físiques (fenotípiques) i químiques (metabòliques) de les cèl·lules. Les dades obtingudes van ser analitzades mitjançant el programa CellQuestPro o Flowjo 5.7.2. utilitzant tècniques d'anàlisi multiparamètric, que es basen en seleccionar diferents poblacions de cèl·lules en funció de diferents paràmetres (*gating*) i es van representar mitjançant **Histogrames de freqüències** que poden ser unidimensionals (o monoparamètrics) o bidimensionals (o biparamètrics). En un histograma monoparamètric el paràmetre estudiat es presenta en l'eix de les X mentre que el número de cèl·lules es presenta en l'eix de les Y. En un biparamètric els eixos X i Y esta ocupats pels dos paràmetres estudiats i el número de cèl·lules ocupa l'eix Z, aquests histogrames es poden representar de tres maneres diferents: "dot plot", "contour plot" o representació isomètrica.

Els estadístics més emprats per a caracteritzar una població són: el **percentatge** de cèl·lules que presenten un determinat fenotip, i els característics de la distribució normal, la **median** d'un paràmetre, la **mitjana aritmètica**, la **desviació estàndard**, el **percentatge de variació**, la **moda o pic** (el canal on hi ha el màxim número de cèl·lules).

Les dades del percentatge de cèl·lules positives i de la intensitat de fluorescència mitja (MFI, *Median Fluorescence Intensity*) per a totes les dades experimentades són representades com la mitja  $\pm$  la desviació estàndard.

## **4.7. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA MITJANÇANT PCR A TEMPS REAL O qRT-PCR**

Generalment els resultats dels experiments de microarrays han de ser validats per mitjà de plataformes, i entre elles la PCR a temps real és la més extensa.

La PCR a temps real o PCR quantitativa és una variació de la PCR estàndard utilitzada per a la quantificació de DNA o de RNA missatger (mRNA) d'una mostra. Utilitzant encebadors específics de seqüència, és possible determinar el número de còpies o la quantitat relativa d'una determinada seqüència de DNA o RNA.

Quan la PCR a temps real es combina amb una reacció de retro-transcripció o RT (RT-PCR), pot determinar-se la quantitat de mRNA d'una mostra mitjançant una quantificació relativa. Aquesta quantificació es denomina relativa ja que compara entre diferents mostres (teixits, tractaments, *time-points*, ...) la quantitat relativa o la relació del mRNA d'un gen específic respecte a la quantitat de mRNA d'un gen constitutiu (control endogen). Per a la quantificació, es mesura en cada cicle de PCR la quantitat d'amplicó produït. La quantificació del producte es produeix mitjançant l'addició de fluoròfors que s'uneixen a l'amplicó de forma quantitativa, de manera que a major producte major fluorescència emesa.

Els sistemes de PCR a temps real detecten la quantitat de fluorescència produïda en cada cicle de PCR i els softwares d'anàlisi representen aquesta fluorescència gràficament respecte al nombre de cicles. La quantitat d'amplicó produït és proporcional al nombre de molècules de RNA/DNA inicials, de manera que en aquelles mostres amb major expressió del gen l'amplicó fluorescent apareixerà en cicles anteriors.

### **a) Tipus de fluorocroms**

S'utilitzen principalment dos tipus de fluorocroms. Un mètode molt utilitzat per el seu menor cost és emprar fluoròfors que s'uneixen al DNA de doble cadena, com el SYBR Green. El SYBR Green s'uneix inespecíficament al DNA de doble cadena i produeix fluorescència. Aquests fluorocroms no són específics ja que s'uneixen a tota molècula de DNA de doble cadena, incloent els dímers d'encebadors (*primer-dimers*). Una altra alternativa, més cara però recomanada quan hi ha problemes d'especificitat, és l'ús de sondes específiques fluorescentes, com les sondes TaqMan. Aquesta tècnica permet la quantificació específica del cDNA d'interès fins i tot en la presència d'amplificació inespecífica (dímers d'encebadors, DNAg). L'ús de SYBR Green implica un disseny molt acurat dels encebadors a fi d'evitar dímers d'aquests, i evitar l'amplificació de DNA genòmic contaminant a la mostra de cDNA, per a això, s'han de dissenyar els encebadors de manera que l'amplicó contingui seqüències de diferents exons.

### **b) Controls endògens**

La mesura de l'expressió gènica per mitjà de RT-PCR és una quantificació relativa, en la que es compara entre les diferents mostres l'expressió del gen objecte d'estudi respecte a l'expressió d'un gen constitutiu l'expressió del qual no varia en les condicions de l'experiment (control endogen). És el que es denomina com a normalització de l'expressió del gen específic, o normalitzar respecte a la diferent concentració de RNA total de les mostres, ja que si la

## Materials i Mètodes

quantitat de control endogen varia és a causa de canvis en la quantitat de RNA total empleada en la síntesi de cDNA, no a canvis en la seva expressió. Els gens més utilitzats com controls endògens són: rRNA 18 S, GAPDH,  $\beta$ -actina, TBP, HPRT,  $\beta$ -2-microglobulina, entre altres. No existeix cap gen l'expressió del qual no varia en cap de les condicions, s'ha de valorar quin seria el millor control endogen per a cada experiment.

### **c) Mètodes de quantificació**

Existeixen principalment dos mètodes de quantificació, depenent si l'eficiència d'amplificació del gen objecte d'estudi i el del gen de referència són comparables: Mètode del  $\Delta\Delta Ct$ , en el qual es comparen directament els Cts del gen testat i del gen de referència ( $\Delta Ct$ ) en cada mostra, i posteriorment es comparen els  $\Delta Ct$  de la mostra experimental respecte a la mostra control, per aplicar l'esmentat mètode és necessari que les eficiències d'ambdós gens siguin similars. L'altre mètode es basa en la utilització d'una recta estàndard a partir de cDNAs de concentracions conegudes, i extrapolar la concentració del gen a la mostra experimental a partir del Ct obtingut, posteriorment es calcularia la relació entre la quantitat del gen testat i el gen de referència, i es compararia l'esmentada relació entre les mostres.

Existeix un tercer mètode, similar al  $\Delta Ct$ , però corregit per a les eficiències dels diferents gens: Mètode Pfaffl [220].

### **d) Requisits de les mostres**

Es requereix un RNA de gran puresa i integritat i lliure de contaminació de DNA genòmic per a la síntesi de cDNA. Els requisits específics del RNA total són:  $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ ,  $A_{260}/A_{230} \geq 1.8$ , relació rRNA 28S/18S  $\geq 1.2$ . En el cas de disposar del bioanализador 2100 Bioanalyzer de Agilent, es recomana un RIN 7. En el cas de RNA de menor qualitat, disminueix l'eficiència, sensibilitat i precisió dels resultats. En aquells casos en els quals la contaminació de DNA genòmic afecti la sensibilitat i especificitat de l'assaig de PCR a temps real es recomana el tractament de la mostra amb DNAsa, bé després de la seva extracció o bé durant el procés d'extracció, emprant kits que contenen DNAsa. És important eliminar de la mostra de RNA la DNAsa després del tractament, ja que inhibeix la síntesi de cDNA.

#### **4.7.1. EXTRACCIÓ DE RNA TOTAL**

El RNA total de les cèl·lules en cultiu va ser aïllat utilitzant el kit *RNAeasy RNA Isolation Kit* (Qiagen). Les restes de DNA genòmic contaminant de la mostra van ser digerits

amb l'enzim *desoxiribonuclease I (DNAsa I)* utilitzant el reactiu DNAfree (Ambion) seguint les instruccions recomanades pel fabricant.

Posteriorment, el RNA va ser quantificat llegint l'absorbància a 260 nm mitjançant l'espectrofotòmetre Nanodrop® (ND-1000 *spectrophotometer*, Nucliber) i la seva qualitat va ser comprovada per electroforesi en un gel d'agarosa al 1 % no desnaturalitzat i posterior visualització per tinció amb bromur d'etidi (0.15 µg/ml).

### **4.7.2. RETROTRANSCRIPCIÓ O TRANSCRIPCIÓ REVERSA (RT)**

La síntesi de la cadena de DNA complementari (cDNA) a partir del RNA, es va realitzar amb la transcriptasa reversa Omniscript, utilitzant el sistema *Omniscript RT KIT* (Qiagen). Seguint les instruccions del fabricant, de 500 ng a 1 µg, en el cas de les cèl·lules dendrítiques, i de 1.5 µg, en el cas de les HUVEC, de RNA total van ser retrotranscrits a cDNA. Els productes de cDNA obtinguts van ser analitzats mitjançant PCR a temps real (*Real Time Polymerase Chain Reaction*).

### **4.7.3. PCR SEMIQUANTITATIVA A TEMPS REAL**

Per tal de quantificar l'expressió gènica es va utilitzar la tècnica de PCR quantitativa a temps real. Es tracta d'una tècnica molt sensible que permet quantificar nivells d'expressió gènica de manera ràpida i reproducible, monitoritzant l'amplificació a temps real. La PCR a temps real permet tant una quantificació absoluta del nombre de còpies del mRNA com una quantificació relativa. En aquest treball es va optar per la quantificació relativa, que es basa en mesurar l'expressió del gen diana respecte a un gen de referència o gen d'expressió constant (*housekeeping*) que s'utilitza com a element normalitzador.

S'utilitza el sistema Lightcycler® (*Roche Molecular Biochemicals*) i el SYBR Green, un fluorocrom intercalant que s'uneix amb gran afinitat però de manera inespecífica a la doble cadena de DNA a mida que es va sintetitzant. L'especificitat i sensibilitat d'aquest mètode ve determinada pels encebadors utilitzats en la reacció. El principal avantatge d'aquest sistema és que només requereix d'una parella d'encebadors que amplifiqui un determinat producte gènic de manera específica. L'aplicació de la tècnica es veu limitada per la presència en la reacció de PCR de productes amplificats de manera no específica, que contribuirien a la mesura de la fluorescència impeding una correcta quantificació de l'expressió gènica.



## Materials i Mètodes

### 4.7.3.1. Quantificació de l'expressió de CD40 humà

La tècnica de PCR semiquantitativa a temps real es va fer servir per a l'anàlisi de l'expressió endògena de CD40 humà en cèl·lules transfectades amb els siRNAs, tant cèl·lules HUVEC com CDs. Els encebadors específics per amplificar CD40 humà es van dissenyar utilitzant el programa Oligo 4.0 en base a la seqüència de cDNA de la base de dades de GenBank: NM\_001250 (CD40 humà). Per a la normalització de l'expressió gènica es va emprar com a gen de referència el gen de la ciclofilina-A (CypA). Els encebadors utilitzats per a l'amplificació d'aquests gens van ser:

- Per CD40 humà

h-CD40 FOR2 (5'-CAG CCA GGA CAG AAA CTG GTG AGT-3')

h-CD40 REV2 (5'-CTT CTT CAC AGG TGC AGA TGG TGT C-3')

els quals amplifiquen un fragment de 199 pb.

- Per ciclofilina humana

h-ciclofilina F (5'-CTC CTT TGA GCT GTT TGC AG-3')

h-ciclofilina R (5'-CAC CAC ATG CTT GCC ATC C-3')

els quals amplifiquen un fragment de 325 pb.

Les amplificacions es van realitzar per triplicat en un volum final de 20 µl contenint 3 mM MgCl<sub>2</sub> (CD40 humà) o 4 mM MgCl<sub>2</sub> (ciclofilina), 0.15 µM de cada encebador, 5% DMSO, 2 µl de *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Molecular Biochemicals), que inclou els dNTPs, la Taq DNA polimerasa i el tampó, i 1 µl (75 ng) de cDNA com a motlle.

El programa d'amplificació de la PCR va ser de 600 seg de desnaturalització inicial a 95°C, seguit de 45 cicles d'amplificació consistint en un pas a 95°C 1 seg, anellament a 56°C o 64°C (com s'indica a la Taula 16) 5 seg i extensió a 72°C 20 seg.

### 4.7.3.2. Validació de l'expressió gènica obtinguda per microarrays

Els resultats d'expressió gènica obtinguts per microarrays es van confirmar per als gens d'interès mitjançant PCR semiquantitativa a temps real. En aquest cas es va utilitzar el gen de la ciclofilina-A com a gen de referència.

Pel disseny dels encebadors o oligonucleòtids específics de cada gen es van utilitzar els programes Oligo 4.0, Oligo 6.0 i primer 3. Per determinar la formació d'estructures secundàries que podien adquirir aquestes parelles d'encebadors, es va fer servir els programes Oligo 4.0 i Oligo 6.0. Aquests encebadors van ser seleccionats evitant la possible formació de dímers d'encebadors per no afavorir una amplificació inespecífica durant la reacció de PCR.

Per a la normalització de l'expressió gènica es va emprar com a gen de referència el gen de la ciclofilina-A (CypA).

Les reaccions es van fer per triplicat i en un volum de 20  $\mu$ l que contenia 2  $\mu$ l de *Lightcycler Fast Start DNA Master SYBR Green I* (Roche Molecular Biochemicals); MgCl<sub>2</sub> (de 3 mM a 5 mM); 0.15-0.30  $\mu$ M de cada encebador; i 75 ng de cDNA com a motlle. En alguns casos s'ha utilitzat un 5% de DMSO. Les condicions d'amplificació utilitzades van ser: un pas de desnaturalització inicial (10 min, 95°C), anellament (5 seg, 55°C a 63°C), i extensió (18 seg, 72°C) amb adquisició de fluorescència al final de cada extensió. A la Taula 16 s'indiquen les seqüències dels encebadors dels gens validats i les condicions de les reaccions de PCR.

La lectura de la fluorescència o mesura de la intensitat del fluoròfor SYBR Green, es va realitzar al final de cada cicle d'amplificació. El seguiment d'aquesta fluorescència es va fer utilitzant el software d'anàlisi del Lightcycler versió 3.5 i el mètode de la segona derivada màxima (*Second Derivate Maximum Method*) tenint en compte únicament la fase exponencial d'amplificació. Aquest mètode defineix un determinat llindar de fluorescència, en el qual el senyal és major que el soroll de fons (*background*) i estableix un valor d'emissió de fluorescència basal (*Threshold*). El cicle en el qual es supera aquesta fluorescència basal s'anomena punt de creuament o *crossing point*. El *crossing point* representa el número de cicles on la intensitat de la fluorescència supera aquest llindar i depèn de la quantitat de DNA inicial present a la mostra (Figura 17).

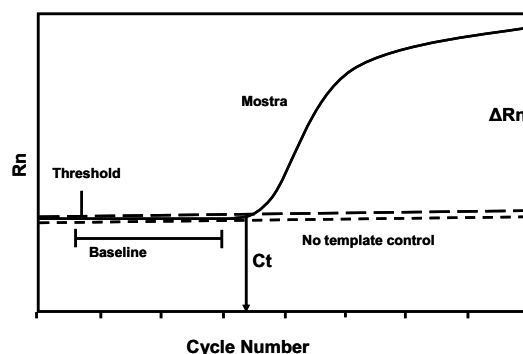


Figura 17. Gràfica d'amplificació de PCR a temps real. L'eix vertical representa la quantitat de fluorescència normalitzada, i l'eix horitzontal el nombre de cicles. La *Baseline* o línia base es refereix als cicles inicials en els quals no hi ha canvis perceptibles en la quantitat de fluorescència, i només es detecta la fluorescència basal. *Threshold* és el llindar en el qual es produeix un canvi significatiu en la fluorescència, i el tall entre el *Threshold* i la corba d'amplificació determina el Ct o cicle llindar que s'empra per a la quantificació. El càlcul del Ct sempre es realitza en la fase exponencial de la corba.

Per determinar l'especificitat de la reacció, al final de cada amplificació, es realitzava un anàlisi de la corba de fusió (*melting curve*) amb mesura constant de la fluorescència a mida

## Materials i Mètodes

que va augmentant la temperatura. Es tracta d'incrementar molt lentament la temperatura i mesurar de manera contínua la pèrdua d'emissió de la fluorescència. A mida que el producte amplificat es va desnaturalitzant i es separen les dues cadenes de DNA té lloc l'alliberament de les molècules de SYBR Green. L'objectiu d'aquest anàlisi és determinar la temperatura de fusió característica de cada fragment amplificat, el qual depèn de la seva mida i composició de bases, i descartar l'amplificació de productes de PCR no desitjats. El programa d'anàlisi de la corba de fusió utilitzat es basava en escalfar el producte a 20°C/seg fins a 95°C, refredar-lo a 20°C/seg fins a 65°C i escalfar-lo lentament a 0.2°C/seg fins a 95°C-98°C amb lectura contínua de la fluorescència.

La mida esperada del producte específic també es comprovava per electroforesi en un gel d'agarosa al 1 % no desnaturalitzat i posterior visualització per tinció amb bromur d'etidi (0.15 µg/ml).

Els nivells de mRNA de cada gen diana i el gen de referència es van determinar en paral·lel per cada mostra. Totes les quantificacions es van fer per triplicat a partir de tres experiments independents. Per tal de poder quantificar de forma relativa l'expressió d'un mRNA per PCR a temps real, les mostres a comparar han de tenir eficiències de PCR similars i la cinètica d'amplificació ha de seguir una resposta lineal dins el rang de concentracions de treball. Per això, cada gen d'interès va ser amplificat a partir de dilucions seriadades del cDNA amb factor 5 (de 0.12 a 75 ng) i es va determinar la seva eficiència d'amplificació tenint en compte la pendent de la recta obtinguda i segons l'equació:  $E=10^{(-1/pendent)}$ .

Per a la quantificació relativa, els nivells d'expressió del gen problema s'analitzen respecte el gen de referència. Dins de la fase exponencial de l'amplificació es calcula el ratio d'expressió relativa (R) del gen problema segons un model matemàtic [220, 221] en base a la diferència del valor de *crossing point* de la mostra tractada amb el siRNA-2 respecte la mostra control, tenint en compte les eficiències d'amplificació de tots dos gens.

$$\text{Ratio expressió} = \frac{E(\text{gen diana})^{\Delta\text{CP gen diana (mitjana mostra control-mitjana mostra tractada)}}}{E(\text{gen ref})^{\Delta\text{CP gen ref (mitjana mostra control-mitjana mostra tractada)}}$$

On: E (gen diana) i E (gen ref) són les eficiències de la reacció de PCR del gen diana i del gen de referència;  $\Delta\text{CP}$  és la diferència entre el valor de *crossing point* de la mostra control respecte la mostra tractada amb siRNA-2.

TAULA 16. Encebadors utilitzats per validar els gens obtinguts per l'anàlisi de microarrays per RT-PCR					
Gen	Accession Number	Seqüència encebadors	MgCl <sub>2</sub>	T <sup>a</sup> anellament	mida
<b>PRDX5</b>	NM_012094.3	F5'-AACCTACCAGAGACCTTACC-3' R5'-ATGCTTCTTTGTCATCCTCC-3'	4mM	60°C	100pb
<b>TRAF-1</b>	NM_005658.3	F5'-GGCAGTCTCAATGGGTCAG-3' R1'-CAGAAATAGGCAATCAAAAGTG-3'	3mM	56°C	470pb
<b>IRF-1</b>	NM_002198.2	F5'-TCTTATCCTCTAGGCAAGC-3' R5'-CCAGTGACAGCGAGACCC-3'	4mM	58°C	313pb
<b>SELE</b>	NM_000450	F5'-TGGGCATCTGGATACTAGC-3' R5'-AAGAAAGGGTTGACGCAGC-3'	3mM	52°C	389pb
<b>STAT-1</b>	NM_007315.3	F5'-TTGCCACCATCCGTTTTCAT-3' R5'-CTCCGCTTCCACTCCACTA-3'	4mM	55°C	571pb
<b>IFNGR1</b>	NM_000416.2	F5'-GAAAGCGTAAAGAGGATGTGT-3' R5'-CCAAGGCAGAGAAAAGAAAA-3'	3mM	55°C	198pb
<b>IFNGR2</b>	NM_005534.3	F5'-GGAAAAGGAGCAAGAAGATG-3' R5'-GAGGCAGCAAAGGGAATAC-3'	4mM	58°C	125pb
<b>KYNU</b>	NM_003937.2	F5'-CATGCCCATACGATTAACCTG-3' R5'-CATGCAAGGAACAGACCAACA-3'	3mM	62°C	151pb
<b>LAT-1</b>	NM_003486.5	F5'-GGTCTCTTCTGGGCGTCTGA-3' R5'-GCTTGTGTGGTGGGTTGTG-3'	3mM	63°C	314pb
<b>IDO</b>	NM_002164.4	F5'-GGTCATGGAGATGTCCGTAA-3' R5'-ACCAATAGAGAGACCAGGAAGAA-3'	5mM	60°C	227pb
<b>TMEM-49</b>	NM_030938.3	F5'-CAAAAGCGAAATGGGCACAC-3' R5'-TTAGCACAGAAGGAAAAAGTAT-3'	4mM	58°C	323pb
<b>C9orf5</b>	NM_001099734.1	F5'-TTCCCATCTCTTAGCACAG-3' R5'-CCCTTTTCTCTCCACATT-3'	4mM	58°C	491pb
<b>BIC-1</b>	NR_001458.2	F5'-AACCTACCAGAGACCTTACC-3' R5'-ATGCTTCTTTGTCATCCTCC-3'	4mM	60°C	296pb
<b>APLN</b>	NM_017413	F 5'-CACAAAATGAATCCCTATGCT-3' R 5'-TGGCTAAAAAGTCCTGAAAGT-3'	4mM	57°C	244pb
<b>MMP10</b>	NM_002425	F 5'-CTGGAACCCTGAACCTGAAT-3' R 5'-CTTGATAACCTGCTTGAC-3'	4mM	59°C	166pb
<b>SOD-2</b>	NM_000636	F 5'-GACAAACCTCAGCCCTAAC-3' R 5'-ACACATCAATCCCCAGCAGT-3'	4mM	58°C	248pb

Taula 16. Gens analitzats per PCR a temps real, encebadors i condicions d'amplificació. F, forward; R, reverse; PRDX5, Peroxiredoxin 5; TRAF-1, *TNF receptor-associated Factor 1*; IRF-1, *interferon regulatory factor 1*; SELE, *selectin E*; STAT-1, *signal transducer and activator of transcription 1*; IFNGR1, *interferon gamma receptor 1*; IFNGR2, *interferon gamma receptor 2*; KYNU, *kynureninase (L-kynurenine hydrolase)*; LAT-1, *solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y<sup>+</sup> system), member 5*; IDO, *indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase*; TMEM-49, *transmembrane protein 49*; C9orf5, *chromosome 9 open reading frame 5*; BIC-1, *BIC transcript (BIC), non-coding RNA*; APLN, *Apelin*; MMP10, *matrix metalloproteinase 10*; SOD-2, *superoxide dismutase 2*.

## Materials i Mètodes

### 4.7.3.3. Quantificació del marcador de maduració de les cèl·lules dendrítiques CCR7

La tècnica de PCR semiquantitativa a temps real es va fer servir per a l'anàlisi de l'expressió endògena de CCR7 humà en CDs en estat immadur, madur i tractades amb els diferents estímuls emprats al llarg de l'estudi ( $\alpha7\beta1$ ,  $\alpha7\beta0$ ,  $\text{reca6}\beta0$  i el Factor H). Els encebadors específics per amplificar CCR7 humà, les condicions d'amplificació i l'anàlisi de la corba de fusió es descriuen a la Taula 17. Per a la normalització de l'expressió gènica es va emprar com a gen de referència el gen de la ciclofilina-A (CypA).

TAULA 17. Encebadors i condicions de la reacció de RT-PCR per CCR7					
Gen	Accession Number	Seqüència encebadors	MgCl <sub>2</sub>	T <sup>a</sup> anellament	mida
CCR7	NM_001838.2	F5'-TGGGCATCTGGATACTAGC-3' R5'-AAGAAAGGGTTGACGCAGC-3'	3mM	58°C	435pb

### 4.7.3.4. Quantificació dels gens IDO/BIC-1/SOD-2 en les cèl·lules dendrítiques

La tècnica de PCR semiquantitativa a temps real es va fer servir per a l'anàlisi de l'expressió endògena de IDO, BIC-1 i SOD-2 humans en CDs en estat immadur, madur i tractades amb els diferents estímuls emprats al llarg de l'estudi ( $\alpha7\beta1$ ,  $\alpha7\beta0$ ,  $\text{reca6}\beta0$  recombinant i el Factor H). Els encebadors específics per amplificar aquests gens humans, les condicions d'amplificació i l'anàlisi de la corba de fusió es descriuen a la Taula 16. Per a la normalització de l'expressió gènica es va emprar com a gen de referència el gen de la ciclofilina-A (CypA).

## **4.8. DETERMINACIÓ DE PERFILS D'EXPRESSIÓ GÈNICA**

En els estudis d'expressió gènica, la tecnologia d'arrays de DNA permet l'anàlisi simultani de milers de gens en un únic experiment. De manera similar a altres tècniques com el Northern Blot, la RT-PCR, el *differential display* o l'anàlisi seriat d'expressió gènica (SAGE), els microarrays permeten la quantificació relativa de l'expressió gènica amb l'avantatge que es poden analitzar milers de gens a la vegada.

Els microarrays consisteixen en un suport sòlid, generalment un portaobjectes de vidre pretractat, sobre el qual han estat dipositades amb elevada precisió milers de sondes conegudes, ja siguin sondes de cDNA o oligonucleòtids. L'abundància de cada transcrit es determina hibridant aquest microarray amb mostres de RNA marcades amb un fluorocrom. La intensitat del senyal obtinguda és una mesura de l'abundància del mRNA en la mostra analitzada.

#### 4.8.1. CLASSES DE MICROARRAYS D'EXPRESSIÓ

S'han descrit diferents tipus de microarrays segons el material immobilitzat, que pot ser cDNA, mRNA, proteïna o teixit. Pel que fa a l'estudi de l'expressió gènica, existeixen dos tipus principals de microarrays que es diferencien en funció del mètode de fabricació i el tipus d'àcid nucleic immobilitzat: els microarrays de DNA i els microarrays d'oligonucleòtids.

-Els **microarrays d'oligonucleòtids** comercials es poden sintetitzar *in situ* o de manera externa. Per a la fabricació dels microarrays d'oligonucleòtids *in situ* Affymetrix utilitza la tècnica de fotolitografia, que consisteix en la síntesi *in situ* d'oligonucleòtids de 25 bases mitjançant un sistema d'emascarament litogràfic i fotodesprotecció de grups reactius. Aquesta tecnologia requereix una infraestructura molt sofisticada, permet generar fins a 100.000 *spots* per array i és utilitzada únicament per Affymetrix. En el cas dels microarrays comercials que fabrica Agilent, els oligonucleòtids tenen una grandària de 60 mer i són sintetitzats *in situ* en el porta mitjançant tecnologia ink-jet i un sistema piezoelèctric.

-Els **microarrays de DNA** es sintetitzen per impressió del DNA utilitzant un *spotter* o *arrayer*, en superfícies de vidre recobertes químicament per a permetre la unió d'aquest DNA. Aquesta unió pot ser iònica o covalent. El DNA utilitzat prové de productes amplificats per PCR a partir de genoteques o llibreries de DNA genòmic. Es tracta de fragments de DNA de doble cadena amb longitud variable, de 500 a 2500 bases, que són purificats per tal d'eliminar les sals, els encebadors i les proteïnes presents en la reacció de PCR. Cada punt de l'array es genera mitjançant la deposició de pocs nanolitres del producte purificat fent servir el robot *arrayer*, i permet generar fins a 20.000 *spots* per array.

Els microarrays de cDNA generats per deposició de productes de PCR a partir d'una llibreria de clons, presenten certes limitacions a causa per exemple de la crosshibridació entre el mRNA marcat utilitzat com a sonda i altres elements no específics del clon de cDNA, i sovint existeixen clons mal assignats dins de la llibreria de cDNA. Els microarrays d'oligonucleòtids en canvi, confereixen una elevada especificitat del senyal d'hibridació, però poden generar una baixa sensibilitat i especificitat en comparació amb els arrays de cDNA per a un gen únic, per això la majoria d'arrays utilitzen diferents seqüències d'oligonucleòtids per a un mateix gen distribuïdes al llarg de l'array.

Els experiments d'hibridació de microarrays presentats en aquest treball es van realitzar en el Laboratori de la Unitat de Microarrays del Centre de Regulació Genòmica (CRG). En aquests experiments, les cèl·lules HUVEC que havien estat electroporades amb siRNA-2 o siRNA-control (seguint el protocol descrit a l'apartat 3.5.3.1. de Materials i Mètodes), van ser

## Materials i Mètodes

activades amb la proteïna sCD40L a una concentració de 10 µg/ml o amb cèl·lules Jurkat D1.1 (mCD40L) durant 4 hores, prèviament a l'anàlisi. 48 hores posttransfecció, el cocultiu va ser rentat amb PBS i tripsinitzades i es va procedir a l'extracció del RNA total d'aquestes cèl·lules.

### **4.8.2. DISSENY DE L'EXPERIMENT DE MICROARRAYS**

El disseny típic d'un experiment de microarrays consta de diverses etapes: l'aïllament de la mostra de RNA, l'amplificació i el marcatge d'aquest RNA, la hibridació amb l'array i la detecció del senyal i posterior anàlisi de dades.

#### 1. Extracció de RNA total

Les mostres de RNA total es van extreure fent servir el kit *RNeasy RNA Isolation kit* (Qiagen) i posteriorment tractades amb *DNase I* utilitzant el reactiu DNAfree (Ambion) per eliminar les restes de DNA genòmic tal i com s'ha descrit anteriorment a l'apartat 4.7.1. de Materials i Mètodes.

#### 2. Comprovació de la qualitat del RNA

La puresa del RNA utilitzat és un factor crític en la hibridació de microarrays, particularment quan s'utilitza fluorescència, ja que les proteïnes cel·lulars, els lípids i els carbohidrats poden produir unions no específiques del DNA marcat en la superfície dels arrays. Per aquest motiu abans de procedir amb els passos següents calia comprovar la qualitat del RNA obtingut.

La concentració del RNA va ser mesurada fent servir l'espectrofotòmetre Nanodrop i la seva qualitat va ser determinada per nanoelectroforesi amb el sistema Bioanalyzer 2100 (Agilent). Tots els RNAs presentaven un RIN (*RNA integrity number*) entre 9.3 i 10 (en una escala de 1 a 10), i un ratio 28S/18S entre 1.67 i 2.07.

#### 3. Amplificació, síntesi i marcatge del cDNA

500 ng de RNA total van ser retrotranscrit, amplificat i marcat per transcripció *in vitro* fent servir el kit *Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification kit* (Agilent 5184-3523) seguint les instruccions del fabricant. Breument, per a la síntesi del cDNA a partir del RNA total s'utilitza l'enzim transcriptasa reversa MMLV-RT i un oligodT que conté el promotor de T7 RNA polimerasa. Posteriorment, té lloc una reacció de transcripció *in vitro* i síntesi de la cadena de RNA complementari (cRNA) amb la T7 RNA polimerasa al mateix temps que

s'incorporen els fluorocroms Cy5 i Cy3 conjugats a CDTP. Finalment, aquest cRNA amplificat és purificat i quantificat.

El principal problema d'aquest mètode de marcatge directe és que els fluorocroms utilitzats són compostos relativament grans, a més, Cy5 és major que Cy3 i, per tant, la seva incorporació pot ser menor. Per tal de solucionar aquest problema s'ha utilitzat un marcatge recíproc que consisteix en hibridar dos arrays per a cada condició, un marcant la mostra problema amb Cy3 i el control amb Cy5 i l'altre fent el marcatge invers.

#### 4. Hibridació dels microarrays

Es van utilitzar microarrays comercials d'Agilent 4x44K de genoma complet *Whole Human Genome Oligo Microarray* (Agilent G4112F). Es tracta de microarrays d'oligonucleòtids de 60 mer sintetitzats *in situ* mitjançant el sistema *Ink-jet*. Aquests microarrays contenien 44.290 spots, 41.000 dels quals representaven en còpia única o múltiple, un total de 37.312 transcrits humans.

Les mostres de RNA complementari (cRNA) marcat amb Cy5 o Cy3 es van hibridar a aquests microarrays d'oligonucleòtids de 44k seguint les instruccions del fabricant.

Es van realitzar tres experiments o rèpliques biològiques tant per les cèl·lules electroporades i estimulades amb sCD40L com per les estimulades amb les Jurkat D1.1 (mCD40L). En cadascun d'aquests experiments es comparaven cèl·lules HUVEC transfectades amb siRNA-2 i les mateixes cèl·lules tractades amb el msiRNA-2. Cada parella experimental de mostres marcades va ser cohibridada per separat en dos microarrays amb intercanvi de fluorocroms (*dye swapping*) per tal de corregir l'efecte explicat anteriorment d'incorporació preferencial d'un dels fluorocroms (*dye bias*). Es van fer 12 hibridacions per cada tipus d'experiment, generant un total de 24 conjunts de dades de microarrays.

#### 5. Anàlisi de les imatges i extracció de les dades

Les imatges dels dos canals de fluorescència, Cy5 i Cy3, van ser captades amb l'escàner Agilent G2565BA i quantificades utilitzant el software GenePix 6.0 (Axon, Molecular Devices) emprant l'opció de trobar elements irregulars.

#### 6. Normalització

Les dades crues extretes van ser filtrades i normalitzades utilitzant MMarge (Lozano et al, unpublished), i un servidor web local que implementa el paquet Limma desenvolupat dins del projecte Bioconductor en l'entorn de programació estadística R [222]. La intensitat dels dos



## Materials i Mètodes

canals es va compensar utilitzant normalització per regressió robusta (mètode *lowess*) emprant 0.3 com a paràmetre de cobertura amb pesos reduïts per a elements control o de baixa qualitat. Es va fer un escalat entre els diferents xips per poder comparar les dades entre si.

### 7. Processament de les dades

Es va calcular un estadístic empíric Bayesià, B, tenint en compte l'intercanvi de fluorocroms, i les sondes es van ordenar segons el valor de B, encara que a causa del baix nombre de rèpliques no es va considerar el valor B sinó el rang de B com a valor indicatiu de significació.

Els gens diferencialment expressats es van escollir fent servir com a criteri de tall (*cut off*) un percentil de rang de B superior al 95% i una taxa de canvi (FC, *Fold Change*) absoluta per damunt o igual a 1.2. Les taules de dades van ser visualitzades emprant AFM 4.0 *Array File Marker*, una aplicació d'Excel.

### 8. Anàlisi o interpretació de les dades de microarrays

#### 4.8.3. CLUSTERING

Possiblement l'eina informàtica més utilitzada en l'anàlisi de dades de microarrays són els mètodes d'agrupament o *clustering*, que s'utilitzen per trobar gens amb un mateix patró d'expressió o per agrupar condicions experimentals. És d'esperar que gens que comparteixen una mateixa funció biològica es comportaran de la mateixa manera. Per a trobar aquestes relacions entre gens, cal saber quan es pot considerar que dos gens es comporten igual, definint una distància entre patrons. Existeixen dos tipus de funcions de distància: la distància euclídea i la correlació lineal. La primera es basa en diferències absolutes, mentre que la segona es fixa en tendències. En funció de la distància utilitzada per agrupar els diferents patrons d'expressió s'obtenen uns grups o uns altres, és a dir, la distància utilitzada defineix la relació que es busca entre els gens.

Els mètodes de *clustering* es divideixen en supervisats i no supervisats, en funció de si s'utilitza o no informació externa per a determinar els grups que tenen patrons similars d'expressió gènica. Els mètodes més utilitzats són els no supervisats que, en funció de com agrupen les dades, es poden dividir en mètodes jeràrquics o no jeràrquics, segons generin o no una classificació amb informació de possibles relacions jeràrquiques entre les dades.

L'objectiu de l'anàlisi de les dades o de les anàlisis de *clustering*, és l'obtenció d'informació sobre característiques biològiques comunes en un grup de gens d'interès. Existeixen diversos programes que faciliten aquest anàlisi, la majoria dels quals utilitzen els termes de *Gene Ontology*.

*Gene Ontology* (GO) és un projecte col·laboratiu que té com a objectiu generar un vocabulari comú i dinàmic per a les descripcions del productes gènics en les diferents bases de dades. Els tres principis organitzatius del terme GO són la funció molecular, el procés biològic i el component cel·lular. Un producte gènic pot tenir més d'una funció molecular, pot ser utilitzada en un o més processos biològics, i podria estar associat amb més d'un component cel·lular. Dins de cada categoria de GO específica existeixen fins a 9 nivells descriptius.

#### **4.8.4. ANOTACIÓ FUNCIONAL**

Per analitzar grups de gens amb una funció biològica o mecanisme de regulació comú, es va utilitzar l'aplicació GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) en versió java, utilitzant el paquet p-GSEA, un software desenvolupat per *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) [223]. L'aplicació GSEA analitza grups de gens i calcula un *Enrichment Score* (ES) que indica el grau amb què un determinat grup de gens està sobrerrepresentat a la nostra llista total de gens. Al mateix temps, fa una estimació del nivell de significància d'aquest ES donant un p-valor ajustat per múltiples tests (*Multiple Hypothesis Testing*). Aquesta aplicació desenvolupada per el MIT utilitza una col·lecció de bases de dades que ells mateixos han generat anomenada MSigDB 1.0 (*Molecular Signature Database*) que conté 4 categories o bases de dades de gens (C1, C2, C3 i C4) que representen un total de 1325 grups de gens. Per a aquest estudi hem utilitzat la base de dades funcional C2 que inclou un total de 522 grups de gens: 472 dels quals corresponen a productes implicats en una determinada via metabòlica o via de senyalització i 50 són grups de gens regulats en resposta a determinada pertorbació genètica o química.

#### **4.9. ANÀLISI ESTADÍSTIC**

Fixat un marcador, s'ha realitzat el test t de comparació de mitjanes per mostres independents per comparar cada grup amb el grup de referència. Aquest test té en compte les diferències en magnituds, i per tant pot proporcionar resultats significatius quan aquestes diferències siguin prou importants. S'han considerat com a significatius p-valors menors que 0.05.



## **5. RESULTATS**



## 5.1. CÈL·LULES ENDOTELIALS HUVEC

### 5.1.1. ESTIMULACIÓ D'HUVEC AMB CÈL·LULES JURKAT D1.1 O PROTEÏNA sCD40L

Amb la finalitat d'establir el paper de CD40 en l'activació de cèl·lules endotelials en processos immunoinflamatoris, es va inhibir específicament aquesta via de senyalització amb siRNA-2 i es va utilitzar la tecnologia de microarrays per determinar els perfils d'expressió gènica o grups de gens dependents de CD40 en cèl·lules endotelials HUVEC.

Per realitzar aquest estudi es va utilitzar el mètode d'electroporació com a sistema de transfecció a les condicions d'escrites en l'apartat 4.5.3.1. de Materials i Mètodes.

Utilitzant aquest sistema, les HUVEC van ser transfectades en paral·lel amb siRNA-2 anti-CD40 o el siRNA control *mismatched* (msiRNA-2) que havien estat dissenyats prèviament en el nostre laboratori [202], i després van ser activades via CD40L mitjançant el cocultiu d'aquestes cèl·lules amb Jurkat D1.1 (un clon de Jurkat que sobreexpressa el lligand CD40L), a una relació cèl·lula T/cèl·lula endotelial de 10:1 (T/EC), o bé afegint el lligand soluble CD40L (sCD40L), a la concentració de 10 µg/ml, durant 4 hores d'estimulació prèviament a la recollida dels RNAs.

A les 48 hores post-transducció, es van recollir les cèl·lules transduïdes i es va procedir a l'extracció de RNA total, el qual es va quantificar mitjançant el Nanodrop® i es va sintetitzar el cDNA a partir de 1.5 µg de RNA total (descriu en l'apartat 4.7.1 de Materials i Mètodes) (Figura 18)

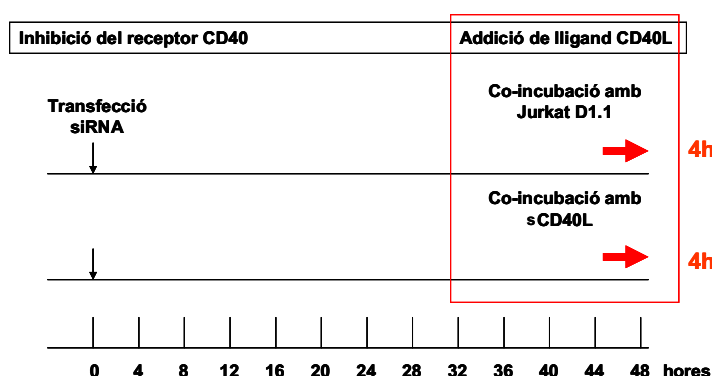


Figura 18. Protocol del tractament de les cèl·lules: els RNAs es van extreure a les 48 hores posttransfecció, prèviament les cèl·lules havien estat estimulades mitjançant cocultiu amb Jurkat D1.1 o bé el lligand sCD40L durant 4 hores.

Posteriorment es va procedir a la quantificació relativa dels trànscripats de CD40 humà mitjançant PCR a temps real utilitzant el fluoròfor SyBR Green I i el LightCycler®.

## Resultats

Per a la quantificació relativa, els nivells d'expressió del gen problema es van analitzar respecte el gen de referència. Dins de la fase exponencial de l'amplificació es calcula l'expressió relativa (R) del gen problema en base a la diferència de *crossing point* de la mostra respecte el control i l'eficiència d'amplificació de tots dos gens (segons el model matemàtic descrit en l'apartat 4.7.3.2 de Materials i mètodes).

Per confirmar la precisió i reproductibilitat de la PCR a temps real, es van realitzar tres rèpliques de la PCR per a cada concentració de cDNA, corresponent a cada condició de cèl·lules HUVEC transfectades amb els siRNAs, i es va determinar la variació de *crossing point* entre elles.

Totes les rèpliques van amplificar un producte únic. Per confirmar l'especificitat d'aquests productes, al final de cada reacció de RT-PCR en el LightCycler®, es realitza un anàlisi de la corba de fusió, la qual cosa permet determinar la Temperatura de Fusió ( $T_m$ ) específica del fragment amplificat, que depèn de la mida i de la composició de G/C.

L'anàlisi de la corba de fusió va demostrar que per cada parella de rèpliques s'amplificava un únic producte gènic amb la  $T_m$  específica: CD40 humà 85°C i una mida de 199 pb i ciclofilina humana 82°C i una mida de 325 pb.

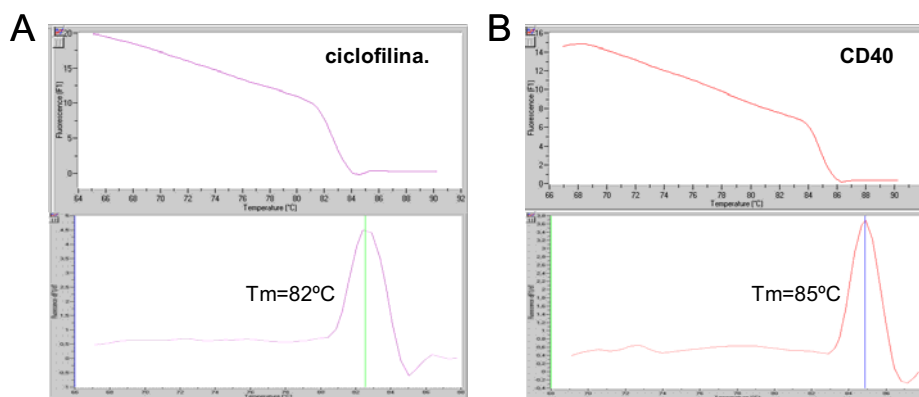


Figura 19. Representació gràfica de l'anàlisi de la corba de fusió de la ciclofilina (A) i CD40 (B) humans. L'anàlisi de la corba de fusió de la reacció d'amplificació del gen mostra una gradual reducció en la fluorescència a mida que la temperatura augmenta. La ràpida caiguda a 82°C (ciclofilina) o 85°C (CD40) indica la presència d'un producte específic en aquesta temperatura. La  $T_m$  d'aquest producte pot ser visualitzada més clarament com a un pic en l'altre gràfica.

La variació de *crossing point* entre les rèpliques de la mateixa mostra era mínima i, per tant, la reproductibilitat de la tècnica es considera bona.

Les eficiències de la PCR tant pel CD40 com per la ciclofilina són  $E_{CD40}=2$  i  $E_{ciclofilina}=1,96$  i havien estat calculades en estudis anteriors a partir de dil·lucions seriades de CD40 de

l'amplificació dels gens corresponents al CD40 i a la ciclofilina humans segons l'equació  $E=10^{-1/\text{pendent}}$ .

En cap cas, no es va produir la formació de dímers entre els encebadors al llarg dels 35-40 cicles d'amplificació de la PCR.

Les dades obtingudes es van normalitzar respecte l'expressió de la ciclofilina (gen de referència), calculant el ratio d'expressió del gen CD40/Ciclofilina. En aquesta anàlisi semiquantitativa, l'expressió del gen diana de cada mostra tractada s'expressa com a un valor relatiu a la mostra control no tractada. Variacions causades per possibles errors de pipeteig van ser corregides realitzant tres rèpliques de cada PCR per a cadascuna de les mostres.

En la següent gràfica es mostra els ratios CD40/Ciclofilina corresponents a la inhibició de l'expressió de CD40 per siRNA-2 antiCD40 en comparació amb el msiRNA-2 control en les cèl·lules HUVEC que han estat estimulades via CD40-CD40L mitjançant cocultiu amb cèl·lules Jurkat D1.1 (mCD40L) o amb sCD40L. En ambdós casos s'observa una disminució de l'expressió de CD40L del voltant al 70%.

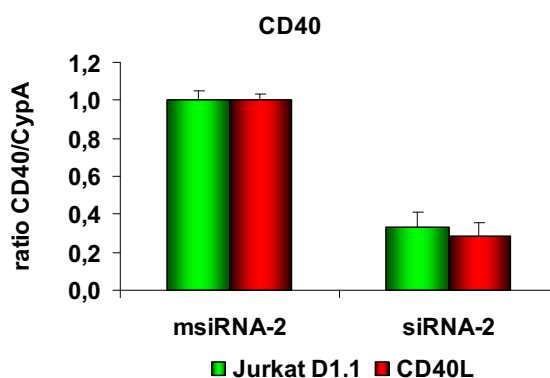


Figura 20. Quantificació de la inhibició de l'expressió de CD40 per RT-PCR a temps real amb el LightCycler® en cèl·lules HUVEC tractades amb el siRNA-2 anti-CD40 o el msiRNA-2 i incubant les cèl·lules amb Jurkat D1.1 (barres de color verd) o sCD40L (CD40L, barres de color vermell) en valors del ratio d'expressió relativa CD40/CypA. Els resultats es mostren amb la mitjana de l'expressió  $\pm$  desviació estàndard (SD) de 3 experiments independents.

### 5.1.2. DETERMINACIÓ DE PERFILS D'EXPRESSIÓ GÈNICA

En el procés inflamatori, l'activació endotelial via interacció CD40-CD40L induueix l'expressió en la superfície cel·lular de diferents molècules d'adhesió que finalment causen l'extravesació dels leucòcits al lloc d'inflamació. Inicialment, es quantificava per qRT-PCR l'expressió de CD40 i de la molècula d'adhesió E-selectina per tal de determinar si aquest siRNA-2 era capaç d'interferir en l'activació de la via CD40-CD40L en cèl·lules HUVEC.



## Resultats

Segons els resultats obtinguts, les cèl·lules tractades amb el siRNA-2 estimulades via CD40L, amb les cèl·lules Jurkat D1.1 (mCD40L) o bé amb sCD40L, presentaven una reducció significativa de l'expressió de la molècula d'adhesió E-selectina del 90%.

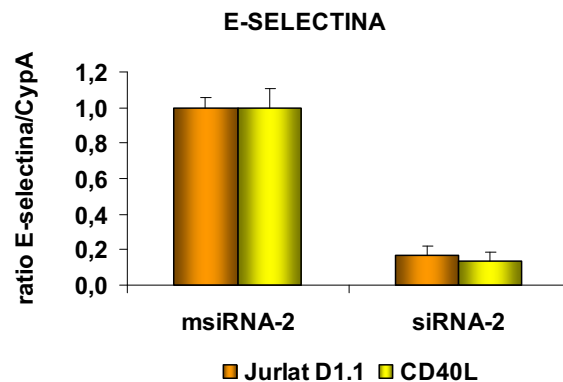


Figura 21. Quantificació de la inhibició de l'expressió d'E-selectina per RT-PCR a temps real amb el LightCycler® en cèl·lules HUVEC tractades amb siRNA-2 anti-CD40 o msiRNA-2 i incubant les cèl·lules amb Jurkat D1.1 (barres de color taronja) o sCD40L (CD40L, barres de color groc) en valors del ratio d'expressió relativa CD40/CypA. Es va fer pool de 3 experiments. Els resultats es mostren con la mitja de l'expressió  $\pm$  desviació estàndard (SD) de 3 triplicats interns a partir del *pool*.

### 5.1.3. CLASSES DE MICROARRAYS D'EXPRESSIÓ

Una vegada confirmat el silenciament gènic tant del receptor, com de la molècula d'adhesió E-selectina, conseqüència de la inhibició de la via de transducció de senyals de CD40 per RNAi, aquests RNAs van ser amplificats i marcats. Per cada condició les mostres amb i sense inhibició de CD40 es van marcar respectivament amb dos fluorocroms diferents Cy5 i Cy3. Posteriorment aquestes mostres van ser cohibridades per duplicat, amb intercanvi de fluorocroms, en un array de genoma complet. Es van realitzar tres experiments independents per cada tipus d'estimulació (Jurkat D1.1 i sCD40L), així doncs per cada condició experimental es van hibridar 12 microarrays, la qual cosa fa un total de 24 xips.

Els microarrays utilitzats en aquest estudi van ser microarrays comercials d'oligonucleòtids d'Agilent de 44.000 elements que representaven un total de 37.312 transcrits o ESTs representats per 41.000 sondes. Les característiques de l'array així com els protocols de marcatge, hibridació i normalització es detallen en l'apartat 4.8.2. de Materials i Mètodes. A continuació es mostra un esquema del protocol de l'experiment de microarrays.

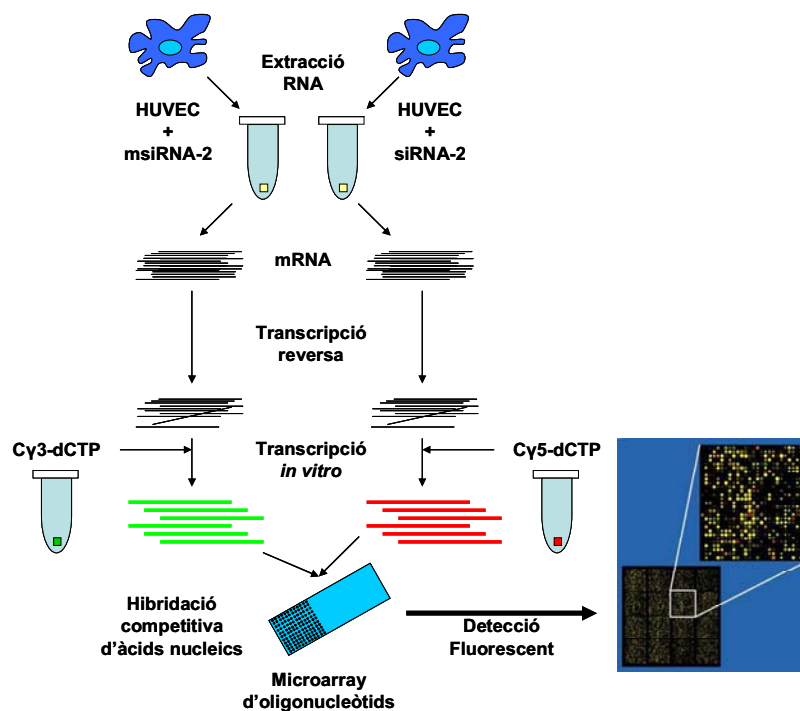


Figura 22. Disseny de l'experiment de microarrays en cèl·lules HUVEC. Els RNAs obtinguts es van amplificar i amb cadascun d'ells es van hibridar 2 microarrays, un marcant la mostra problema amb Cy3 i la control amb Cy5, i l'altre de manera inversa.

Els paràmetres utilitzats en l'anàlisi van ser la taxa de canvi (*fold change*, FC) i el q-value (SAM, *Significance Analysis of Microarrays*) [224]. FC és un indicador de l'expressió diferencial entre les intensitats dels dos canals (relació tractat/control) amb correcció de l'escala per als valors negatius (FC > 1 inducció; FC =  $\pm 1$  sense canvis; FC < -1 repressió). L'estadístic q-value està basat en el concepte de *false discovery rate* (FDR; la proporció esperada de falsos positius d'entre totes les hipòtesis significatives) i es considerat l'anàleg del p-value. En el nostre cas es pot assumir com la mitjana del nombre de gens que s'han indicat com significativament regulats però que realment no ho estan, dividit per el nombre de gens significativament regulats.

L'anàlisi global de les dades indicava que, en silenciar específicament el receptor de CD40 mitjançant RNAi en cèl·lules endotelials estimulades via CD40L durant 4 hores, hi havia un baix nivell de regulació gènica. Utilitzant com a punt de tall un valor absolut de FC  $\geq 1.2$  i un q value 5% (SAM), es van identificar 478 transcrits diferencialment regulats per sCD40L, 1.3% de la totalitat de gens del xip. Aquest percentatge de regulació representa el 2.0% respecte al transcriptoma de les HUVEC. Aproximadament 3/4 d'aquests transcrits estarien sobreexpressats (349 gens), mentre que 1/4 veurien disminuïda la seva expressió (129 gens). Per altra banda, en condicions anàlogues mCD40L va ser capaç d'induir 623 transcrits, el 1.7%

## Resultats

de la totalitat de gens del xip. Aquest percentatge de regulació representa el 2.5% respecte al transcriptoma de les HUVEC. Aproximadament 10/11 d'aquests transcrits estarien sobreexpressats (573 gens), mentre que 1/11 veurien disminuïda la seva expressió (50 gens). Aquestes dades confirmen el paper de CD40 com a “activador” cel·lular, encara que estableix diferències entre les dues isoformes de CD40L en quant al grau d'activació endotelial que s'assoleix a les 4 hores d'estimulació, essent mCD40L un activador més potent que sCD40L. Finalment, es van trobar 238 gens coregulats (206 gens sobreexpressats i 32 gens reprimits), i 114 gens diferencialment regulats (111 gens sobreexpressats i tan sols 3 gens reprimits) entre mCD40L i sCD40L. Aquests resultats es mostren en el següent diagrama de Venn (Figura 23).

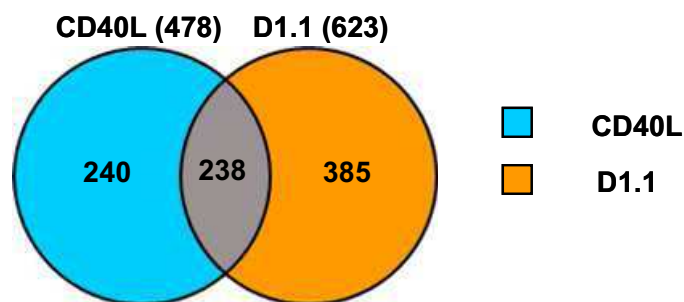


Figura 23. Diagrama de Venn mostrant la regulació gènica diferencial dels transcrits induïts a les 4 hores via CD40 per les dues isoformes de CD40L (sCD40L i mCD40L) en cèl·lules HUVEC, amb un criteri de tall de  $FC \geq 1.2$  i q-val 5% (SAM).

A les Taules 18 i 19 es mostra una relació dels gens més fortament regulats, tant induïts com reprimits, en resposta a la inhibició de CD40 per RNAi a les 4 hores d'estimulació de les cèl·lules HUVEC amb sCD40L i amb mCD40L (Jurkat D1.1), respectivament. Entre els gens més significativament regulats per CD40 en ambdós casos es troben les molècules d'adhesió (E-selectina, ICAM1, VCAM1); gens implicats en apoptosi (BIRC3 i CASP1), citocines i quimioquines proinflamàtores (CXCL2, CXCL3, CCL2, IL-8) i inhibidors del factor de transcripció NFKBIA (NFKBIA). Resulta força interessant el fet que, en ambdós casos, trobem el receptor CD40 entre els 40 gens més fortament reprimits en tractar les HUVEC amb el siRNA-2 anti-CD40, la qual cosa confirma la validesa dels nostres assaigs. Per altra banda, un dels gens que es troba més reprimit per ambdós tipus d'estímuls, sCD40L i mCD40L, és PRDX5, un enzim antioxidant y protector de l'estrès oxidatiu, de la família de les peroxiredoxines. Finalment, de la llista de gens més diferencialment regulats entre sCD40L i mCD40L (Taula 20) cal mencionar el més induït, la quimioquina CX3CL1 (fractalquina) sobreexpressat per mCD40L però no per sCD40L, que participa en la quimiotaxi i en l'adhesió

de cèl·lules inflamatòries mitjançant el seu receptor CX3CR1, i el més reprimit per mCD40L però no per sCD40L, APLN (apelina), un pèptid vasoactiu que regula l'homeòstasi de fluids, la funció cardiovascular i la secreció d'insulina, i que ja va ser identificat i caracteritzat prèviament per el nostre grup [197] (vegis article annex).

Tot i que alguns d'aquests gens ja havien estat descrits com a dianes de CD40, s'han identificat també altres gens que prèviament no havien estat relacionats amb la via de senyalització de CD40 en cèl·lules endotelials. Aquest patró global d'expressió confirma el paper clau de CD40 i de l'activació de les cèl·lules endotelials en l'inici i progressió dels processos immunoinflamatoris, i estableix que les diferències d'activació de les cèl·lules endotelials via CD40 entre mCD40L i sCD40L son més bé quantitatives que qualitatives.

Posteriorment, es va realitzar una anàlisi d'ontologia gènica (GO) per tal de determinar quines funcions biològiques estaven significativament sobreexpressades en el grup de gens regulats, és a dir, es trobaven presents amb major freqüència en el llistat de gens regulats respecte la resta de gens del xip. En el moment de realitzar aquesta anàlisi, dels 478 transcrits regulats per sCD40L, 368 gens tenien anotació a la base de dades de GO i per tant representaven una funció coneguda. Pel que fa als 623 transcrits induïts per mCD40L, 474 tenien anotació a GO. Segons els resultats d'aquesta anàlisi, la major part dels gens regulats codificaven per molècules amb funcions en resposta a estrès, resposta immune, processos inflamatoris i quimiotaxi. De tota manera es van observar alguns processos biològics o funcions moleculars que semblaven estar predominantment regulades per mCD40L (processament d'antígens, resposta a virus i bacteris), mentre que d'altres estarien majoritàriament regulats per sCD40L (unió a heparina, hemostàsia, regulació de l'adhesió cel·lular, angiogènesi).

Quan l'anàlisi de GO es va realitzar amb els 114 transcrits diferencialment regulats entre ambdós estímuls, sCD40L i mCD40L, només 84 gens estaven inclosos a la base de dades del GO. En la Taula 21 es mostra la distribució d'aquests gens diferencialment regulats dins les diferents categories de GO sobrerrepresentades de manera significativa amb p-valor < 0.05. Cal remarcar un procés biològic diferencialment regulat entre mCD40L i sCD40L que es dedueix d'aquest anàlisi: el catabolisme del triptòfan, en el que els dos enzims regulats: IDO (*Indoleamine 2,3-Dioxygenase*) i KYNU (kinureninasa), tenen capacitat immunosupressora sobre les cèl·lules immunes.

## Resultats

Name	Gene Name	Description	avg FC sCD40L	SAM t class q_1
NM 001611	ACP5	Homo sapiens acid phosphatase 5, tartrate resistant (ACP5)	1,87	0,00
NM 021968	HISTH4J	Homo sapiens histons 1, H4j (HIST1H4J)	1,48	0,00
NM 012094	PRDX5	Homo sapiens peroxiredoxin 5 (PRDX5), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1	1,46	0,00
NM 003541	HISTH4K	Homo sapiens histons 1, H4k (HIST1H4K)	1,46	0,00
NM 002814	PSMD10	Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10 (PSMD10), transcript variant 1	1,44	0,00
NM 002770	PRSS2	Homo sapiens protease, serina, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant 1	1,44	0,00
NM 033520	C19orf33	Homo sapiens chromosome 19 open reading frame 33 (C19orf33)	1,43	0,00
A 23 P111766	A 23 P111766	unknown	1,43	0,00
NM 015635	GAPVD1	Homo sapiens GTPase activation protein and VPS9 domains 1 (GAPVD1)	1,43	0,32
NM 021992	TMSL8	Homo sapiens thymosin-like 8 (TMSL8)	1,42	0,00
NM 002771	PRSS3	Homo sapiens protease, serina, 3 (mesotrypsin) (PRSS3)	1,41	0,00
NM 032552	DAB2IP	Homo sapiens DAB2 interacting protein (DAB2IP), transcript variant 1	1,41	0,00
THC2294587	THC2294587	PSDA HUMAN (O75832) 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10 (26S proteasome regulatory subunit p28) (Gankyrin), partial (60%)	1,40	0,00
NM 178516	LOC283849	Homo sapiens hypothetical protein LOC283849 (LOC283849)	1,39	0,00
NM 004677	GMFG	Homo sapiens glia maturation factor, gamma (GMFG)	1,39	0,00
NM 016445	PLEK2	Homo sapiens plekstrin 2 (PLEK2)	1,38	0,00
NM 032717	LPAAT-THETA	Homo sapiens lysophosphatidic acid acyltransferase theta (LPAAT-THETA)	1,38	0,32
NM 002276	KRT19	Homo sapiens keratin 19(KRT19)	1,36	0,32
NM 015444	TMEM158	Homo sapiens transmembrane protein 158 [TMEM158]	1,36	0,00
BC046362	TMEM37	Homo sapiens transmembrane protein 37 [TMEM37]	1,35	0,00
CR625942	CR625942	full-length cDNA clone CSODL007Y118 of B cells (Ramos cell line) Cot 25-normalized of Homo sapiens (human)	1,35	0,00
NM 000584	IL8	Homo sapiens Interleukin 8 (IL8)	-1,94	0,00
NM 024119	LGP2	Homo sapiens likely ortholog of mouse D111gp2 (LGP2)	1,95	0,00
NM 032012	C9orf5	Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 5 (C9orf5)	-1,95	0,00
THC2371963	THC2371963	AIP1 HUMAN (Q86UL8) Atrophin-1 interacting protein 1 (Atrophin-1 interacting protein A) (Membrane associated guanylate kinase inverted-2) (MAGI-2), partial (3%)	-1,96	0,00
NM 002090	CXCL3	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 3 (CXCL3)	-1,98	0,00
NM 033292	CASP1	Homo sapiens caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukine 1, beta, convertase) (CASP1), transcript variant alpha	-2,05	0,00
NM 002996	CX3CL1	Homo sapiens chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (CX3CL1)	-2,08	0,00
NM 022168	IFIH1	Homo sapiens interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1)	-2,11	0,00
NM 004159	PSMB8	Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional peptidase 7) (PSMB8), transcript variant 1	-2,12	0,00
NM 002089	CXCL2	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2)	-2,23	0,00
NM 006398	UBD	Homo sapiens ubiquitin D (UBD)	-2,23	0,00
NM 000201	ICAM1	Homo sapiens intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor (ICAM1)	-2,24	0,00
NM 003407	ZFP36	Homo sapiens zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse) (ZFP36)	-2,29	0,00
NM 020529	NFKBIA	Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (NFKBIA)	-2,30	0,00
THC2317110	THC2317110	unknown	-2,32	0,00
NM 001078	VCAM1	Homo sapiens vascular cell adhesion molecule 1(VCAM1), transcript variant 1	-2,35	0,00
NM 001781	CD69	Homo sapiens CD69 molecule (CD69)	-2,41	0,00
NM 001165	BIRC3	Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 3 (BIRC3), transcript variant 1	-2,63	0,00
NM 002982	CCL2	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)	-3,78	0,00
NM 000450	SELE	Homo sapiens selectin E (endothelial molecule 1) (SELE)	-2,17	0,00

Taula 18. Principals gens que estarien induïts (vermell) o reprimits (verd) transcripcionalment en silenciar CD40, en cèl·lules HUVEC estimulades amb sCD40L, amb un criteri de tall de FC  $\geq 1.2$  i q-val 5% (SAM).

Name	Gene Name	Description	avg FC D1.1	SAM 1 class q_2
NM 017413	APLN	Homo sapiens apelin, AGTL1 ligand (APLN)	1,71	0,00
NM 002814	PSMD10	Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10 (PSMD10), transcript variant 1	1,57	0,00
THC2294587	THC2294587	PSDA HUMAN (O75832) 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10 (26S proteasome regulatory subunit p28) (Gankyrin), partial (60%)	1,49	0,00
BC046362	TMEM37	Homo sapiens transmembrane protein 37 (TMEM37)	1,48	0,00
NM 021992	TMSL8	Homo sapiens thymosin-like 8 (TMSL8)	1,42	0,00
NM 002771	PRSS3	Homo sapiens protease, serina, 3 (mesotrypsin) (PRSS3)	1,38	0,27
NM 002770	PRSS2	Homo sapiens protease, serina, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant 1	1,37	0,11
NM 016445	PLEK2	Homo sapiens plekstrin 2 (PLEK2)	1,37	0,00
NM 002276	KRT19	Homo sapiens keratin 19(KRT19)	1,36	1,21
A 23 P111766	A 23 P111766	unknown	1,35	0,00
NM 002770	PRSS2	Homo sapiens protease, serina, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant 1	1,35	0,11
NM 012094	PRDX5	Homo sapiens peroxiredoxin 5 (PRDX5), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1	1,33	1,55
NM 019069	HES2	Homo sapiens hairy and enhancer of split 2 (Drosophila) (HES2)	1,33	0,00
NM 007150	ZNF185	Homo sapiens zinc finger protein 185, CLIM domain) (ZNF185)	1,32	3,24
CR625942	CR625942	full-length cDNA clone CSODL007Y118 of B cells (Ramos cell line) Cot 25-normalized of Homo sapiens (human)	1,32	1,21
ENST00000372602	ENST00000372602	Homo sapiens hypothetical protein MGC39900, mRNA (cDNA clone IMAGE:3876145), with apparent retained intron [BC019900]	1,32	0,27
NM 002444	MSN	Homo sapiens moesin (MSN)	1,31	3,98
A 24 P803809	A 24 P803809	unknown	1,31	2,36
AW901755	AW901755	AW901755 QV0-NN1020-170400-192-M2 NN1020 Homo sapiens cDNA	1,29	3,24
U88048	U88048	Human clone KISS-16 unkown product mRNA, complete cds. [U88048]	1,29	0,11
NM 033520	C19orf33	Homo sapiens chromosome 19 open reading frame 33 (C19orf33), mRNA [NM 033520]	1,29	4,79
NM 001781	CD69	Homo sapiens CD69 molecule (CD69)	-1,89	0,00
NM 005658	TRAF1	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 1, (TRAF1)	-1,91	0,00
NM 006290	TNFAIP3	Homo sapiens tumor necrosis factor, alpha induced protein 3 (TNFAIP3)	-1,92	0,00
NM 001511	CXCL1	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanome growth stimulating activity, alpha) (CXCL1)	-1,94	0,00
NM 033292	CASP1	Homo sapiens caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukine 1, beta, convertase) (CASP1), transcript variant alpha	-2,02	0,00
NM 000584	IL8	Homo sapiens Interleukin 8 (IL8)	-2,05	0,00
NM 022168	IFIH1	Homo sapiens interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1)	-2,05	0,00
NM 002341	LTB	Homo sapiens lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3), (LTB), transcript variant 1	-2,09	0,00
NM 000201	ICAM1	Homo sapiens intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor (ICAM1)	-2,11	0,00
NM 018689	KIAA1199	Homo sapiens KIAA1199 (KIAA1199)	-2,20	0,00
NM 006291	TNFAIP2	Homo sapiens tumor necrosis factor, alpha induced protein 2 (TNFAIP2)	-2,21	0,00
NM 002089	CXCL2	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2)	-2,24	0,00
NM 001165	BIRC3	Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 3 (BIRC3), transcript variant 1]	-2,34	0,00
THC2371963	THC2371963	AIP1 HUMAN (Q86UL8) Atrophia-1 interacting protein 1 (Atrophia-1 interacting protein A) (Membrane associated guanylate kinase inverted-2) (MAGI-2), partial (3%)	-2,42	0,00
NM 002090	CXCL3	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 3 (CXCL3)	-2,57	0,00
NM 002982	CCL2	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)	-2,75	0,00
NM 006398	UBD	Homo sapiens ubiquitin D (UBD)	-3,30	0,00
NM 001078	VCAM1	Homo sapiens vascular cell adhesion molecule 1(VCAM1), transcript variant 1	-4,09	0,00
NM 000450	SELE	Homo sapiens selectin E (endothelial molecule 1) (SELE)	-4,32	0,00
NM 002996	CX3CL1	Homo sapiens chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (CX3CL1)	-5,18	0,00

Taula 19. Principals gens que estarien induïts (vermell) o reprimits (verd) transcripcionalment en silenciar CD40, en cèl·lules HUVEC estimulades amb mCD40L, amb un criteri de tall de FC  $\geq 1.2$  i q-val 5% (SAM).

## Resultats

Name	Gene Name	Description	diff	SAM 2 class qval
NM 017413	APLN	Homo sapiens apelin, AGTL1 ligand (APLN)	1,42	3,80
NM 001005845	ADAM9	Homo sapiens ADAM metallopeptidase domain 9 (meltrin gamma) (ADAM9), transcript variant 2	1,41	3,80
NM 019028	ZDHHC13	Homo sapiens zinc finger,DHHC-type containing 13 (ZDHHC13), transcript variant 1	1,40	3,80
NM 002198	IRF1	Homo sapiens interferon regulatory factor 1 (IRF1)	-1,47	0,00
AL833655	AL833655	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp567O0320 (from clone DKFZp667O0320)	-1,47	0,00
NM 006398	UBD	Homo sapiens ubiquitin D (UBD)	-1,48	0,00
NM 001565	CXCL10	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10)	-1,48	0,00
NM 003855	IL18R1	Homo sapiens interleukine 18 receptor 1 (IL18R1)	-1,48	0,00
NM 005755	EBI3	Homo sapiens Epstein-Barr virus induced gene 3 (EBI3)	-1,51	0,00
THC2279115	THC2279115	ALU8 HUMAN (P39195) Alu subfamily SX sequence contamination warning entry, partial (12%)	-1,51	0,00
NM 015714	GOS2	Homo sapiens G0/G1 switch 2 (GOS2)	-1,52	0,00
NR 001458	BIC	Homo sapiens BIC transcript (BIC) on chromosome 21	-1,63	0,00
NM 006290	TNFAIP3	Homo sapiens tumor necrosis factor, alpha induced protein 3 (TNFAIP3)	-1,55	0,00
NM 000636	SOD2	Homo sapiens superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1	-1,59	0,00
NM 196098	AQP1	Homo sapiens aquaporin 1 (Colton blood group) (AQP1)	-1,64	0,00
NM 133467	CITED	Homo sapiens Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 4 (CITED4)	-1,72	0,00
NM 001078	VCAM1	Homo sapiens vascular cell adhesion molecule 1(VCAM1), transcript variant 1	-1,74	0,00
NM 006291	TNFAIP2	Homo sapiens tumor necrosis factor, alpha induced protein 2 (TNFAIP2)	-1,75	0,00
NM 002164	INDO	Homo sapiens indoleamin-pyrrole 2,3 dioxygenase (INDO)	-1,79	0,00
NM 018689	KIAA1199	Homo sapiens KIAA1199 (KIAA1199)	-1,84	0,00
NM 002341	LTB	Homo sapiens lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3), (LTB), transcript variant 1	-1,88	0,00
NM 001611	ACP5	Homo sapiens acid phosphatase 5, tartrate resistant (ACP5)	-2,25	0,00
NM 002996	CX3CL1	Homo sapiens chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (CX3CL1)	-2,56	0,00

Taula 20. Principals gens diferencialment regulats que estarien induïts (vermell) o reprimits (verd) transcripcionalment en silenciar CD40, en cèl·lules HUVEC estimulades amb mCD40L vs sCD40L, amb un criteri de tall de FC  $\geq 1.2$  i q-val 5% (SAM).

System	Gene Category	EASE score	Bonferroni
GO Biological Process	response to biotic stimulus	3.24E-11	1.47E-08
	immune response	4.85E-11	2.20E-08
	defense response	3.73E-10	1.70E-07
	response to external stimulus	9.24E-09	4.19E-06
	taxis	4.22E-05	1.92E-02
	chemotaxis	4.22E-05	1.92E-02
	response to stress	6.05E-05	2.75E-02
	response to wounding	8.81E-05	4.00E-02
	response to pest/pathogen/parasite	0.000125864	5.71E-02
	inflammatory response	0.000396645	1.08E-01
	innate immune response	0.000587528	2.67E-01
	response to chemical substance	0.001605936	7.29E-01
	cell-cell signaling	0.002276638	1.00E+00
	indolalkylamine catabolism	0.010584906	1.00E+00
	indole derivative catabolism	0.010584906	1.00E+00
	biogenic amine catabolism	0.010584906	1.00E+00
	tryptophan catabolism	0.010584906	1.00E+00
	amino acid derivative catabolism	0.015835903	1.00E+00
	cell communication	0.025515357	1.00E+00
	tryptophan metabolism	0.03142477	1.00E+00
response to abiotic stimulus	0.032110265	1.00E+00	
indolalkylamine metabolism	0.041681983	1.00E+00	
indole derivative metabolism	0.041681983	1.00E+00	
indole and derivate metabolism	0.041681983	1.00E+00	
GO Molecular Function	chemokine activity	2.63E-06	1.20E-03
	chemokine receptor binding	2.63E-06	1.20E-03
	chemoattractant activity	3.27E-06	1.48E-03
	G-protein-coupled receptor binding	3.27E-06	1.48E-03
	cytokine activity	6.20E-06	2.82E-03
	receptor binding	0.000229446	1.04E-01
	signal transducer activity	0.008395677	1.00E+00
	hematopoietin/interferon-class (D200-domain) cytokine receptor activity	0.03194871	1.00E+00
GO Cellular Component	extracellular space	0.001090518	4.95E-01
	extracellular space	0.001824827	8.28E-01

Taula 21. Categories de GO sobrerrepresentades dels transcrits diferencialment regulats entre ambdós estímuls, mCD40L i sCD40L, utilitzant com a criteri estadístic un EASE score o Bonferroni < 0.05.

#### 5.1.4. VALIDACIÓ DELS RESULTATS DE MICROARRAYS PER qRT-PCR

Per verificar els resultats dels microarrays, es va validar per qRT-PCR semiquantitativa a temps real, la inducció o inhibició de l'expressió d'un total de 15 gens a les 4 hores d'estimulació amb Jurkat D1.1 o sCD40L.



## Resultats

Entre els gens seleccionats validats a 4 hores d'estimulació es troben: el gen antioxidant SOD-2, les subunitats IFNGR1 i IFNGR2 del receptor de l'IFN- $\gamma$  humà, l'activador de la transcripció i de transducció de senyal 1 STAT-1 (*signal transduction and activator of transcription-1*), l'enzim IDO que catalitza la degradació de l'aminoàcid essencial L-triptòfan, l'enzim Kinureninasa implicat en la via de la kinurenina (KYNU), el factor de transcripció IRF-1, la metal·loproteasa MMP10, el receptor TRAF-1 (*Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1*), el pèptid bioactiu Apelin (APLN), el microRNA mir155 o BIC-1 (*BIC transcript (BIC), non-coding RNA*), el gen PRDX5, Peroxiredoxin 5, LAT-1, *solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y<sup>+</sup> system), member 5*, TMEM49, *transmembrane protein 49*; C9orf5, *chromosome 9 open reading frame 5*.

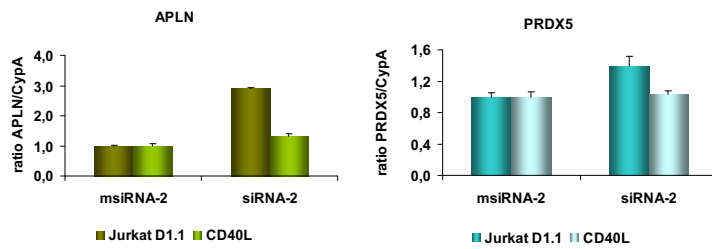
Els resultats de validació de l'expressió gènica per qRT-PCR per aquests 15 gens eren concordants amb les dades expressades obtingudes en els experiments de microarrays. La majoria de gens estarien significativament reprimits a 4 hores d'estimulació amb Jurkat D1.1 o CD40L en les mostres tractades amb siRNA-2 anti-CD40 en comparació amb les mostres amb el msiRNA-2, tal com indicaven els resultats dels microarrays. Entre els gens induïts en ambdós tipus de cultius es va seleccionar i quantificar la seva expressió per qRT-PCR el gen de l'APLN, i entre els gens reprimits es van escollir els enzims de la via del triptòfan, IDO i KYNU, el gen antioxidant SOD-2; C9orf5, el receptor TRAF-1, BIC-1 i el factor de transcripció IRF-1.

També es va seleccionar el gen STAT-1 que es trobava induït en cocultivar les cèl·lules HUVEC amb les Jurkat D1.1, mentre que es trobar reprimat en tractar les cèl·lules amb sCD40L. Els gens que codifiquen per la subunitat IFNGR2 del receptor de IFN- $\gamma$  i la metal·loproteasa MMP10 no es trobaven afectats en el cas de tractar les cèl·lules tant amb Jurkat D1.1 com amb sCD40L.

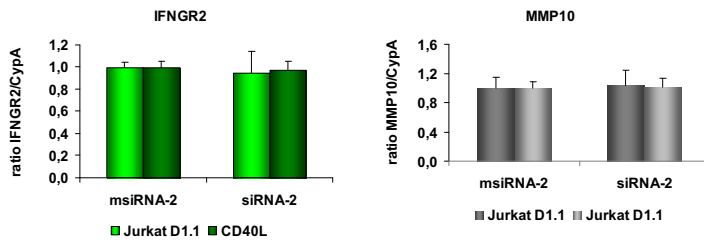
L'expressió dels gens que codifiquen per la subunitat IFNGR1 i per LAT1 es van mostrar reprimits en el cocultiu amb Jurkat D1.1, mentre que en el tractament amb sCD40L no es veien afectades les seves expressions.

Finalment, es va determinar que l'expressió de TMEM49 no estava afectada en el cocultiu amb Jurkat D1.1 però es trobava reprimida en tractar les HUVEC amb sCD40L. I el gen PRDX5 es trobava induït en el cas del tractament amb Jurkat D1.1 i no afectat en el cultiu amb sCD40L.

**Induïts**



**No afectats**



**Reprimits**

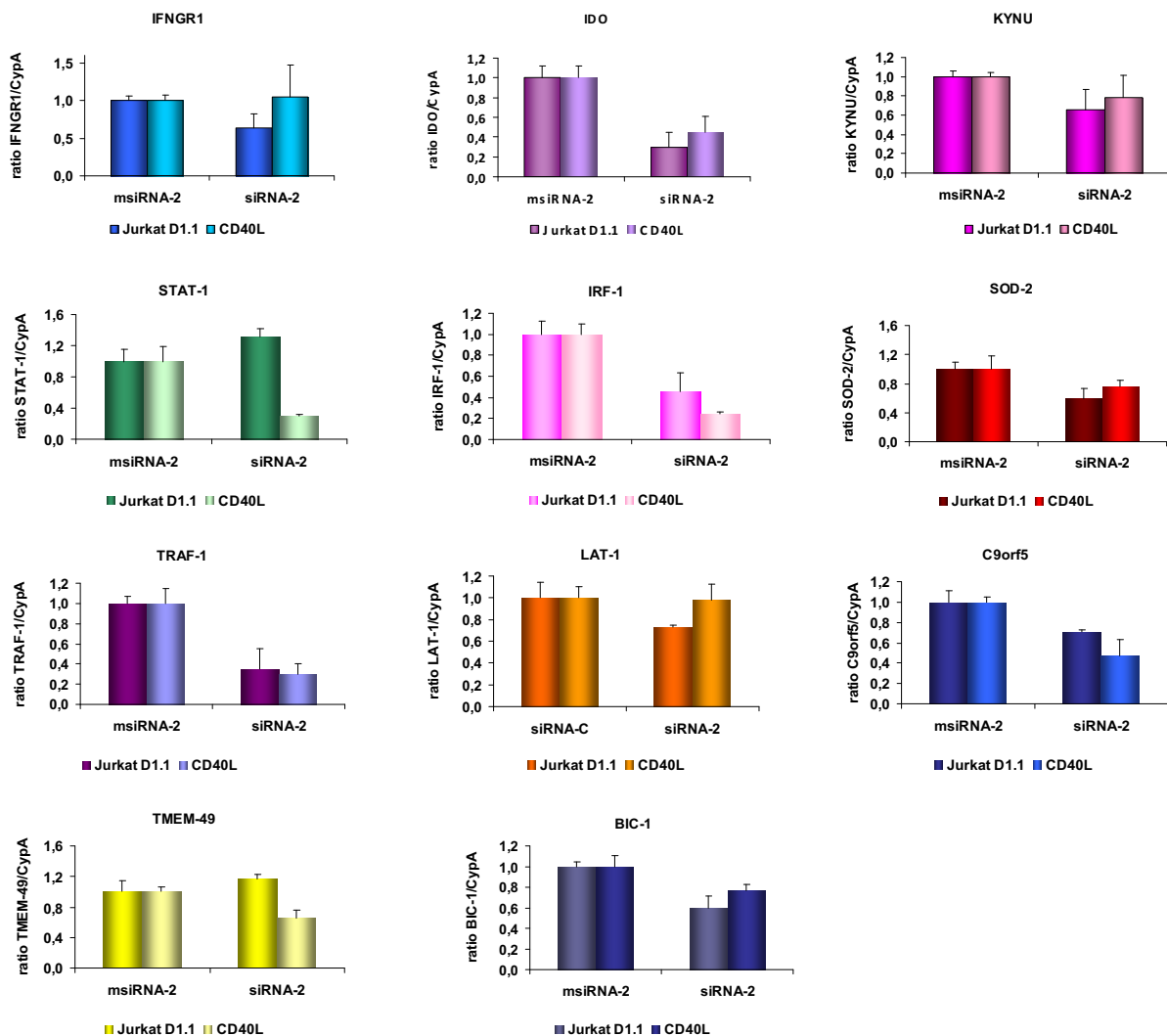


Figura 24. Anàlisi de l'expressió per qRT-PCR dels transcrits de IFNGR1, IFNGR2, IDO, KYNU, APLN, MMP10, SOD-2, STAT-1, C9orf5, TMEM-49, TRAF-1, BIC-1, LAT-1, IRF-1 i PRDX5 a 4 hores d'estimulació amb Jurkat D1.1 o CD40L (sCD40L). Els nivells d'expressió s'han normalitzat utilitzant com a gen de referència la ciclofilina (CypA). Els resultats es mostren com la mitja de l'expressió  $\pm$  SD de 3 experiments independents pels gens CD40, IFNGR2, IFNGR1, IDO i KINU. Per la resta es va fer pool de 3 experiments amb triplicats interns.

## Resultats

### 5.1.4.1. Anàlisi de les dades de Microarrays

Per analitzar grups de gens amb una funció biològica o mecanisme de regulació comú, es va utilitzar una eina estadística anomenada GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*). Es va fer servir l'aplicació GSEA en versió java, un software desenvolupat al *Massachusetts Institute of Technology* (MIT). Es tracta d'una eina útil per detectar blocs de gens funcionalment relacionats en el cas que existeixi un baix nivell de regulació o l'anàlisi de microarrays mostri pocs gens regulats de manera significativa.

L'anàlisi per GSEA és un mètode computacional que determina si, a priori, un conjunt definit de gens mostra diferències estadísticament significatives entre dos estats biològics. Utilitzant la versió en java del GSEA-p *software*, el programa fa servir una col·lecció de bases de dades que ells mateixos han generat anomenada MSigDB 1.0 (*Molecular Signature Database*) que conté 4 categories o bases de dades (C1, C2, C3 i C4) que representen un total de 1325 grups de gens. Dins d'aquesta col·lecció, nosaltres hem utilitzat principalment la base de dades anomenada C2. Aquesta base de dades a la versió 1.01 recull informació sobre 475 vies de senyalització i rutes metabòliques obtingudes a partir de 10 bases de dades públiques: BioCarta, *Signaling pathway database*, *Signaling gateway*, *Signaling transduction knowledge environment*, *Human protein reference database*, GENMAPP, *Gene Ontology*, *Sigma Aldrich pathways*, *Gene arrays*, *BioSciences corporation*, i *Human cancer genome anatomy consortium*. A més incorpora informació sobre 51 *sets* amb dades d'expressió gènica causades per perturbacions genètiques i químiques i que han estat recopilades a partir de diversos resultats experimentals recollits a la literatura.

Mitjançant aquesta anàlisi per GSEA, més sensible, es volia determinar quines altres funcions o processos biològics estarien afectats comparant el tractament amb siRNA-2 o msiRNA-2 en cadascuna de les condicions d'estimulació (mCD40L o sCD40L) durant 4 hores. Per a aquesta anàlisi es van utilitzar les dades d'expressió de la totalitat de gens del xip. Es van considerar els valors d'intensitat d'expressió en el cas de comparar tractament amb siRNA-2 respecte msiRNA-2.

L'aplicació de GSEA analitza grups de gens i calcula un *Enrichment Score* (ES) que indica el grau en què un determinat grup de gens està acumulat cap a un extrem a la llista total de gens ordenada segons els valors relatius d'expressió. Al mateix temps fa una estimació del nivell de significància d'aquest ES donant un p-valor ajustat per múltiples tests. L'*Enrichment Score* representa la posició de tots els gens d'un grup concret, dins la llista ordenada segons els valors d'expressió relativa. Quant més a l'extrem de la llista es troba un gen, més contribueix

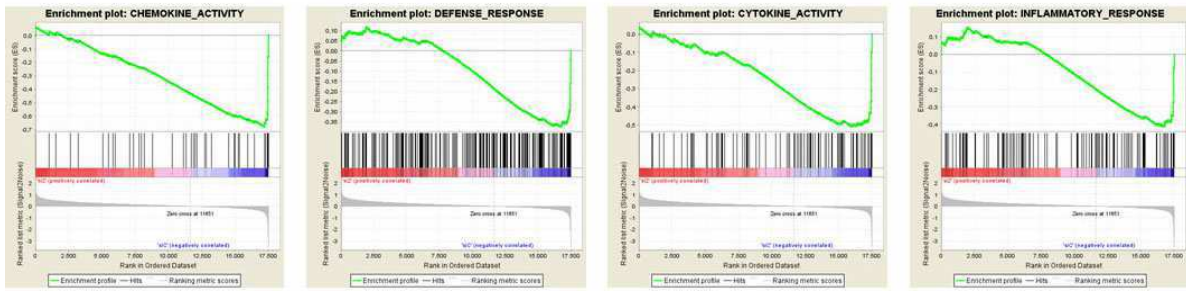
al còmput d'aquest grau d'enriquiment calculat sumant un valor cada vegada que hi ha un gen del grup analitzat, i restant un altre valor si el gen no pertany al grup. El resultat és la generació d'una corba que precedeix el màxim és el *leading edge*, que mesura el biaix del grup i el seu enriquiment en els valors extrems d'expressió relativa.

A continuació es proposa un model d'activació endotelial per CD40 segons l'anàlisi diferencial de la resposta transcripcional. Es mostra el conjunt de processos biològics que estarien més significativament regulats per CD40 en cèl·lules endotelials com a conseqüència de la seva interacció amb el mCD40L, expressat en els limfòcits T, o afegint la proteïna CD40L (sCD40L) durant 4 hores d'estimulació.

### **Regulació després de 4 hores d'estimulació de la via CD40/CD40L**

L'anàlisi per GSEA a 4 hores d'estimulació indicaria que té lloc una resposta cel·lular primerenca, tant per estimulació amb mCD40L com amb sCD40L, on hi ha una sèrie de processos biològics que es trobem induïts de forma significativa i concorden amb un fenotip "activador" de CD40. La interacció CD40-CD40L en cèl·lules endotelials activaria entre altres, vies de transducció de senyals proinflamàtores, com la via NFκB (Figura 25) per sCD40L, [197, mirar annex], implicades en el control de l'expressió de gens amb funció immune i inflamatòria. Els corresponents factors de transcripció produirien la inducció de gens amb funció immune i inflamatòria, com l'expressió d'un conjunt de citokines i quimioquines proinflamàtores que guiarien l'atracció dels diferents tipus de leucòcits al focus inflamatori (Figura 25). A més, l'activació primerenca de les cèl·lules endotelials via CD40-CD40L faria que aquestes cèl·lules adquirissin un estat de proadhesió, amb la inducció de l'expressió, a la seva superfície cel·lular, de diferents molècules d'adhesió leucocitàries (CAM) (Figura 25), entre elles ICAM-1 i E-selectina (validada per qRT-PCR), que promourien l'ancoratge i l'extravasació d'aquests al focus inflamatori (Figura 25).

# Resultats



**Chemokine activity**

**Defense response**

**Cytokine activity**

**Inflammatory response**

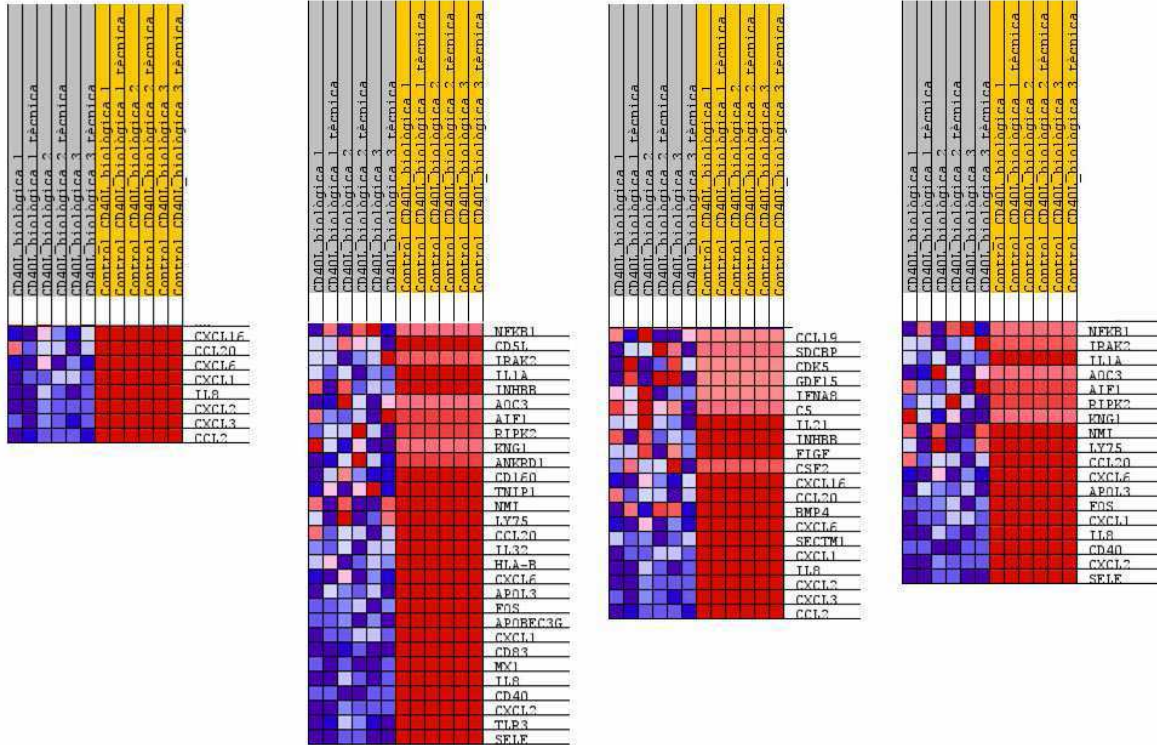
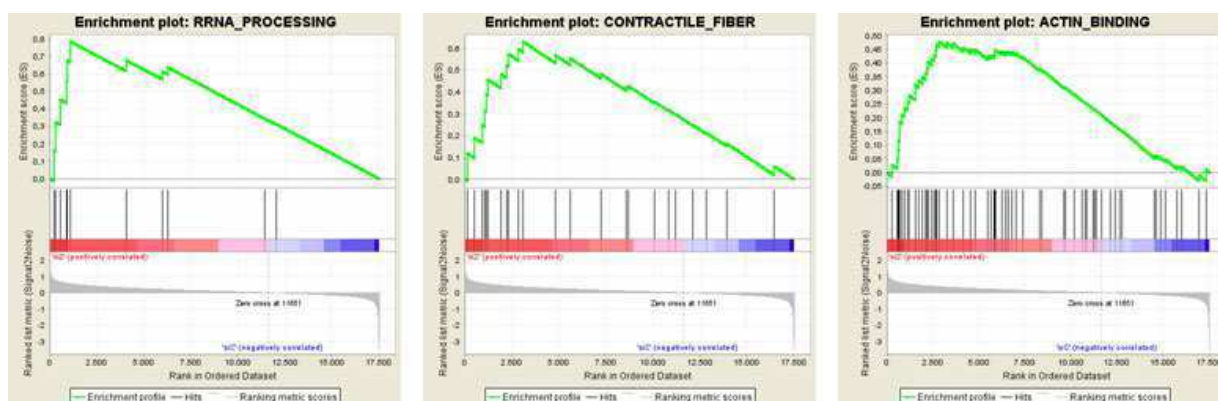
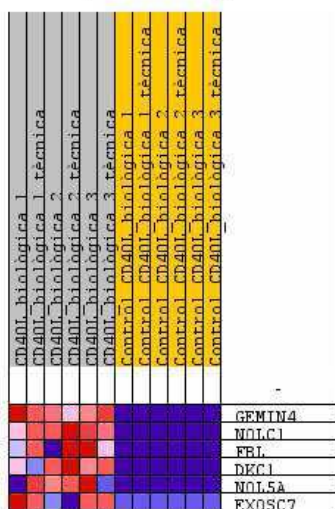


Figura 25. *Enrichment plot* d'algunes vies significativament activades a 4 hores d'estimulació amb sCD40L en el conjunt de gens regulats amb un FDR < 0.25 i *Heat map* amb els gens més regulats en cada via segons l'anàlisi de GSEA, comparant msRNA-2 amb siRNA-2 per estimulació de la via de CD40. Vermell: sobreexpressat; blau infraexpressat.

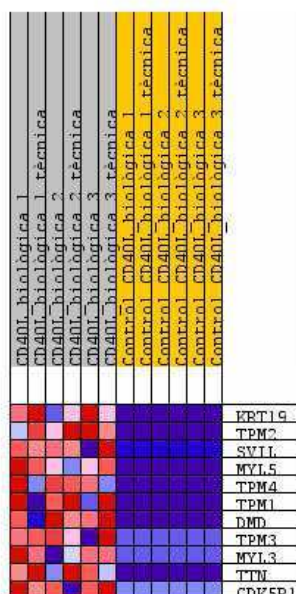
Per altra banda, com a conseqüència de la activació endotelial, aquestes cèl·lules incrementarien la seva permeabilitat per tal de permetre la diapedesi dels leucòcits adherits disminuint la expressió de vies relacionades amb contractilitat i unió a actina (Figura 26).



**RRNA processing**



**Contractile Fiber**



**Actin binding**

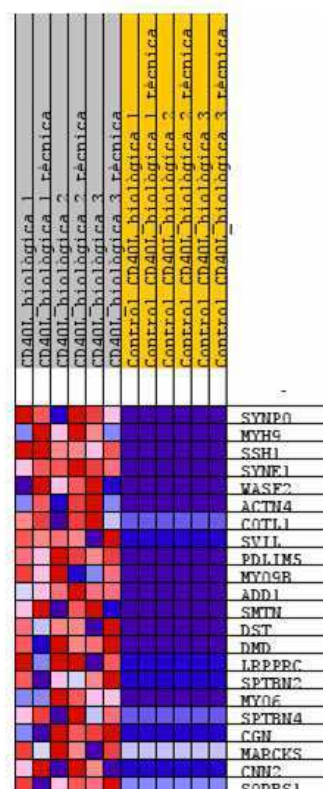


Figura 26. *Enrichment plot* d'algunes vies significativament inhibides a 4 hores d'estimulació amb sCD40L en el conjunt de gens regulats amb un FDR < 0.25 i *Heat map* amb els gens més regulats en cada via segons l'anàlisi de GSEA, comparant msiRNA-2 amb siRNA-2 per estimulació de la via de CD40. Vermell: sobreexpressat; blau infraexpressat.

Finalment, segons l'anàlisi per GSEA, les vies diferencialment induïdes en comparar els dos estímuls activadors, mCD40L i sCD40L, estarien també relacionades amb resposta immune i inflamatòria i activitat de quimioquines (Figura 27), la qual cosa reforçaria la noció de que les diferències d'activació de les cèl·lules endotelials via CD40 entre mCD40L i sCD40L són més bé quantitatives que qualitatives.



# Resultats

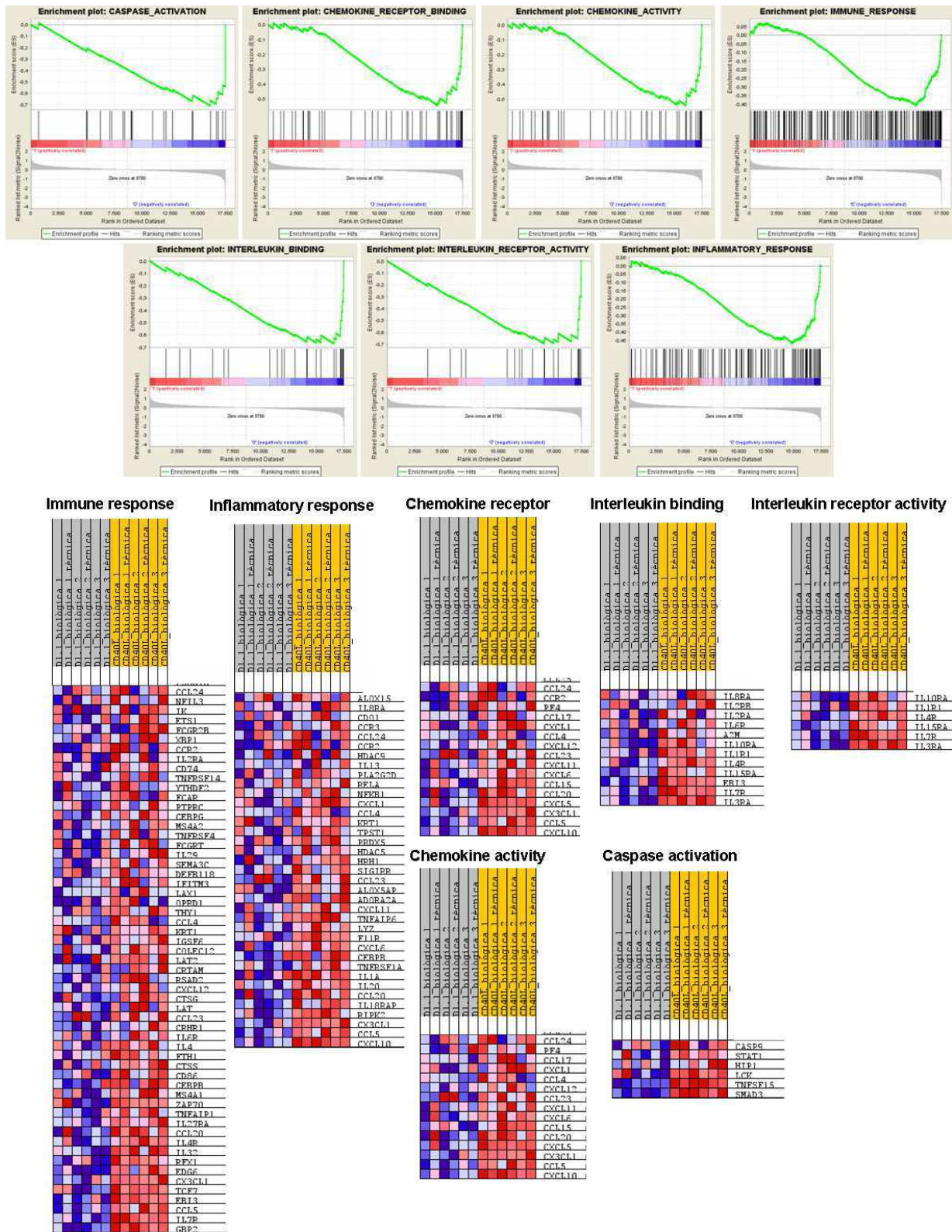


Figura 27. *Enrichment plot* d'algunes vies significativament i diferencialment activades a 4 hores d'estimulació amb mCD40L vs sCD40L en el conjunt de gens regulats amb un FDR < 0.25 i *Heat map* amb els gens més regulats en cada via segons l'anàlisi de GSEA, comparant msRNA-2 amb siRNA-2 per estimulació de la via de CD40. Vermell: sobreexpressat; blau infraexpressat.

De tota manera, si que es poden trobar alguns trets diferencials en aquest anàlisi, com el fet de la sobreexpressió de gens relacionats amb l'activació de caspases i dels receptors de interleuquina per l'estímul mCD40L però no per sCD40L (Figura 28), i també la repressió específica per mCD40L de gens relacionats amb el cycle cel·lular i de dany al DNA (Figura 28), podent-se donar un arrest de la proliferació cel·lular quan les cèl·lules endotelials s'indueixen amb cèl·lules Jurkat D1.1 (mCD40L).

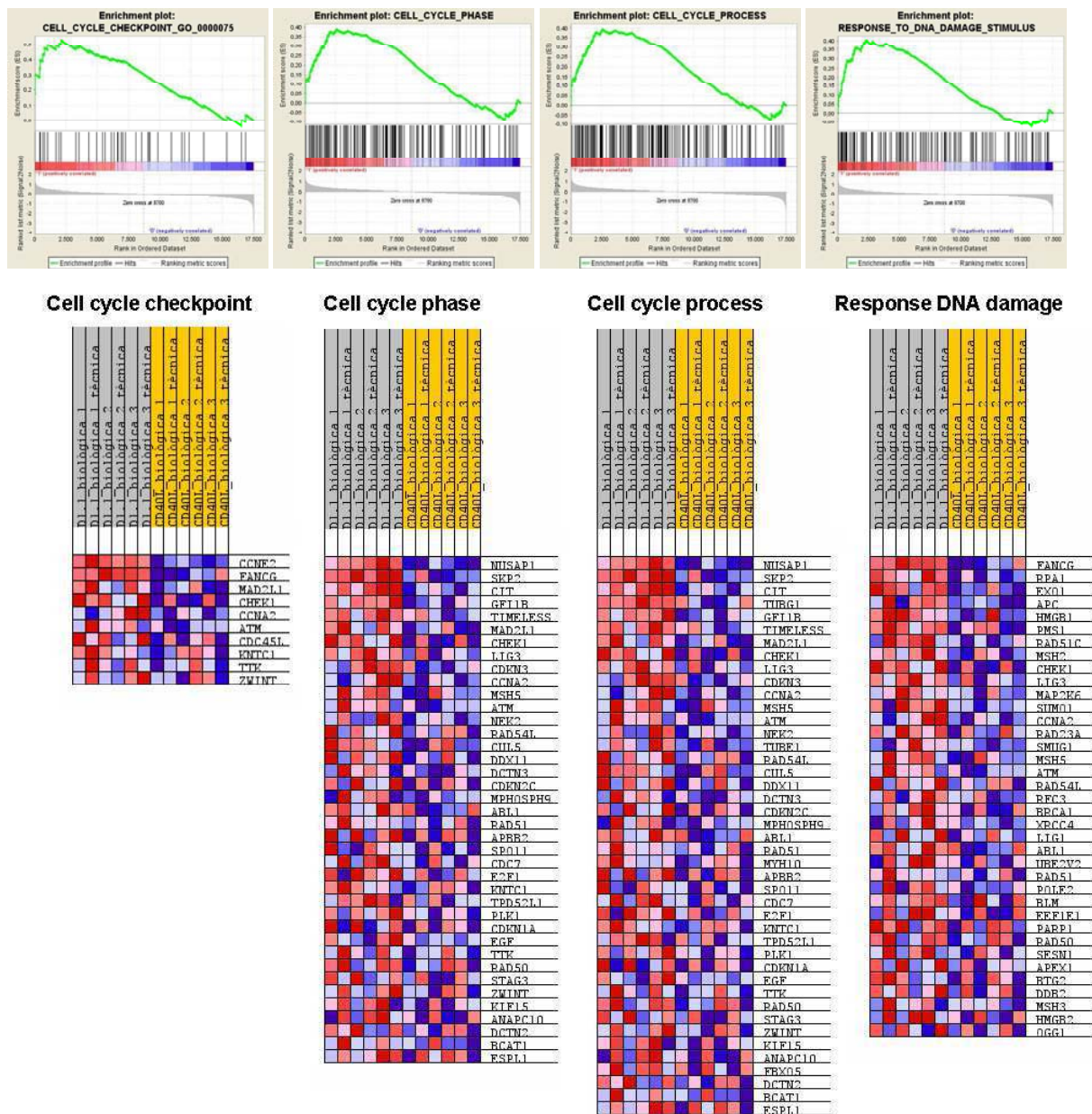


Figura. 28. *Enrichment plot* d'algunes vies significativament i diferencialment inhibides a 4 hores d'estimulació amb mCD40L vs sCD40L en el conjunt de gens regulats amb un FDR < 0.25 i *Heat map* amb els gens més regulats en cada via segons l'anàlisi de GSEA, comparant msRNA-2 amb siRNA-2 per estimulació de la via de CD40. Vermell: sobreexpressat; blau: infraexpressat.



## 5.2. CÈL·LULES DENDRÍTIQUES

### 5.2.1. CARACTERITZACIÓ DE LES POBLACIONS DE MONÒCITS I CÈL·LULES DENDRÍTIQUES

Els monòcits van ser aïllats dels PBMC mitjançant el *kit MACS CD14 isolation kit* utilitzant perles magnètiques conjugades a anticossos anti-CD14 i columnes de separació cel·lular magnètiques, o per recollida de la fracció adherent de PBMC com es descriu en l'apartat 4.6.1. de Materials i Mètodes. A partir de  $10^8$  PBMCs s'obtenien entre  $2-4 \times 10^6$  monòcits és a dir, entre 6-8%, depenent de la mostra de sang perifèrica. Es van obtenir entre  $12-24 \times 10^6$  monòcits/*buffy coat*. Els monòcits van ser cultivats amb IL-4 i GM-CSF durant 7 dies, de manera que a dia 5 es van diferenciar a CDi immadures (CDi) i aquestes van ser cultivades durant 2 dies amb l'estímul de maduració LPS. Es va realitzar l'anàlisi de les tres poblacions a dies 0, 5 i 7 mitjançant la tècnica de citometria de flux amb un citòmetre FACS Calibur i realitzant l'anàlisi de dades amb els programes CellQuestPro i Flowjo 5.7.2. (Figura 29).

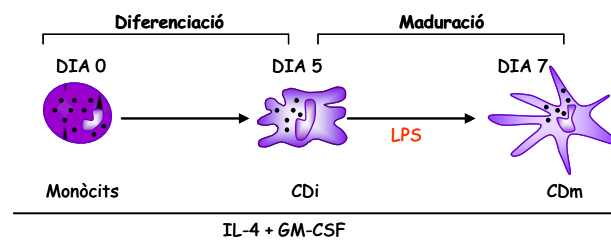


Figura 29. Procés dut a terme per a l'obtenció de CDi i CDm. CDi, CDi immadures; CDm, CDi madures.

La citometria de flux és una tècnica d'anàlisi que permet seleccionar una població de cèl·lules en suspensió en funció de les seves característiques morfològiques com la grandària i la granularitat, o de l'expressió d'antígens detectats mitjançant anticossos específics. La Figura 30 mostra una gràfica de "*dot plot*" que representa la grandària cel·lular front la morfologia (SSC vs FSC).

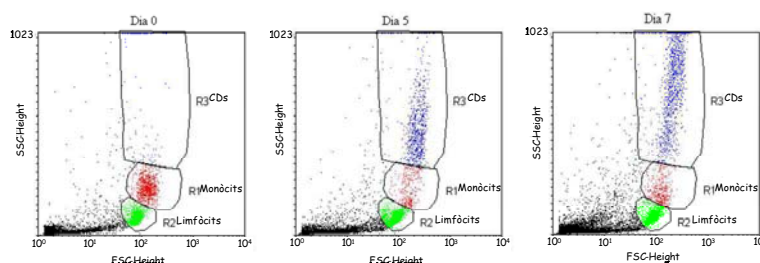


Figura 30. Monòcits extrets de *Buffy coats* en cultiu van ser fixats i analitzats per citometria de flux. Els *dot-plot* obtinguts representen en l'eix d'ordenades la granularitat o complexitat cel·lular (SSC) i en l'eix d'abscisses la grandària (FSC) cel·lular. Es mostren les poblacions cel·lulars observades a dies 0, 5 i 7. (R1, monòcits; R2, Limfòcits; R3, CDs).

Es pot observar la presència de dues poblacions a dia 0, consistent en una població elevada de monòcits R1, que són cèl·lules de petita grandària i granularitat, i una població menys nombrosa corresponent als limfòcits R2. Mentre que a dia 5 i 7 ja podem distingir la població de CDs, R3 que són cèl·lules de més grandària i amb prolongacions.

La població situada en la finestra R3 es va analitzar amb objecte de determinar l'expressió de diversos antígens de superfície en les CDs.

### 5.2.1.1. Caracterització fenotípica de les Cèl·lules Dendrítiques

No hi ha un marcador característic que defineixi a les CDs. Són les combinacions amb els diferents marcadors, i l'absència d'uns altres el que defineix els diferents estats maduratsius d'aquestes cèl·lules.

Les CDs que s'obtenen a partir de monòcits es defineixen fenotípicament, per la manca de marcadors de llinatge, en especial per la manca de CD14, que defineix als monòcits-macròfags, la presència de molècules presentadores d'antigen MHC-I, MHC-II, CD1a, molècules coestimuladores CD40, CD80, CD83, CD86, el marcador CD83 característic de les CDs en estat madur, molècules d'adhesió CD11a, CD18, CD54, CD58, receptors de quimioquines CCR5, CCR7, receptors de fagocitosi CD32, CD36, CD64, DEC205, i altres marcadors de tipus CD2, CD25, CD95, etc...

En la Figura 31 es mostra el resultat del fenotip amb diferents marcadors de membrana analitzats, respecte els seus isotips controls, que es van realitzar a CDs en ambdós estadis de maduració a dia 7 mitjançant la tècnica de citometria de flux, per tal de caracteritzar millor l'expressió de determinades molècules i els canvis que pateixen en estimular la maduració amb la barreja de citoquines i LPS, que indueixen una forta maduració. L'anàlisi de dades es va realitzar amb els programes CellQuestPro i FlowJo 5.7.2.

Les CDs es caracteritzen per ser APCs molt potents [70]. Per dur a terme aquesta funció s'indueix en les CDi l'expressió de molècules MHC-II juntament amb l'expressió d'altres marcadors necessaris durant el procés de maduració a APC.

Es va estudiar l'expressió de HLA-DR, molècula de classe II, pròpia de les APCs perquè és un important marcador de la capacitat de la CD per presentar l'antigen. Per la mateixa raó es van escollir els marcadors CD80 (B7-1) i CD86 (B7-2), ja que són molècules coestimuladores de l'activitat limfocitària que col·laboren en l'acció de MHC. El CD83 és un antigen pertanyent a la superfamília de les Immunoglobulines, es caracteritza per ser marcador específic de CDs madures (CDm) i intervé en la presentació d'antigen a les cèl·lules T induint una resposta immunitària (tot i que es desconeix el mecanisme) [70]. CD14 és un marcador

## Resultats

diferenciador entre CD i monòcit. CD1a és també un important marcador derivat de monòcit especialitzat en la presentació d'antigen, ja que uneix antigens lipídics i glicolipídics i els presenta als receptors de cèl·lules T i a les NK. Per últim CD40 que és una proteïna de membrana que s'expressa en totes les APCs i és un marcador d'activació de les CDs.

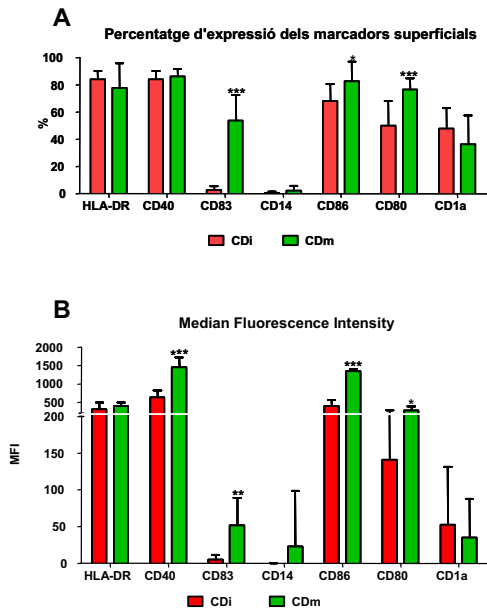


Figura 31. En la taula A es descriu el percentatge d'expressió dels marcadors superficials, mentre que en la taula B es descriu la MFI (*Median Fluorescence Intensity*) d'aquests mateixos marcadors analitzats per Citometria de Flux en les poblacions CDi, Cèl·lules Dendrítiques Immadures; i CDm, Cèl·lules Dendrítiques Madures, respecte els seus isotips controls. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de % i MFI  $\pm$  SD de 10 experiments independents.

\* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.005.

Com es pot observar en l'apartat A de la Figura 31, a nivell de percentatge observem una expressió elevada de les molècules associades a la maduració/activació de les CDs (HLA-DR, CD40, CD86 i CD80) tot i que no hi ha diferències significatives en l'expressió de CD40 i HLA-DR entre les CDi i les CDm. També hi ha una expressió elevada dels marcadors CD86 i CD80 en ambdues poblacions tot i que hi ha un augment més significatiu en les CDm. CD14 pot indicar la presència de monòcits i macròfags. En aquest cas veiem absència de CD14 tant en CDi com en CDm. Es va determinar que el marcador característic de les CDm, CD83 era absent en CDi, mentre que la seva expressió augmentava de forma considerable en les CDm. Finalment s'observa una lleugera disminució de l'expressió de CD1a en les CDm.

En l'apartat B es descriu la MFI o *Median Fluorescence Intensity* associada a cada molècula de superfície. No s'observen diferències significatives en l'expressió dels marcadors CD1a ni HLA-DR entre CDi i CDm. Mentre que es dona absència de CD14 en ambdues poblacions i un augment molt elevat en les molècules coestimuladores CD40, CD80 i CD86 a nivell de la població de CDm, tot i que també s'observa expressió elevada en les CDi. Per últim veiem absència del marcador CD83 en CDi i un augment de la seva expressió en CDm. En la Figura 32 veiem els histogrames d'expressió d'aquests marcadors superficials d'un experiment representatiu.

## Resultats

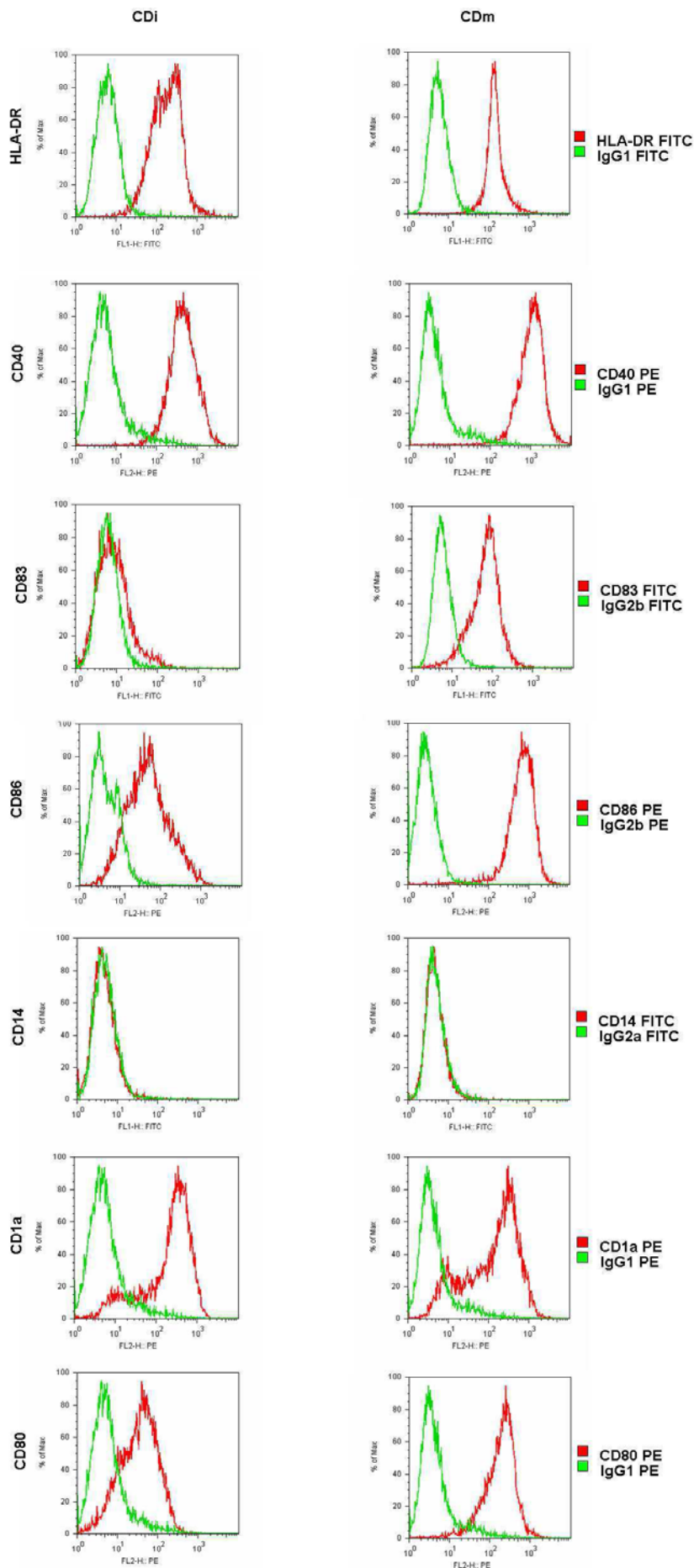


Figura 32. Expressió de HLA-DR, CD40, CD83, CD86, CD80, CD14 i CD1a, representada en histogrames en les poblacions CDi i CDm al 7è dia de cultiu cel·lular, respecte els seus isotips controls.

Es van marcar les CDs per determinar l'expressió d'aquestes molècules per citometria de flux. Es va obtenir la MFI mitja associada a cada població per a cada una de les molècules de superfície. Figura representativa de 10 experiments independents.

## Resultats

En estar les cèl·lules en cultiu durant uns 7 dies, temps necessari per a la diferenciació de monòcits a CDm, hi ha la possibilitat que processos de mort cel·lular tinguin lloc durant aquest procés. Per això, es va analitzar amb Iodur de propidi per citometria de flux la viabilitat cel·lular de les CDi durant el procés de diferenciació de monòcit a CD i també durant la maduració de la mateixa. Els resultats es mostren en la Figura 33.

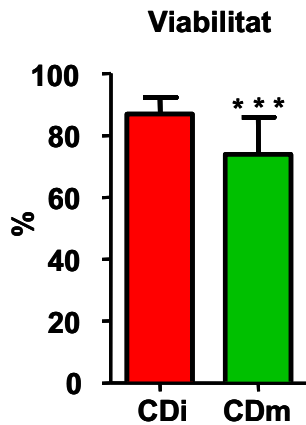


Figura 33. Viabilitat de les CDi i CDm. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de %  $\pm$  SD de 10 experiments independents.  
\*\*\* P > 0.001.

### 5.2.1.2. Avaluació de la capacitat endocítica

Per determinar les propietats funcionals de les CDs tractades amb els diferents estímuls, es va mesurar la capacitat d'aquestes cèl·lules per endocitar mitjançada per receptor utilitzant ovoalbumina conjugada amb un fluorocrom fluorescent, BODIPY (DQ-OVA), insensible al pH. El conjugat DQ-OVA és endocitat via el receptor de manosa, després de la qual els nivells de fluorescència detectats són proporcionals a l'extensió del processament de DQ-OVA, i aquesta és la mesura de l'extensió de la internalització mitjançada per receptor dins la cèl·lula [225].

Les CDi i les CDm van ser incubades amb DQ-OVA, i l'extensió del processament d'ovalbumina va ser determinat per citometria de flux. Les CDs es van incubar amb DQ-OVA durant 15 min a 37°C i per mesurar l'endocitosi no específica de l'antigen, aquestes es van incubar durant 15 min a 4°C amb DQ-OVA. Posteriorment es va determinar la MFI associada a la seva capacitat endocítica, restant el valor obtingut d'unió no específica als valors obtinguts a 37°C. Com s'observa en la Figura 34 les CDi són capaces d'endocitar i processar DQ-OVA a alts nivells. Mentre que les CDm, tractades amb LPS durant 48 hores, tenen una menor capacitat d'endocitosi comparada amb les CDi.

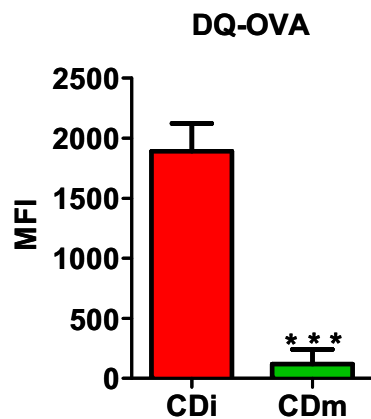


Figura 34. Capacitat endocítica de les CDs. Tant les CDi com les CDm van ser incubades amb DQ-OVA i l'extensió del processament d'ovalbumina va ser determinat per citometria de flux. Les CDm no són capaces d'endocitar i processar DQ-OVA a alts nivells en comparació amb CDi que tenen la capacitat d'endocitar antígens. Els resultats es mostren com la MFI mitja  $\pm$  SD de 10 experiments independents.

\*\*\* P < 0.001.

### 5.2.1.3. Avaluació del marcador de maduració CCR7

Es va avaluar l'expressió de CCR7, un receptor de quimioquines que controla la migració de les cèl·lules T de memòria cap als teixits inflamats, així com l'estimulació de la maduració de les CDs. La determinació de la seva expressió ens dona informació de la capacitat de migració de les CDs.

Es va realitzar un estudi de l'expressió de CCR7 en les CDs tant en esta immadur com madur, a nivell de proteïna per mitja de la tècnica de citometria de flux i a nivell de RNA mitjançant RT-PCR a temps real.

En la Figura 35 veiem la MFI associada a aquesta molècula de superfície. S'observa presència de CCR7 en ambdues poblacions, tot i que la seva expressió augmenta de forma considerable en estat madur de les CDs. En la Figura 36 veiem els histogrames d'un exemple representatiu de l'expressió de CCR7.

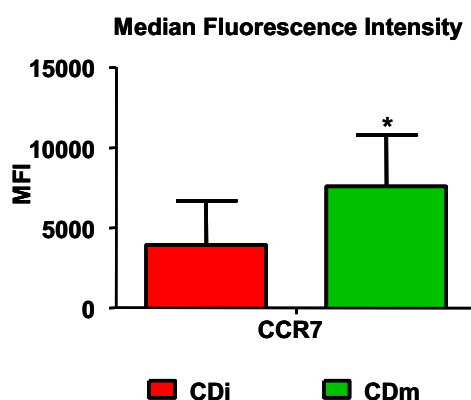


Figura 35. MFI del receptor CCR7 en CDi i CDm.

Els resultats es mostren com la MFI mitja  $\pm$  SD de 6 experiments independents.

\* P < 0.05.

En la Figura 36 veiem els histogrames d'expressió d'aquest receptor de quimioquines d'un experiment representatiu.

## Resultats

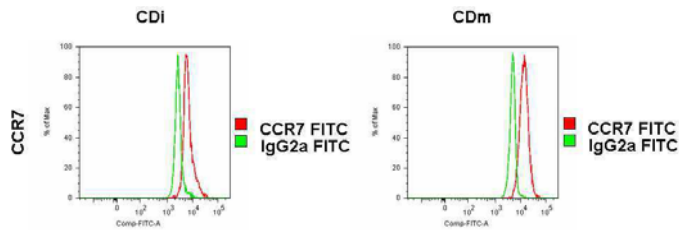
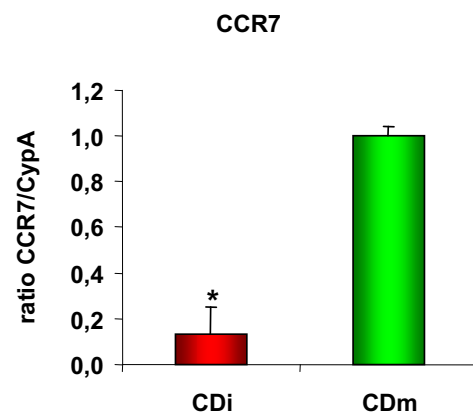


Figura 36. Expressió de la MFI associada a cada població del marcador CCR7, representada en histogrames en les poblacions CDi i CDm al 7è dia de cultiu cel·lular. Figura representativa de 6 experiments independents.

Assumint que les CDm expressen CCR7, utilitzant la tècnica de qRT-PCR a temps real es va quantificar l'expressió del transcrit CCR7 humà en CDs immadures i madures al 7è dia de cultiu cel·lular. Es van calcular els nivells d'expressió del mRNA de CCR7 relatius al gen constitutivament expressat de la ciclofilina-A (ratio CCR7/CypA). Els resultats es van relativitzar a CDm. Es pot observar una expressió molt reduïda en el cas de les CDi.

Figura 37. Anàlisi per qRT-PCR a temps real de l'expressió de CCR7 en CDs immadures i madures a dia 7 del cultiu. Els resultats es mostren com la mitja de l'expressió  $\pm$  SD de 6 experiments independents.

\*  $P < 0.05$ .



### 5.2.2. EFECTE DE LES ISOFORMES DE LA PROTEÏNA PLASMÀTICA PURIFICADA C4BP ( $\alpha7\beta1$ I $\alpha7\beta0$ ) I DE LA PROTEÏNA RECOMBINANT C4BP $\alpha$ (rec $\alpha6\beta0$ ), EN LA MADURACIÓ I DIFERENCIACIÓ DE LES CÈL·LULES DENDRÍTIQUES

Es va voler determinar si el regulador del Sistema del Complement C4BP afectava les etapes de diferenciació i/o maduració de les CDs provinents de monòcits CD14<sup>+</sup> de sang perifèrica.

Les proteïnes amb les quals es va fer l'estudi, les isoformes de la proteïna plasmàtica C4BP ( $\alpha7\beta1$  i  $\alpha7\beta0$ ) i de la proteïna recombinant C4BP  $\alpha$  (rec $\alpha6\beta0$ ) van ser cedides per la Dra. Anna Blom.

### 5.2.2.1. Assaig de Binding

Es va dur a terme un assaig d'unió de C4BP a les CDi. Aquest va ser desenvolupat per determinar si les isoformes de la proteïna plasmàtica C4BP ( $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$ ) s'uneixen específicament a la membrana de les CDi en estat immadur i dels monòcits.

Per realitzar aquest estudi s'han utilitzat monòcits extrets de sang perifèrica, tant purificats per adherència al plàstic de la placa de cultius com per separació amb boles magnètiques utilitzant el sistema de MiniMacs, *MACS CD14 isolation kit*, i CDi en estat immadur. Es va realitzar un marcatge indirecte de la unió de C4BP a les cèl·lules incubant tant els monòcits com les CDi amb concentracions creixents de  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$ , tal i com es descriu en l'apartat 4.6.2.1 de Materials i Mètodes. Aquestes proteïnes van ser marcades amb un anticòs primari específic per la cadena  $\alpha$  (*rabbit anti-human C4BPA Ab*) i aquest va ser marcat amb un anticòs secundari *goat F(ab')<sub>2</sub> fragment anti-rabbit IgG (H + L)* que portava associat el fluorocrom FITC. Mitjançant citometria de flux es va poder obtenir les dades de MFI de les concentracions estudiades.

Tant en el cas dels monòcits com de les CDi s'observa unió de la isoforma  $\alpha 7\beta 1$  i aquesta unió sembla ser dosi dependent ja que a mesura que augmentem la concentració de la proteïna s'incrementa la MFI associada a la unió. Mentre que en el cas de la  $\alpha 7\beta 0$  es dona molt poca unió a monòcits i aquesta no s'incrementa en tractar els monòcits amb dosis creixents d'aquesta proteïna. En el cas de les CDi es dona poca unió però aquesta és dosi dependent. Els resultats, que es mostren en la Figura 38, són preliminars i caldria augmentar el nombre de rèpliques.

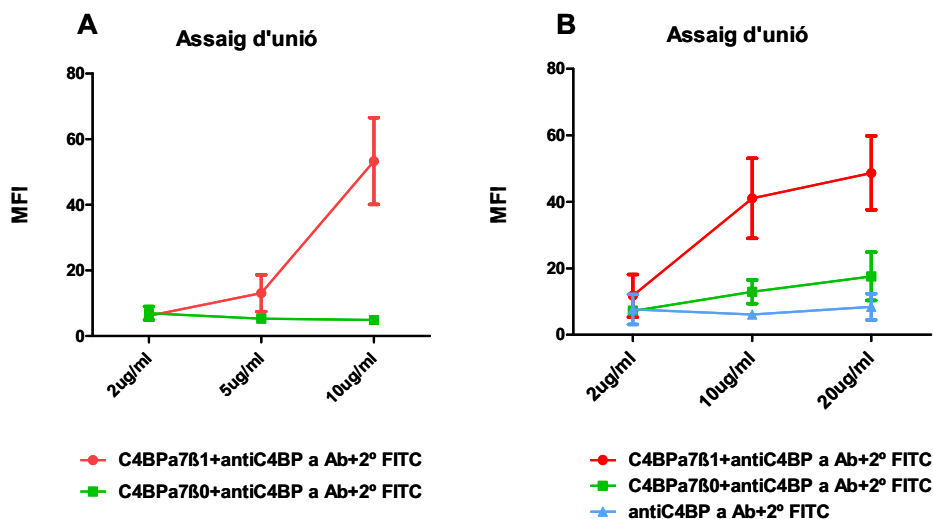


Figura 38. Assaigs d'unió de les isoformes  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$  a les poblacions de monòcits (2, 5 i 10  $\mu\text{g/ml}$ ) i CDi (5, 10 i 20  $\mu\text{g/ml}$ ) analitzades. A. MFI de l'assaig d'unió a monòcits. B. MFI de l'assaig d'unió a CDi. Els resultats es mostren com la MFI mitja  $\pm$  SD de 3 experiments independents en el cas de l'assaig d'unió en monòcits i de 7 experiments independents en el cas de l'assaig d'unió en CDi.



## Resultats

### 5.2.2.2. Efecte en la diferenciació

En aquest estudi es va voler determinar si la proteïna C4BP podia actuar en la diferenciació dels monòcits a CDi immadures. Es van sembrar monòcits purificats per adherència al plàstic de la placa de cultiu en medi RPMI + 10% de FBS i suplementat amb IL-4 i GM-CSF a les concentracions descrites en l'apartat 4.6.2.2 de Materials i Mètodes i es va afegir la proteïna plasmàtica purificada  $\alpha 7\beta 1$  i la proteïna recombinant C4BP  $\alpha$  (reca6 $\beta$ 0) a les concentracions de 2  $\mu\text{g/ml}$  i 5  $\mu\text{g/ml}$  des del primer dia de cultiu.

Per confirmar si aquestes proteïnes actuaven sobre la diferenciació de les CDi, es va determinar l'expressió dels marcadors superficials per citometria de flux, a dia 5 del cultiu, de les CDi immadures i de les CDi estimulades amb les diferents condicions esmentades (Figura 39).

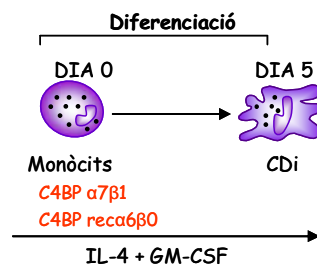


Figura 39. Procés dut a terme per obtenir CDi.

Els resultats obtinguts es mostren en la Figura 40. En el cas del tractament amb  $\alpha 7\beta 1$  es van determinar els marcadors superficials HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86, CD14 i CD1a tant a nivell de percentatge (A) com de MFI (B). Cap dels marcadors mostren diferències significatives ni a nivell de percentatge ni de MFI.

En el cas del tractament amb reca6 $\beta$ 0, es van determinar els marcadors HLA-DR, CD40, CD80 i CD83 tant a nivell de percentatge (C) com de MFI (D). En ambdós casos es pot observar un augment significatiu tant de CD80 com de CD83 en tractar les CDi amb reca6 $\beta$ 0 a les dues concentracions experimentades respecte al control dels monòcits sembrats sense estimular amb la proteïna C4BP. En la Figura 41 veiem els histogrames d'expressió dels marcadors superficials CD80 i CD83 en tractar les CDi amb reca6 $\beta$ 0 d'un experiment representatiu.

També es va analitzar per citometria de flux la viabilitat cel·lular de les CDi amb Iodur de propidi durant el procés de diferenciació de monòcit a CDi en tractar les CDi amb reca6 $\beta$ 0. Els resultats es mostren en la Figura 42.

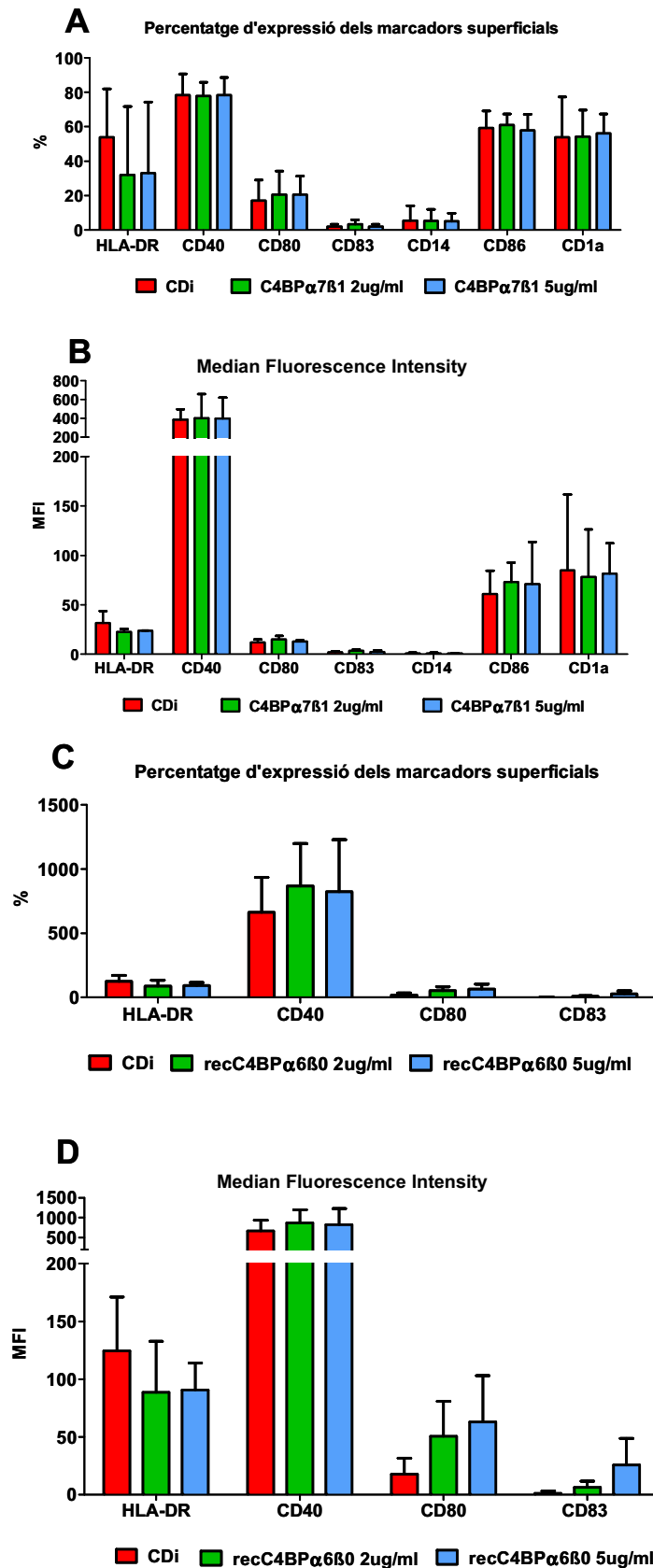


Figura 40. Anàlisi d'expressió de diferents antígens de superfície en les poblacions de CDs analitzades. Percentatge d'expressió (A) i MFI (B) dels marcadors superficials en tractar les CDs amb  $\alpha$ 7 $\beta$ 1 a les concentracions de 2 i 5  $\mu$ g/ml. Percentatge d'expressió (C) i MFI (D) dels marcadors superficials en tractar les CDs amb rec $\alpha$ 6 $\beta$ 0 a les concentracions de 2 i 5  $\mu$ g/ml. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de % i MFI  $\pm$  SD de 3 experiments independents (en el tractament amb rec $\alpha$ 6 $\beta$ 0 pel marcador CD83 n = 5).

## Resultats

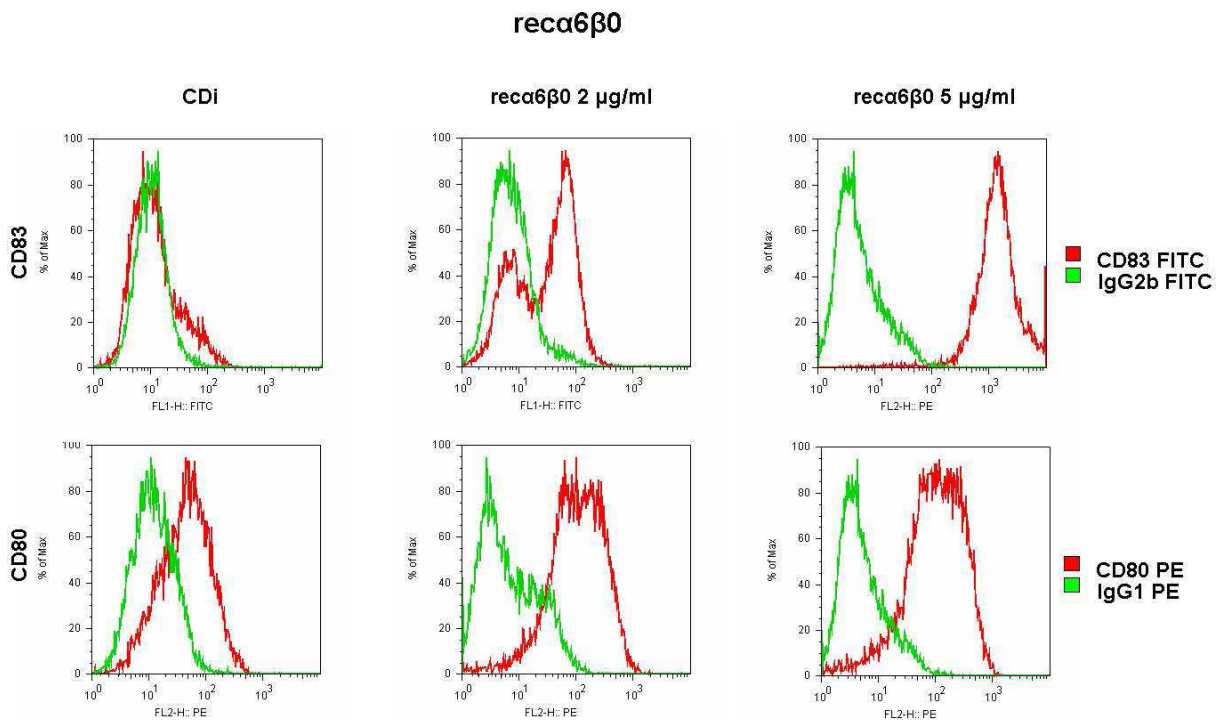
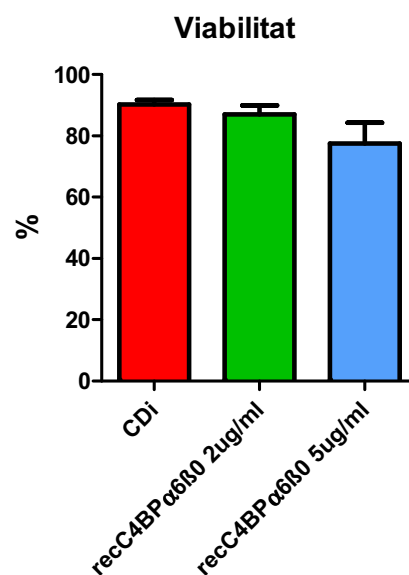


Figura 41. Expressió CD83 i CD80 representada en histogrames en les poblacions CDi i tractades amb reca6β0 a les concentracions de 2 i 5 μg/ml al 5è dia de cultiu cel·lular respecte els seus isotips controls. Es van marcar les CDs per determinar l'expressió d'aquestes molècules per citometria de flux. La MFI associada a cada població va ser obtinguda per a cada una de les molècules de superfície. Figura representativa de 3 experiments independents.

S'observa que el tractament de les cèl·lules amb reca6β0 no afecta a la viabilitat cel·lular ja que tant en el cas de les CDi com les tractades, els percentatges de mortalitat cel·lular són al voltant del 80-90% en tots els casos.

Figura 42. Viabilitat de les CDi i les CDs tractades amb la isoforma reca6β0 de la proteïna C4BP. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de % ± SD de 3 experiments independents.



### 5.2.2.3. Efecte en la maduració

En aquest estudi es va voler determinar si la proteïna C4BP podia actuar en la maduració les CDs. Es van sembrar monòcits purificats per adherència al plàstic de la placa de

cultiu en medi RPMI + 10% de FBS i suplementat amb IL-4 i GM-CSF a les concentracions descrites en l'apartat 4.6.2.3 de Materials i Mètodes i es va afegir la proteïna plasmàtica purificada  $\alpha 7\beta 1$  i la proteïna recombinant C4BP  $\alpha$  (reca6 $\beta$ 0) a les concentracions de 2  $\mu$ g/ml i 5  $\mu$ g/ml al 5è dia de cultiu.

Per confirmar si aquestes isoformes de la proteïna C4BP actuaven sobre la maduració de les CDs, es va determinar l'expressió dels marcadors superficials per citometria de flux a dia 7 del cultiu de les CDs madures (tractades amb LPS), de les CDs immadures no estimulades i de les CDs estimulades amb les diferents condicions esmentades (Figura 43).

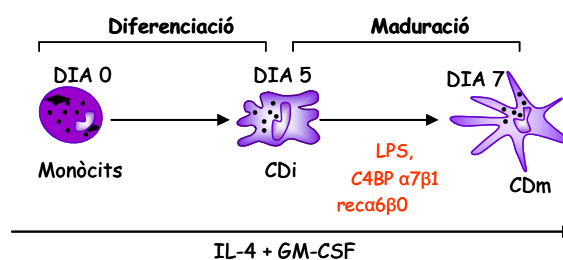


Figura 43. Procés dut a terme per obtenir mCDs.

Els resultats obtinguts es mostren en la Figura 44.

En el cas del tractament amb  $\alpha 7\beta 1$  es van determinar els marcadors superficials HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86, CD14 i CD1a tant a nivell de percentatge (A) com de MFI (B). No es van trobar diferències significatives en tractar les CDs amb  $\alpha 7\beta 1$  a les dues concentracions experimentades respecte al control dels monòcits sembrats sense estimular amb proteïna C4BP, ni a nivell de percentatge ni de fluorescència.

En el cas del tractament amb reca6 $\beta$ 0, es van determinar els marcadors HLA-DR, CD40, CD80 i CD83 tant a nivell de percentatge (C) com de MFI (D). Tampoc es van trobar diferències significatives, ni a nivell de percentatge ni de fluorescència, en tractar les CDs amb reca6 $\beta$ 0 a les dues concentracions experimentades respecte al control dels monòcits sembrats sense estimular amb la proteïna C4BP.

També es va analitzar amb Iodur de propidi per citometria de flux la viabilitat cel·lular de les CDs durant el procés de maduració de les CDs en tractar les cèl·lules amb  $\alpha 7\beta 1$  o reca6 $\beta$ 0. Els resultats es mostren en la Figura 45.

# Resultats

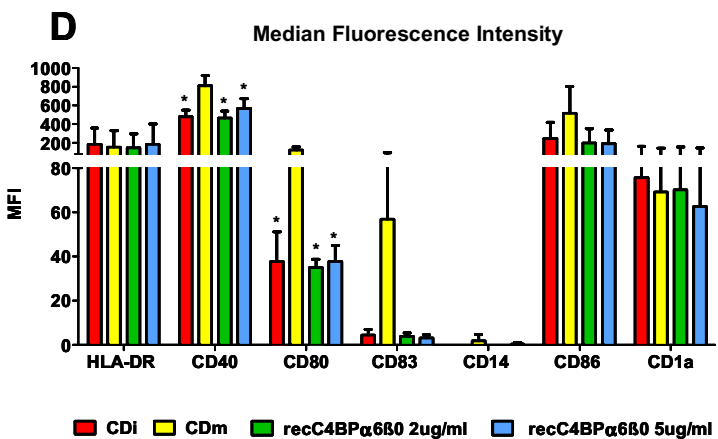
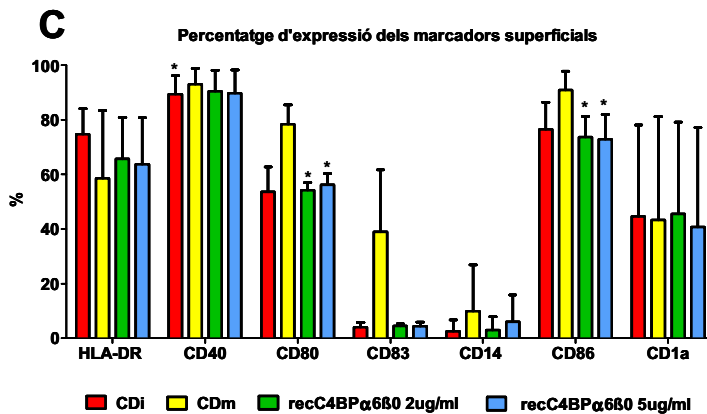
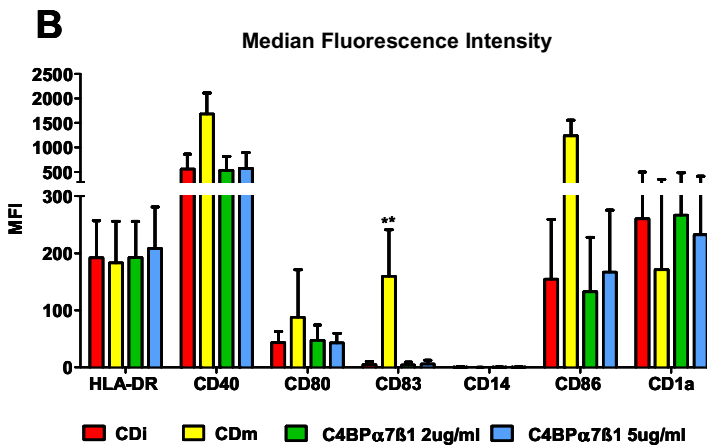
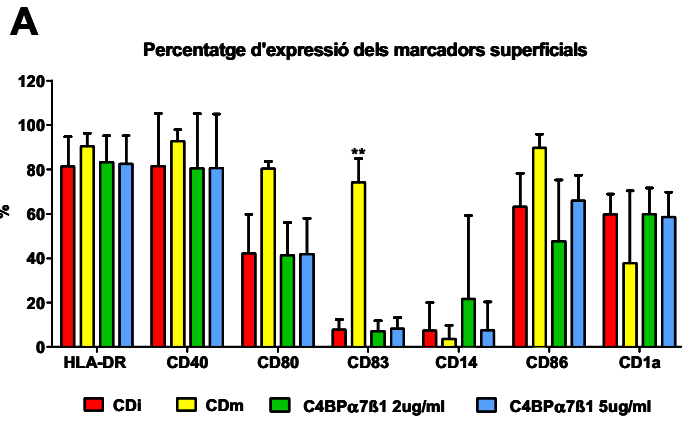


Figura 44. Anàlisi de l'expressió dels diferents antigens de superfície en les poblacions de CDs analitzades. Percentatge d'expressió (A) i MFI (B) dels marcadors superfcials en tractar les CDs amb  $\alpha$ 7 $\beta$ 1 a les concentracions de 2 i 5  $\mu$ g/ml. Percentatge d'expressió (C) i MFI (D) dels marcadors superfcials en tractar les CDs amb rec $\alpha$ 6 $\beta$ 0 a les concentracions de 2 i 5  $\mu$ g/ml. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de % i MFI  $\pm$  SD de 3 experiments independents en ambdós tractaments.

\* P < 0.05; \*\* P < 0.01.

S'observa que el tractament de les CDi amb  $\alpha 7\beta 1$  o  $rec\alpha 6\beta 0$  no afecta a la viabilitat cel·lular ja que obtenim viabilitats del voltant del 80-90% en tots els casos.

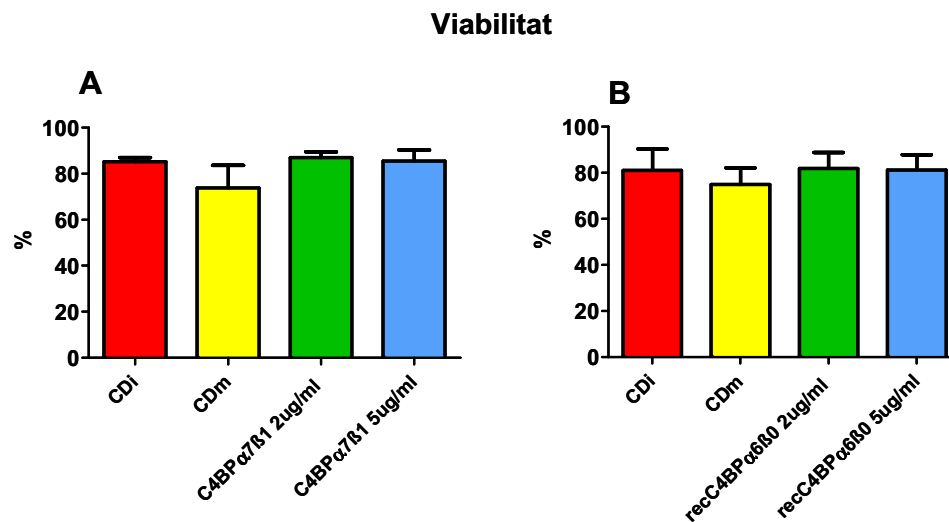


Figura 45. Viabilitat de les CDi i les CDs tractades amb les isoformes  $\alpha 7\beta 1$  (A) i  $rec\alpha 6\beta 0$  (B) de la proteïna C4BP. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de %  $\pm$  SD de 3 experiments independents.

#### 5.2.2.4. Efecte en la diferenciació i maduració

##### a. Efecte de la proteïna plasmàtica purificada C4BP $\alpha 7\beta 1$ i la proteïna recombinant C4BP $\alpha$ ( $rec\alpha 6\beta 0$ )

En aquest estudi es va voler determinar si la proteïna C4BP podia actuar en la diferenciació i en la maduració de les CDs. Es van sembrar monòcits purificats per adherència al plàstic de la placa de cultiu en medi RPMI + 10% de FBS i suplementat amb IL-4 i GM-CSF a les concentracions descrites en l'apartat 4.6.2.4 de Materials i Mètodes i es va afegir la proteïna plasmàtica purificada  $\alpha 7\beta 1$  i la proteïna recombinant C4BP  $\alpha$  ( $rec\alpha 6\beta 0$ ) a les concentracions de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  i 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  des del primer dia de cultiu. Un cop diferenciats a CDi, es va afegir l'estímul de maduració LPS a la concentració de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en combinació de les isoformes de la proteïna C4BP amb LPS a les mateixes concentracions descrites amb anterioritat (Figura 46).

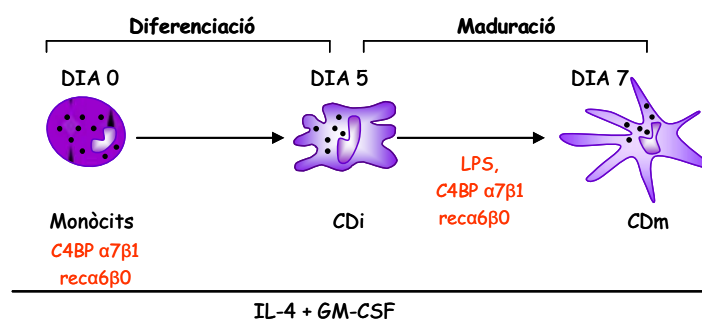


Figura 46. Procés dut a terme per obtenir CDs.

## Resultats

Per confirmar si aquestes isoformes de C4BP actuaven sobre la diferenciació i maduració de les CDs, es va determinar l'expressió dels marcadors superficials de les CDs madures (tractades amb LPS), de les CDs immadures no estimulades i de les CDs estimulades amb les diferents condicions esmentades per citometria de flux a dia 7 del cultiu.

Els resultats obtinguts es mostren en la Figura 48.

En el cas del tractament amb  $\alpha 7\beta 1$  es van determinar els marcadors superficials HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86, CD14 i CD1a tant a nivell de percentatge (A) com de MFI (B). No es van trobar diferències significatives en tractar les CDs amb  $\alpha 7\beta 1$  a les dues concentracions experimentades respecte al control de les mCDs madurades amb LPS, ni a nivell de percentatge ni de fluorescència.

En el cas del tractament amb  $\text{reca}\alpha 6\beta 0$ , es van determinar els marcadors superficials HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86, CD14 i CD1a tant a nivell de percentatge (C) com de MFI (D). Es va poder observar una disminució de l'expressió del marcador de maduració CD83 del voltant del 80% respecte mCDs, en tractar les CDs amb  $\text{reca}\alpha 6\beta 0$  a les dues concentracions experimentades tant a nivell de percentatge com de MFI. En la Figura 47 veiem els histogrames d'expressió del marcador superficial CD83 en tractar les CDs amb  $\text{reca}\alpha 6\beta 0$  d'un experiment representatiu.

També es va analitzar amb Iodur de propidi per citometria de flux la viabilitat cel·lular de les CDs durant el procés de diferenciació i maduració de les CDs en tractar les cèl·lules amb  $\text{reca}\alpha 6\beta 0$  i a dia 5 combinant el tractament amb l'estímul de maduració LPS. Els resultats es mostren en la Figura 49.

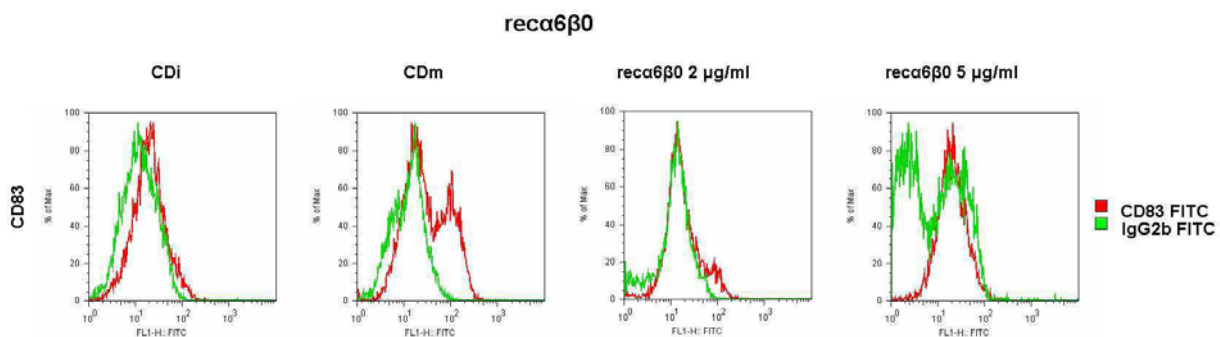


Figura 47. Expressió de la MFI del marcador CD83 associada a cada població representada en histogrames en les poblacions CDi i tractades amb  $\text{reca}\alpha 6\beta 0$  a les concentracions de 2 i 5  $\mu\text{g/ml}$  al 7è dia de cultiu cel·lular respecte els seus isotips controls. Figura representativa de 5 experiments independents.

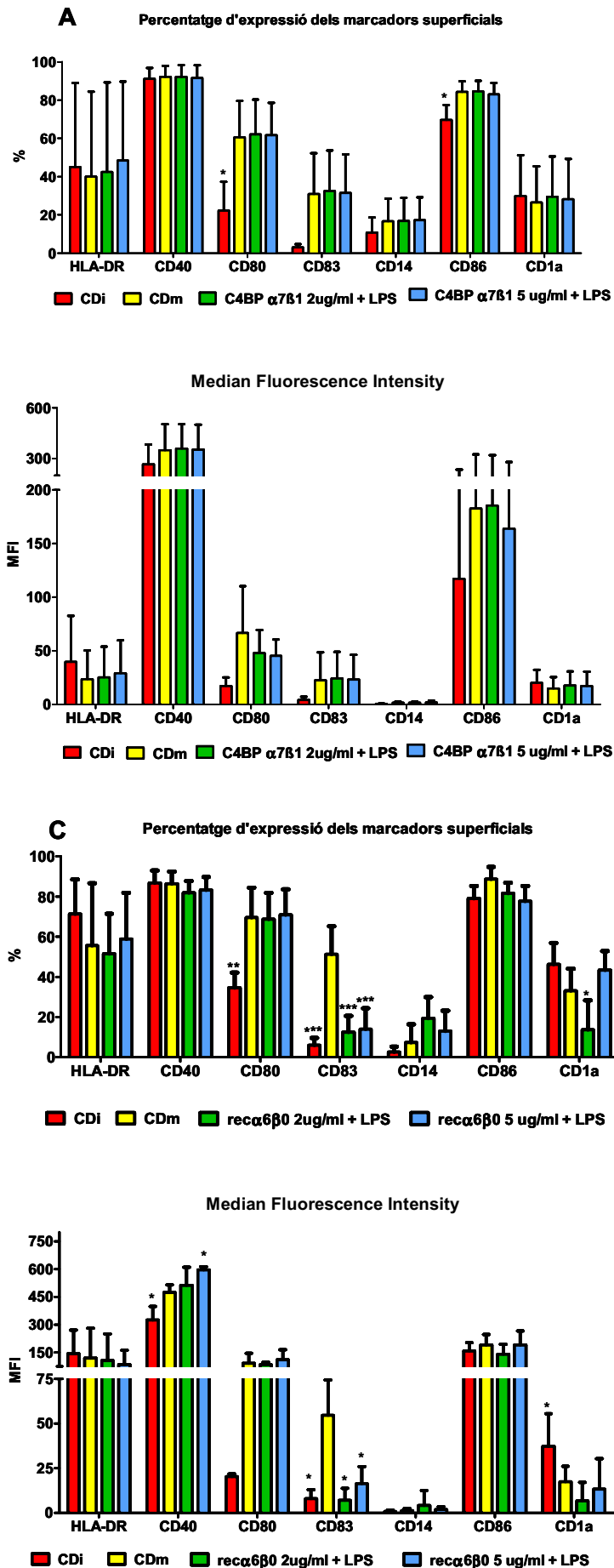


Figura 48. Anàlisi de l'expressió dels diferents antigens de superfície en les poblacions de CDs analitzades. Percentatge d'expressió (A) i MFI (B) dels marcadors superficials en tractar les CDs amb  $\alpha$ 7 $\beta$ 1 a les concentracions de 2 i 5  $\mu$ g/ml des del primer dia i durant tot el cultiu i a dia 5 afegint l'estímul maduratiu LPS. Percentatge d'expressió (C) i MFI (D) dels marcadors superficials en tractar les CDs amb rec $\alpha$ 6 $\beta$ 0 a les concentracions de 2 i 5  $\mu$ g/ml des del primer dia i durant tot el cultiu i a dia 5 afegint l'estímul maduratiu LPS. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de % i MFI  $\pm$  SD de 4 experiments independents en el tractament amb  $\alpha$ 7 $\beta$ 1 i de 6 experiments independents en el tractament amb rec $\alpha$ 6 $\beta$ 0.

P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001.



## Resultats

S'observa que el tractament de les cèl·lules amb  $\text{re}\alpha 6\beta 0$  no afecta a la viabilitat cel·lular ja que obtenim viabilitats del voltant del 80-90% en tots els casos.

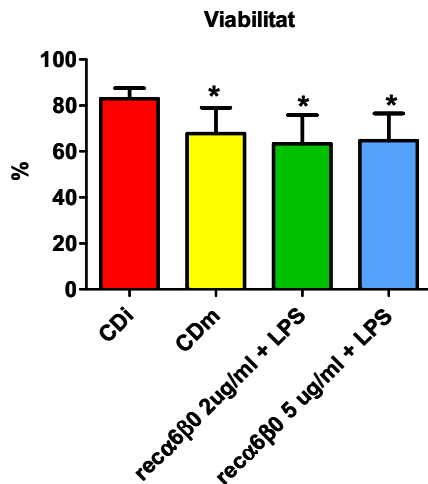


Figura 49. Viabilitat de les CDi i les CDs tractades amb la isoforma  $\text{re}\alpha 6\beta 0$  de la proteïna C4BP. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de  $\% \pm \text{SD}$  de 5 experiments independents.

\*  $P < 0.05$ .

### b. Efecte de la proteïna plasmàtica purificada C4BP $\alpha 7\beta 0$ en cèl·lules dendrítiques purificades per adherència

La isoforma majoritària de C4BP en sang és la formada per 7 cadenes  $\alpha$  i una cadena  $\beta$  ( $\alpha 7\beta 1$ ) i està tota acomplexada amb la proteïna S, un component del sistema anticoagulant de la proteïna C [226]. Es van realitzar assajos de diferenciació i maduració amb la isoforma de la proteïna plasmàtica purificada C4BP  $\alpha 7\beta 0$ . Les isoformes als quals els manca la cadena  $\beta$  no tenen l'habilitat d'unir-se a la proteïna S.

En aquest estudi es va voler determinar si la isoforma  $\alpha 7\beta 0$  de la proteïna C4BP podia actuar tant en la diferenciació com en la maduració de les CDs. Es van sembrar monòcits purificats per adherència al plàstic de la placa de cultiu en medi RPMI + 10% de FBS i suplementat amb IL-4 i GM-CSF a les concentracions descrites en l'apartat 4.6.2.4. de Materials i Mètodes i es va afegir les isoformes plasmàtiques purificades de C4BP ( $\alpha 7\beta 1$  a la concentració de 2  $\mu\text{g/ml}$  o  $\alpha 7\beta 0$  a les concentracions 2  $\mu\text{g/ml}$  i 5  $\mu\text{g/ml}$ ) i la proteïna recombinant C4BP  $\alpha$  ( $\text{re}\alpha 6\beta 0$  a la concentració de 2  $\mu\text{g/ml}$ ) des del primer dia de cultiu. Un cop diferenciats a CDs, es van afegir l'estímul de maduració LPS a la concentració de 5  $\mu\text{g/ml}$  o la combinació de les isoformes de la proteïna C4BP amb LPS a les mateixes concentracions descrites amb anterioritat.

Per confirmar si aquestes isoformes de la proteïna C4BP actuaven sobre la diferenciació i la maduració de les CDs, es va determinar l'expressió dels marcadors de les CDs madures (tractades amb LPS), de les CDs immadures no estimulades i de les CDs estimulades amb les

diferents condicions esmentades superficials per citometria de flux a dia 7 del cultiu (Figura 50).

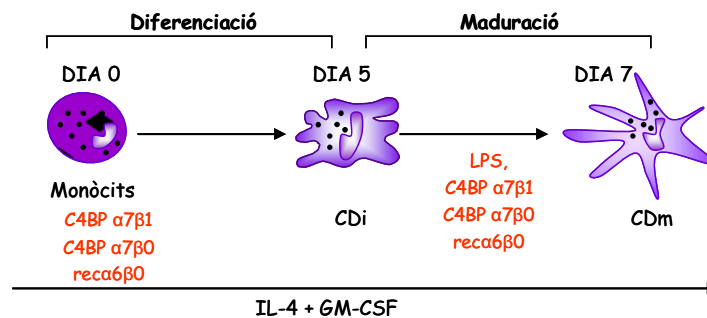


Figura 50. Procés dut a terme per obtenir CDs.

Els resultats obtinguts es mostren en la Figura 51.

Es van determinar els marcadors superficials HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86, CD14 i CD1a tant a nivell de percentatge (A) com de MFI (B) en els tres tipus de tractament. No es van trobar diferències significatives en tractar les CDs amb  $\alpha 7\beta 1$  respecte al control de les CDm madurades amb LPS, ni a nivell de percentatge ni de fluorescència.

En el cas del tractament amb  $\alpha 7\beta 0$  i  $reca6\beta 0$ , es va poder observar una disminució de l'expressió del marcador de maduració CD83 respecte CDm, en tractar les CDs amb  $\alpha 7\beta 0$  a les dues concentracions experimentades i amb  $reca6\beta 0$  tant a nivell de percentatge com de MFI. També es va observar una disminució més lleugera dels percentatges i la MFI dels marcadors CD86, CD80 i CD1a en tractar les cèl·lules amb  $\alpha 7\beta 0$  a les dues concentracions experimentades. Pel que fa a la resta de marcadors no es van trobar diferències significatives ni a nivell de percentatge ni de fluorescència respecte les CDm.

També es va analitzar amb Iodur de propidi per citometria de flux la viabilitat cel·lular de les CDs durant el procés de diferenciació i maduració de les CDs en tractar les cèl·lules amb  $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 0$  i  $reca6\beta 0$  i a dia 5 combinant el tractament amb l'estímul de maduració LPS. Els resultats es mostren en la Figura 52.

En la Figura 53 veiem els histogrames d'expressió dels marcadors superficials CD83, CD86, CD1a i CD80 de les CDs tractades amb  $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 0$  o  $reca6\beta 0$  d'un experiment representatiu.

## Resultats

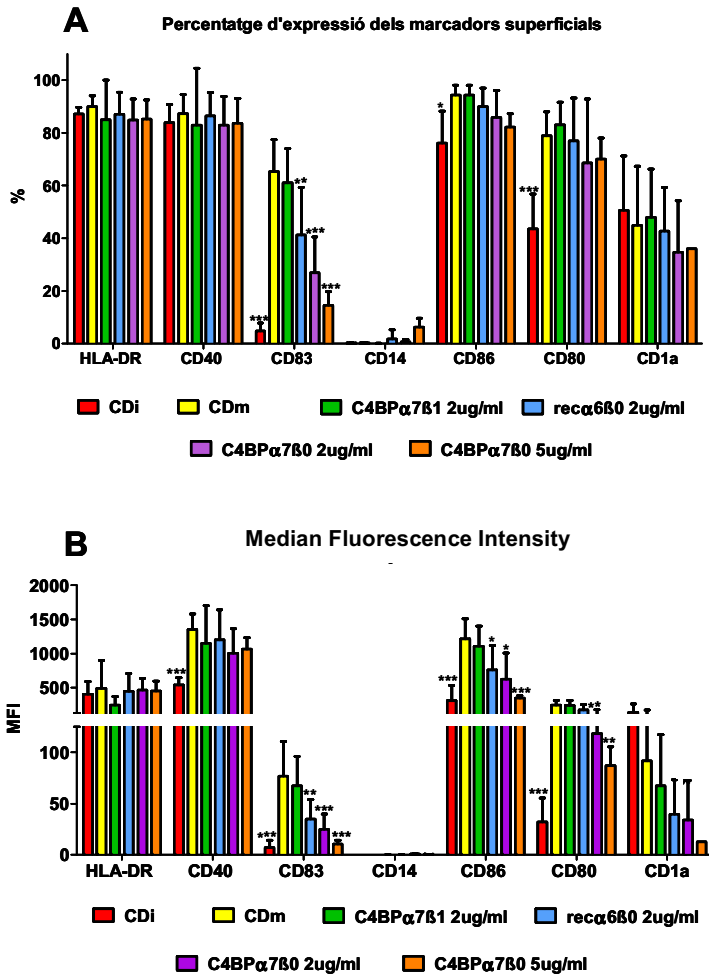


Figura 51. Anàlisi de l'expressió dels diferents antigens de superfície en les poblacions de CDs analitzades. Percentatge d'expressió (A) i MFI (B) dels marcadors superficials en tractar les CDs amb  $\alpha$ 7 $\beta$ 1,  $\alpha$ 7 $\beta$ 0 a les concentracions de 2 i 5  $\mu$ g/ml i amb rec $\alpha$ 6 $\beta$ 0 des del primer dia i durant tot el cultiu i a dia 5 afegint l'estímul maduratiu LPS. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de % i MFI  $\pm$  SD de 8 experiments independents.

\* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001.

S'observa que el tractament de les cèl·lules amb aquestes proteïnes no afecta a la viabilitat cel·lular ja que obtenim viabilitats del voltant del 80-90% en tots els casos.

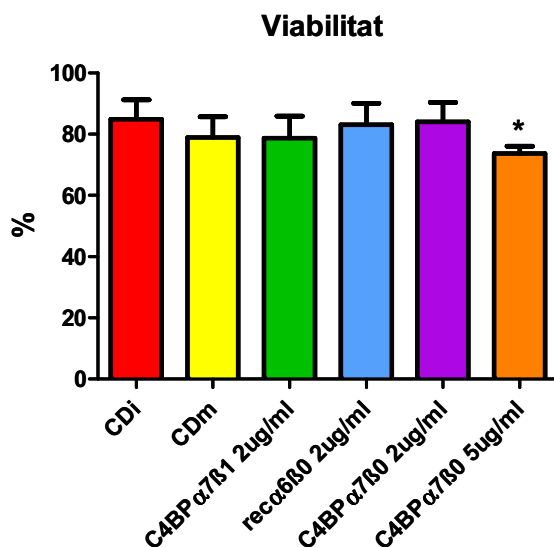


Figura 52. Viabilitat de les CDi i les CDs tractades amb les isoformes de la proteïna C4BP. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de %  $\pm$  SD de 5 experiments independents.

\* P < 0.05.

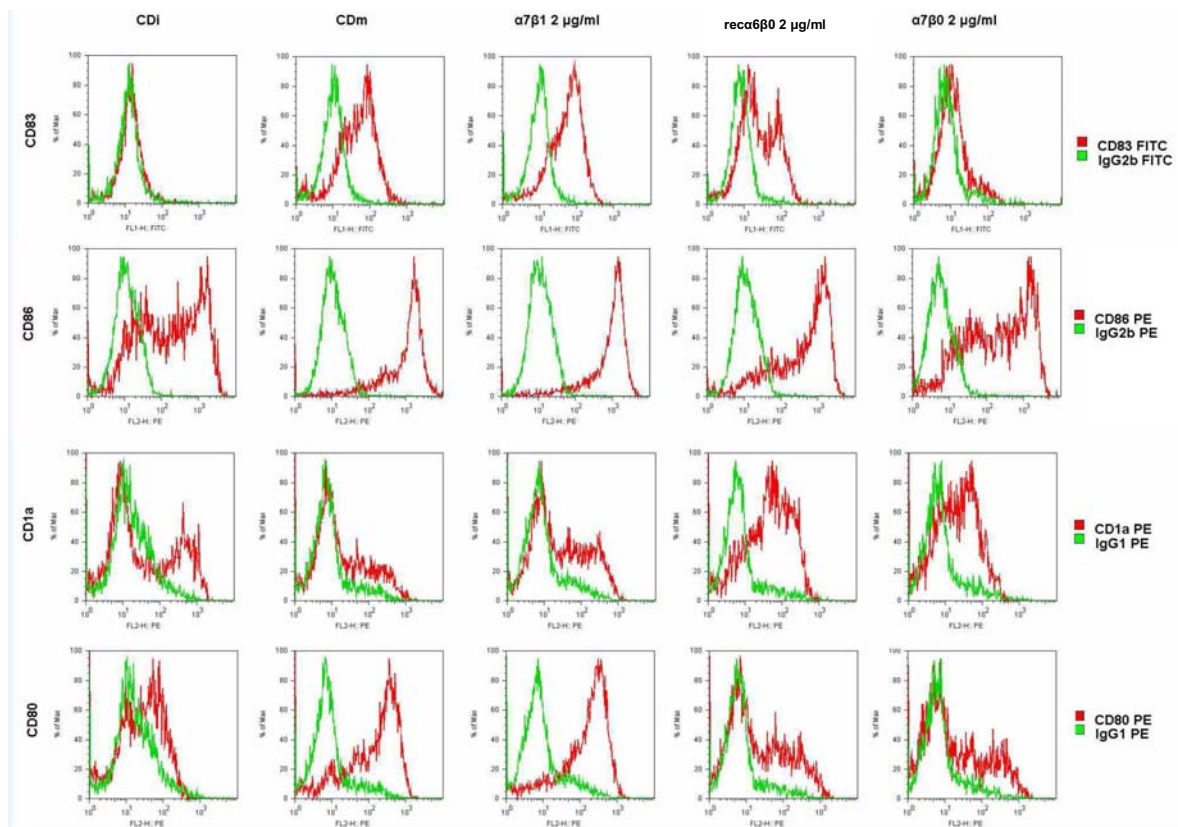


Figura 53. Expressió de CD83, CD80 i CD1a, representada en histogrames en les poblacions CDi i tractades amb  $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 0$  i  $rec\alpha 6\beta 0$  a la concentració de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  al 7è dia de cultiu cel·lular respecte els seus isotips controls. Les CDs van ser marcades per determinar l'expressió d'aquestes molècules per citometria de flux. La MFI associada a cada població va ser obtinguda per a cada una de les molècules de superfície. Figura representativa de 4 experiments independents.

### c. Efecte de la proteïna plasmàtica purificada C4BP $\alpha 7\beta 0$ en cèl·lules dendrítiques purificades per adherència vers boles magnètiques

Es va voler determinar si la puresa de la població inicial de monòcit era determinant en l'efecte en la diferenciació i maduració de les CDs mitjançada per C4BP. Es van tractar els monòcits purificats per adherència i per boles magnètiques amb les proteïnes plasmàtiques de C4BP ( $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$ ) i la proteïna recombinant ( $rec\alpha 6\beta 0$ ) des del primer dia de cultiu a la concentració de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  i a dia 5 combinant-les amb LPS. Es va determinar l'expressió del marcador superficial CD83 per citometria de flux a dia 7 del cultiu de les CDs madures (tractades amb LPS), de les CDs immadures no estimulades i de les CDs estimulades amb les diferents condicions esmentades (Figura 54).

Es va poder observar una disminució de l'expressió del marcador de maduració CD83 respecte CDm, en tractar les CDs amb  $\alpha 7\beta 0$  i  $rec\alpha 6\beta 0$ , tant a nivell de percentatge com de MFI, sense mostrar diferències significatives entre les cèl·lules purificades per adherència a la

## Resultats

placa i les purificades amb perles magnètiques. Mentre que la proteïna  $\alpha 7\beta 1$  no sembla afectar ni la diferenciació ni la maduració de les CDs independentment del sistema de purificació.

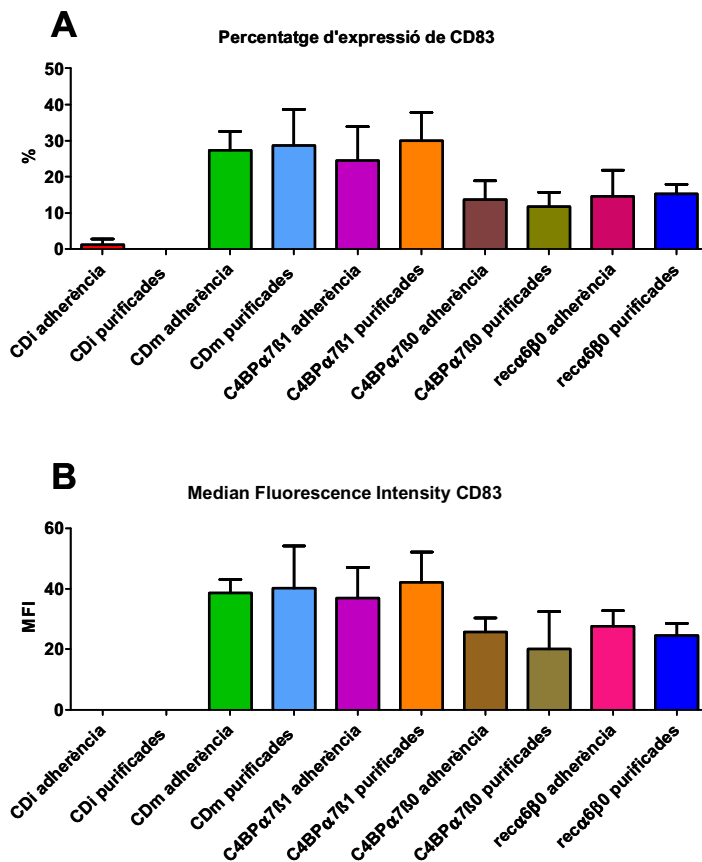


Figura 54. Anàlisi de l'expressió de l'antigen de superfície CD83 en les poblacions de CDs analitzades. Percentatge d'expressió (A) i MFI (B) de CD83 en tractar les CDs, purificades per adherència a la placa o per mitjà de boles magnètiques, amb  $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 0$  i reca6 $\beta 0$  des del primer dia i durant tot el cultiu i a dia 5 afegint l'estímul maduratiu LPS. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de % i MFI  $\pm$  SD de 3 experiments independents.

### 5.2.2.5. Perfil transcripcional

Es va avaluar per pRT-PCR semiquantitativa a temps real l'expressió dels mRNA dels gens CCR7,IDO i BIC-1 en CDs tractades amb les proteïnes  $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 0$  i reca6 $\beta 0$  des del primer dia i durant tot el cultiu a la concentració de 2  $\mu\text{g/ml}$  i a dia 5 afegint l'estímul maduratiu LPS (5  $\mu\text{g/ml}$ ), tant en cèl·lules purificades per adherència al plàstic com per boles magnètiques. A dia 7, es van recollir les CDs i es va procedir a l'extracció de RNA total, el qual es va quantificar mitjançant el Nanodrop® i es va sintetitzar el cDNA a partir de 500 ng de RNA total (descriu en l'apartat 4.7.1. de Materials i Mètodes).

Posteriorment es va procedir a la quantificació relativa dels transcrits de CCR7,IDO i BIC-1 humans mitjançant PCR a temps real utilitzant el fluoròfor SyBR Green I i el LightCycler®.

Per a la quantificació relativa, els nivells d'expressió dels gens problema es van analitzar respecte el gen de referència. Dins de la fase exponencial de l'amplificació es calcula l'expressió relativa (R) del gen problema en base a la diferència de *crossing point* de la mostra

respecte el control i l'eficiència d'amplificació de tots dos gens (segons el model matemàtic descrit en l'apartat 4.7. de Materials i mètodes).

Per confirmar la precisió i reproductibilitat de la PCR a temps real, es van realitzar tres rèpliques de la PCR per a cada condició, i es va determinar la variació de *crossing point* entre elles.

Totes les rèpliques van amplificar un producte únic. Per confirmar l'especificitat d'aquests productes, al final de cada reacció de RT-PCR en el LightCycler®, es realitza un anàlisi de la corba de fusió, la qual cosa permet determinar la Temperatura de Fusió ( $T_m$ ) específica del fragment amplificat, que depèn de la mida i de la composició de G/C.

La variació de *crossing point* entre les rèpliques de la mateixa mostra era mínima i, per tant, la reproductibilitat de la tècnica es considera bona.

Les eficiències de la PCR tant pels gens estudiats com per la ciclofilina són  $E_{IDO}=1,62$ ,  $E_{BIC}=1,72$ ,  $E_{CCR7}=1,65$  i  $E_{ciclofilina}=1,96$  i havien estat calculades en estudis anteriors a partir de dil·lucions seriades de l'amplificació d'aquests gens segons l'equació  $E=10^{(-1/pendent)}$ .

Les dades obtingudes es van normalitzar respecte l'expressió de la ciclofilina (gen de referència), calculant el ratio d'expressió del gen estudiat/Ciclofilina. En aquesta anàlisi semiquantitativa, l'expressió del gen diana de cada mostra tractada s'expressa com a un valor relatiu a la mostra control de CDs madures. Variacions causades per possibles errors de pipeteig es van corregir realitzant tres rèpliques de cada PCR per a cadascuna de les mostres.

En la següent gràfica es mostra els ratios gens diana/Ciclofilina corresponents a l'expressió dels gens CCR7, IDO i BIC-1 en les CDs purificades per adherència al plàstic i tractades amb les proteïnes  $\alpha7\beta1$ ,  $\alpha7\beta0$  i  $reca6\beta0$  i les CDs en estat immadur respecte les CDs madures.

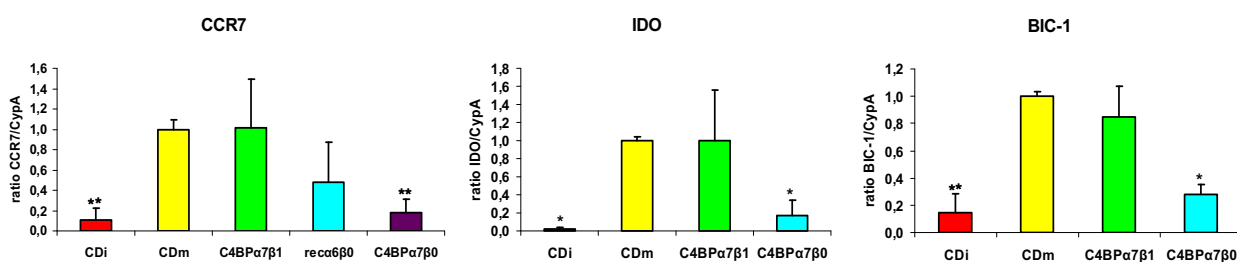


Figura 55. Quantificació de l'expressió dels gens CCR7, BIC-1 i IDO en CDs purificades per adherència al plàstic, per RT-PCR a temps real amb el LightCycler®. Els resultats són relatius a les CDm. Els resultats es mostren com la mitja  $\pm$  SD de 6 experiments independents pel gen CCR7, 4 experiments independents pel gen IDO, 3 experiments independents pel gen BIC-1.

## Resultats

Mentre que en la següent gràfica es mostra la quantificació d'aquests tres gens corresponents a un experiment amb CDs purificades mitjançant boles magnètiques.

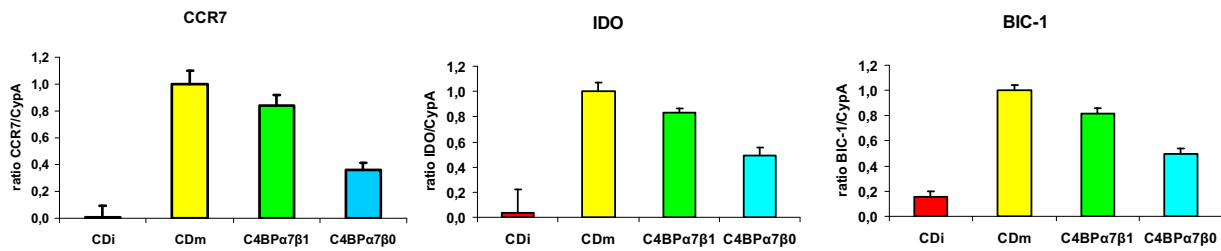


Figura 56. Quantificació de l'expressió dels gens CCR7, BIC-1 i IDO en CDs purificades per boles magnètiques, per RT-PCR a temps real amb el LightCycler®. Els resultats es mostren com la mitja  $\pm$  SD de 3 rèpliques d'un experiment.

En ambdós casos s'observa una disminució de l'expressió dels gens estudiats en tractar les CDs amb la isoforma  $\alpha7\beta0$  de la proteïna C4BP i la proteïna recombinant  $\text{rec}\alpha6\beta0$ . Mentre que en tractar les CDs amb la isoforma  $\alpha7\beta1$  s'observa expressió comparable a la de les CDm. En les CDi no s'observa expressió dels gens estudiats o aquesta és molt baixa.

### 5.2.2.6. Medició de citocines en el medi extracel·lular

La secreció de citocines pot ser un element clau en el tipus de resposta que es genera. De la mateixa manera que l'expressió de molècules coestimuladores en la membrana de la CD és determinant en l'inici de la resposta, les citocines secretades són importants en el tipus de resposta generada. La secreció de IL-12 és un element clau en la generació d'una resposta de tipus Th1. Malgrat tot, la seva regulació és complexa i la forma bioactiva (p70), només es secreta sota estímuls bacterians LPS, CpG, acompanyats per senyals T (CD40L i IFN- $\gamma$ ).

L'espectre de citocines que secreten les CDs durant la seva activació, condiciona el tipus de resposta per part dels limfòcits T. És molt possible que aquesta resposta no depengui d'una única citocina, sinó de l'equilibri o proporció relativa entre les diferents citocines secretades en un moment determinat.

La IL-10 tot i ser una citocina immunoreguladora, i quan s'afegeix externament inhibeix la funcionalitat de la CD madura [228]; no està clar el seu paper fisiològic ja que les cèl·lules de tipus Th1 humanes secreten IL-10 de manera específica. Molt possiblement sigui l'equilibri entre les diferents citocines el que condicioni la seva funcionalitat i tinguin un paper immunoregulador quan l'antigen desapareix i s'atura la secreció d'altres citocines com el IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ .

El procés que es va dur a terme per realitzar aquest assaig va ser el següent: a partir de CDs, purificades per adherència al plàstic, diferenciades i cultivades amb les proteïnes de C4BP  $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 0$  i  $\text{re}\alpha 6\beta 0$  des del primer dia i durant tot el cultiu a la concentració de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  i a dia 5 afegint l'estímul maduratiu LPS durant 48 hores, es recol·lecta el sobrenedant del cultiu, en el qual es va mesurar la secreció de IL-12p70 com inductor de resposta Th1 mitjançant ELISA. Com indica la Figura 57 es van obtenir diferents perfils de secreció d'aquesta citoquina, estant augmentada significativament la seva secreció en CDm tractades amb LPS durant 48 hores, comparades amb CDi sense tractar. Les CDs tractades amb  $\alpha 7\beta 1$  van secretar nivells de IL-12p70 semblants a CDm. Mentre que les CDs tractades amb  $\alpha 7\beta 0$  i  $\text{re}\alpha 6\beta 0$  van secretar nivells de IL-12p70 semblants a CDi.

També es va mesurar la secreció de IL-10, com agent antiinflamatori mitjançant ELISA. En la Figura 57 s'observen nivells de secreció moderada en CDm tractades amb LPS durant 48 hores i les CDs tractades amb  $\alpha 7\beta 1$  comparades amb CDi sense tractar. Mentre que les CDs tractades amb  $\alpha 7\beta 0$  i  $\text{re}\alpha 6\beta 0$  van secretar nivells augmentats de IL-10 comparades amb el control. Aquests resultats indiquen que les CDs que han estat inhibides en el seu procés de maduració i diferenciació, romanen en aquest estat, són productores de IL-10, agent antiinflamatori, en canvi CDs estimulades i portades a un fenotip madur secreten menor proporció d'aquesta citoquina. Cal assenyalar que les CDs sense tractament representen un estat immadur, però que és incapaç de secretar nivells importants de IL-10, la qual cosa indica que per si soles no posseeixen capacitats immunoreguladores.

Mitjançant la mateixa ELISA es va determinar la influència del tractament d'aquestes proteïnes en la secreció de IL-6 i IL-8. Les CDi a dia 7 secreten nivells molt baixos d'ambdues citoquines en els sobrenedants. Mentre que les CDm i les cèl·lules tractades amb  $\alpha 7\beta 1$  produeixen quantitats significatives d'aquestes interleuquines i semblants entre elles. No obstant, les cèl·lules tractades amb  $\alpha 7\beta 0$  o  $\text{re}\alpha 6\beta 0$  mostren uns nivells de secreció de IL-6 i IL-8 intermitjos. Aquestes dades impliquen que la modulació de l'alliberament d'aquestes interleuquines per LPS depèn de l'activació cel·lular abans de la maduració final.

Finalment es van determinar la secreció de les citoquines TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  que tenen un paper central en les respostes immunes. Les CDi a dia 7 secreten nivells molt baixos d'ambdues citoquines en els sobrenedants. Mentre que les CDm i les cèl·lules tractades amb  $\alpha 7\beta 1$  produeixen quantitats significatives d'aquestes citoquines i semblants entre elles. No obstant, les cèl·lules tractades amb  $\alpha 7\beta 0$  o  $\text{re}\alpha 6\beta 0$  no secreten IFN- $\gamma$  i mostren uns nivells molt baixos a nivell del TNF- $\alpha$ .



## Resultats

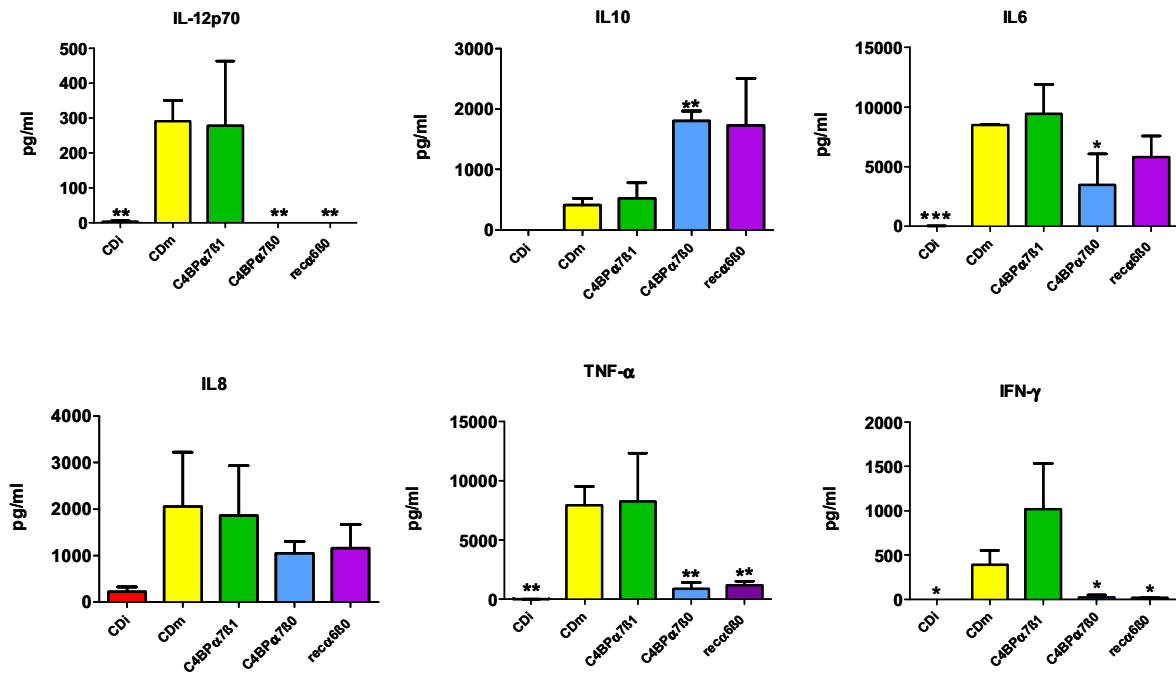


Figura 57. Secreció de citoquines per CDs tractades amb diferents isoformes de la proteïna C4BP. La quantificació es va realitzar per ELISA de captura utilitzant anticossos específics per a la captura i el revelat. Les dades són representades com la mitja  $\pm$  SD de 3 experiments independents.

Aquests resultats indiquen que les CDs que han estat inhibides en el seu procés de diferenciació i maduració a causa del tractament amb les isoformes  $\alpha7\beta0$  o  $rec\alpha6\beta0$ , romanen en aquest estat, són productores de IL-10, en canvi CDs estimulades amb  $\alpha7\beta1$  i portades a un fenotip madur secreten en menor proporció aquesta citoquina. Cal assenyalar que les CDs sense tractament representen un estat immadur, però que és incapaç de secretar nivells importants de IL-10, la qual cosa indica que per si soles no posseeixen capacitats immunoreguladores.

### 5.2.2.7. Microscopia d'escombratge

Un dels aspectes més importants de la generació de cèl·lules *in vitro* és veure la seva capacitat de madurar en rebre els estímuls adequats. Com ja s'ha comentat en la introducció, per a que les CDs generin una forta resposta dels limfòcits T, cal que les dendrítiques estiguin madures. Una població de cèl·lules immadures podria estimular la proliferació de cèl·lules reguladores o la inducció d'anèrgia. A part dels diferents marcadors que hem vist que canvien amb la maduració, de manera clàssica es defineix la maduració per un augment en la expressió de CD40, CD80 i CD86, així com l'expressió de CD83 (no s'expressa en immadures), com a molècules coestimuladores, i també un augment en les molècules de classe I i classe II.

En els cultius també es fa un seguiment visual, ja que amb dos dies de maduració les cèl·lules canvien de manera dramàtica el seu aspecte, passant de ser rodones i amb poques prolongacions en el cas de les CDi, a ser cèl·lules amb nombroses dendrites en l'estat madur, tal i com es pot veure a la Figura 58.

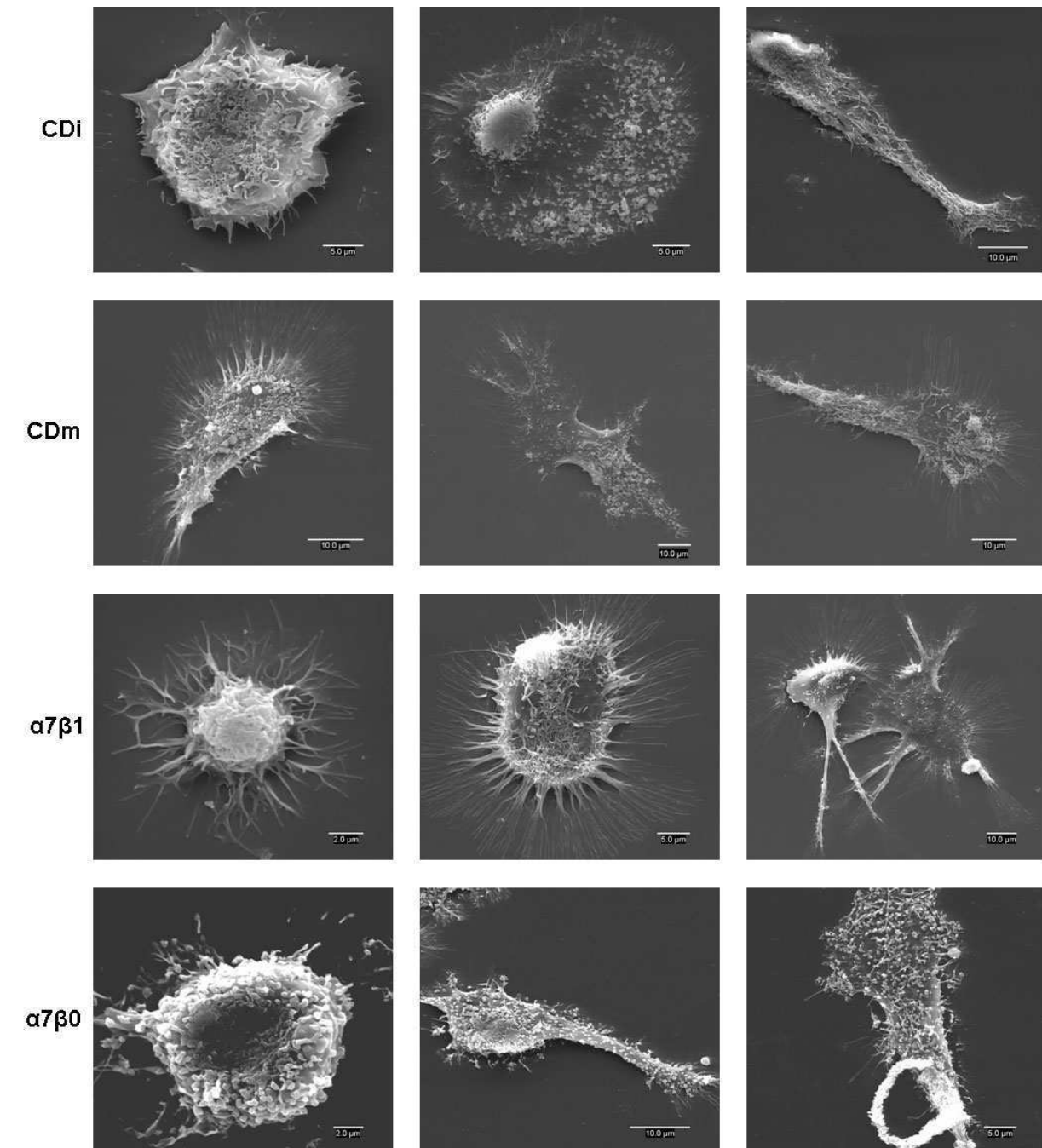


Figura 58. S'observa la morfologia de les CDs en els diferents estats de maduresa i en ser tractades amb les isoformes plasmàtiques de C4BP. CDi, CDs immadures; CDm, CDs madures;  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$ ; isoformes plasmàtiques de C4BP.

## Resultats

El tractament d'aquestes cèl·lules amb la isoforma plasmàtica  $\alpha 7\beta 0$  de la proteïna C4BP a la concentració de 2  $\mu\text{g/ml}$  durant tot el procés de cultiu i a dia 5 afegint LPS mostra una morfologia entremig de maduresa, entre l'estat immadur i el madur, la qual cosa podria assenyalar que es troben en un estat semimadur. Mentre que el tractament amb la isoforma plasmàtica  $\alpha 7\beta 1$  mostra un aspecte més allargat amb moltes dendrites semblant a les CDs en estat madur.

### 5.2.2.8. Assajos funcionals

#### a) Avaluació de la capacitat endocítica de les CDs

Per determinar la capacitat d'internalització d'antigen de les CDs tractades amb els diferents estímuls, es va mesurar el comportament d'aquestes cèl·lules per endocitar DQ-Ovalbumin (DQ-OVA) conjugat al marcador fluorescent BODIPY FL utilitzant la citometria de flux. Les CDs van ser incubades amb DQ-OVA durant 15 min a 37°C per posteriorment determinar la seva MFI associada. Per mesurar l'endocitosi no específica de l'antigen per les CDs, aquestes van ser incubades 15 min a 4°C amb el pèptid DQ-OVA.

Es va avaluar la capacitat endocítica de les CDs tractades amb les isoformes de C4BP  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$  a la concentració de 2  $\mu\text{g/ml}$  des del primer dia de cultiu per citometria de flux a dia 5 per determinar el seu efecte en la diferenciació de monòcits a CDs immadures. S'observa una elevada capacitat d'endocitar DQ-OVA per part de les CDi. Les cèl·lules tractades amb  $\alpha 7\beta 0$  mostren una disminució lleugera de l'endocitosi. Mentre que hi ha un augment respecte CDi en el tractament amb  $\alpha 7\beta 1$  (Figura 59).

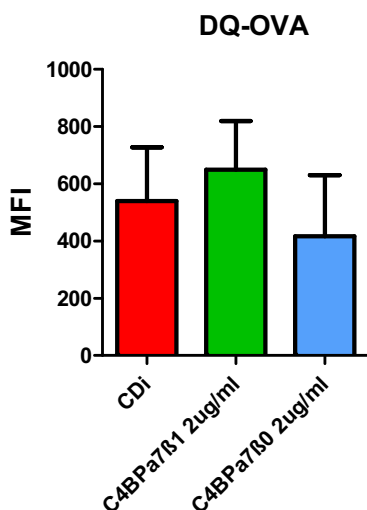


Figura 59. Capacitat endocítica de les CDs a dia 5 de cultiu tractades amb les isoformes  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$  de C4BP comparades amb les CDi que mostren nivells alts d'endocitosi. S'observa una disminució lleugera de la capacitat d'endocitar i de processar DQ-OVA en CDs tractades amb  $\alpha 7\beta 0$ , es comporta de forma semblant a CDi. Els resultats es mostren com la MFI mitja  $\pm$  SD de 4 experiments independents.

També es va determinar la capacitat d'endocitosi de DQ-OVA a dia 7, en CDs tractades amb els tres tipus de proteïnes ( $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 0$  i  $\text{reca}6\beta 0$ ) des del primer moment de cultiu i

estimulant la maduració durant 48 hores amb LPS, per avaluar els seus efectes en la diferenciació i maduració d'aquestes cèl·lules. Com s'observa en la Figura 60 les CDi eren capaces d'endocitar i processar DQ-OVA a alts nivells. Mentre que les CDm, tractades amb LPS durant 48 hores, tenen una menor capacitat d'endocitosi comparada amb les CDi sense tractar. Les CDs tractades amb C4BP  $\alpha 7\beta 1$  a la concentració de 2  $\mu\text{g/ml}$  des del primer moment de cultiu i combinades amb LPS, van mostrar una baixa capacitat d'endocitar l'antigen comparable a les CDs tractades amb LPS. Finalment les CDs tractades amb C4BP  $\alpha 7\beta 0$  (a la concentració de 2  $\mu\text{g/ml}$ ) o  $\text{re}\alpha 6\beta 0$  (a les concentracions de 2 i 5  $\mu\text{g/ml}$ ) des del primer moment de cultiu i combinades amb LPS, van mostrar una baixa o intermitja capacitat d'endocitar l'antigen comparable a les CDs tractades amb LPS.

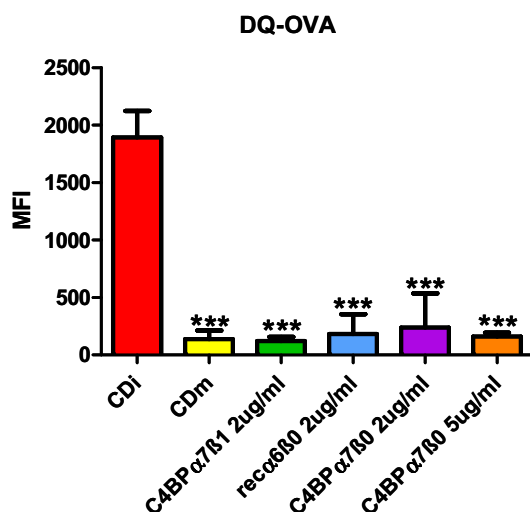


Figura 60. Capacitat endocítica de les CDs a dia 7 de cultiu tractades amb les diferents isoformes de C4BP comparades amb les CDm i les CDi. S'observa una disminució de la capacitat d'endocitar i de processar DQ-OVA en CDs tractades amb  $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 0$  o  $\text{re}\alpha 6\beta 0$  durant tot el cultiu i a dia 5 estimulant les cèl·lules amb LPS durant 48 hores, comparades amb les CDi que mostren nivells alts d'endocitosi. Les CDm donen nivells baixos d'endocitosi. Els resultats es mostren com la MFI mitja  $\pm$  SD de 4 experiments independents.

\*\*\*  $P < 0.001$ .

Es va realitzar aquest mateix assaig però comparant cèl·lules purificades per adherència a la placa i per boles magnètiques per comprovar si la puresa dels monòcits era determinant en l'endocitosi de DQ-OVA. Per realitzar aquest assaig es van tractar CDs amb els tres tipus de proteïnes ( $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 0$  i  $\text{re}\alpha 6\beta 0$ ) a la concentració de 2  $\mu\text{g/ml}$  des del primer moment de cultiu i es va estimular la maduració durant 48 hores amb LPS, per avaluar els seus efectes en la diferenciació i maduració d'aquestes cèl·lules. Com s'observa en la Figura 61 les CDi eren capaces d'endocitar i processar DQ-OVA a alts nivells. Mentre que les CDm, tractades amb LPS durant 48 hores, tenen una menor capacitat d'endocitosi comparada amb les CDi sense tractar. Les CDs tractades amb C4BP  $\alpha 7\beta 1$  des del primer moment de cultiu i combinades amb LPS, van mostrar una baixa capacitat d'endocitar l'antigen comparable a les CDs tractades amb LPS. Finalment les CDs tractades amb C4BP  $\text{re}\alpha 6\beta 0$  o  $\alpha 7\beta 0$  des del primer moment de cultiu i combinades amb LPS, van mostrar una baixa capacitat d'endocitar l'antigen comparable a les CDs tractades amb LPS indicant un comportament funcional de CDs en estat

## Resultats

semimadur de desenvolupament. No es van trobar diferències significatives entre les cèl·lules purificades per adherència a la placa de les purificades per boles magnètiques.

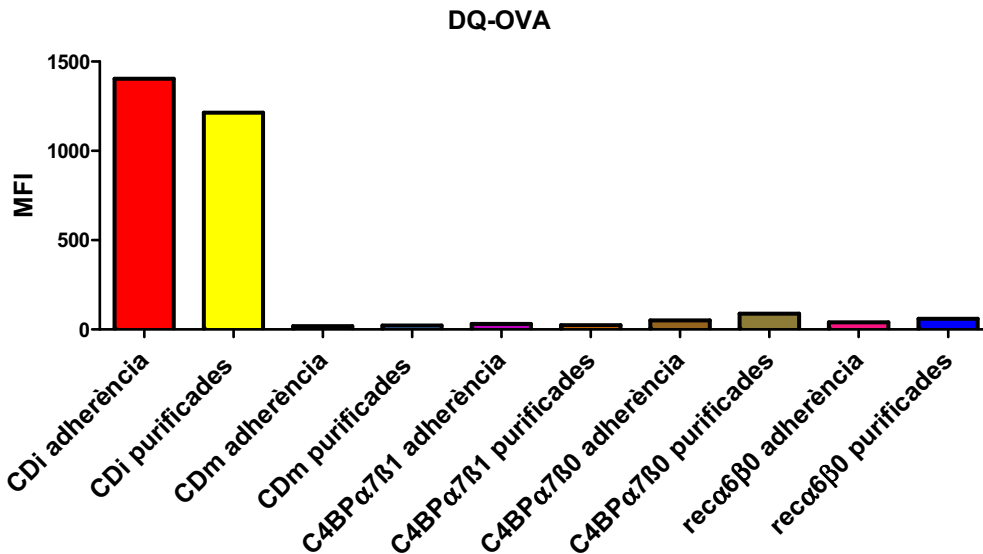


Figura 61. Capacitat endocítica de les CDs purificades per adherència a la placa o per boles magnètiques a dia 7 de cultiu tractades amb les diferents isoformes de C4BP comparades amb les CDm i les CDi. S'observa una disminució de la capacitat d'endocitar i de processar DQ-OVA en CDs tractades amb  $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 0$  o  $re\alpha 6\beta 0$  durant tot el cultiu i a dia 5 estimulants les cèl·lules amb LPS durant 48 hores, comparades amb les CDi que mostren nivells alts d'endocitosi. Les CDm donen nivells baixos d'endocitosi. Els resultats es mostren com un experiment representatiu.

### b) Assaig de quimiotaxi

Posteriorment es va determinar l'expressió de la molècula de superfície CCR7, la qual ens dona informació de la capacitat de migració de les CDs. CCR7 s'expressa constitutivament en CDs sense cap estímul, però en nivells molt baixos. Mitjançant estímuls de maduració aquests nivells augmenten de forma significativa.

Per qRT-PCR es van comprovar els nivells de RNA del gen CCR7 (descriu a l'apartat 5.2.2.5 de Resultats). Es van recollir les CDs a dia 7 després de ser tractades amb les isoformes de C4BP  $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 0$  i  $re\alpha 6\beta 0$  des del primer dia de cultiu a la concentració de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  i a dia afegint LPS com a estímul de maduració. S'observa una disminució de l'expressió de CCR7 en tractar les CDs amb  $\alpha 7\beta 0$  i  $re\alpha 6\beta 0$ , mentre que les cèl·lules incubades amb  $\alpha 7\beta 1$  donen expressió elevada de CCR7 a uns nivells semblants a les CDm.

També es va comprovar l'expressió de CCR7 a nivell superficial per citometria de flux. Els resultats de l'expressió a nivell de fluorescència es mostren en la Figura 62.

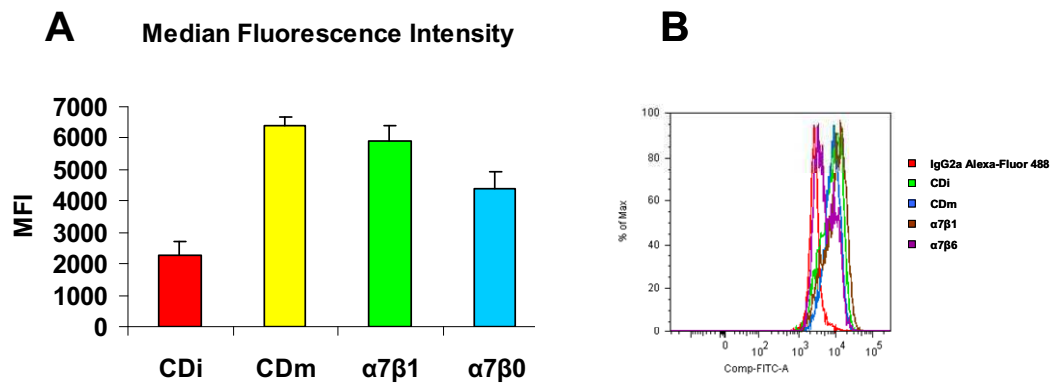


Figura 62. Anàlisi de l'expressió de l'antigen de superfície CCR7 en les poblacions de CDs analitzades. MFI (A) i histograma (B) de CCR7 en tractar les CDs amb  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$  des del primer dia i durant tot el cultiu i a dia 5 afegint l'estímul maduratiu LPS. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de % i MFI  $\pm$  SD de 3 experiments independents.

Com a conseqüència de la maduració de les CDs, aquestes migren cap a nòduls limfàtics i presenten antígens a les cèl·lules T per tal de donar una resposta immune adaptativa. La migració cap als òrgans limfoides secundaris requereix de la quimiotaxi cap a quimioquines del nòdul limfàtic i la invasió a través de la matriu extracel·lular. Aquest moviment requereix entre altres elements, la interacció entre el receptor de les CDs madures CCR7 i les quimioquines CCL21 o CCL19.

Es va realitzar un assaig de quimiotaxi per comprovar la capacitat migratòria de les CDs que havien estat tractades amb les isoformes  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$  de C4BP tal i com es descriu a l'apartat 4.6.6. de Materials i Mètodes. A les dues hores d'incubació a 37°C en les plaques de *traswells*, es van recollir les cèl·lules i es va determinar el nombre total de cèl·lules que han migrat fixant un temps concret per citometria de flux.

Els resultats de la migració es mostren en la Figura 63 com el percentatge del nombre mig de cèl·lules migrades respecte el total i relativitzats a les CDm. Es van realitzar un total de 4 experiments independents i cada experiment va comptar amb 3 rèpliques de cada condició estudiada. Es pot observar que tant les CDm com les CDs tractades durant tot el cultiu amb  $\alpha 7\beta 1$  i a dia 5 estimulades amb LPS tenen una elevada capacitat migratòria, mentre que les CDs que han estat incubades amb la proteïna  $\alpha 7\beta 0$  tenen una migració al voltant del 10%, respecte les no tractades o CDm.

## Resultats

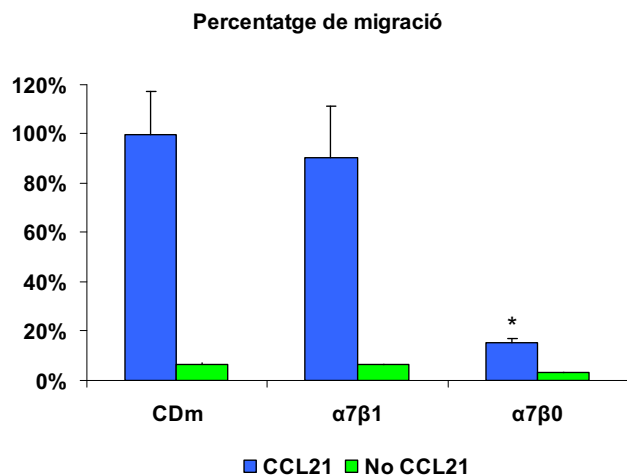


Figura 63. Assaig de migració de les CDm i les CDs tractades amb  $\alpha 7\beta 1$  o  $\alpha 7\beta 0$  durant tot el cultiu i a dia 5 combinant-les amb l'estímul maduratiu LPS. Els resultats mostren les cèl·lules que han migrat en afegir la quimioquina CCL21 en la part inferior del *transwell*. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de percentatge  $\pm$  SD de 4 experiments independents.

\*  $P < 0.05$ .

### c) Assaig de proliferació de Limfòcits T

Una de les propietats més analitzades en la literatura de les CDs és la seva capacitat de generar una forta resposta al·lògenica de cultiu mixt, resposta que possiblement depengui de l'elevat nivell d'expressió de molècules coestimuladores quan maduren i de la producció de determinades citokines per les CDs en maduració.

#### 1. Assaig d'apoptosi

Per realitzar aquest assaig primer de tot es va determinar l'apoptosi cel·lular de les CDs que havien estat cultivades en presència de les isoformes  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$  de la proteïna plasmàtica C4BP, a una concentració de 2  $\mu\text{g/ml}$ , i estimulades a dia 5 amb LPS. Com a control es van incubar les CDs amb vitamina D3 (2.4  $\mu\text{M}$ ) en les mateixes condicions.

Aquest mètode de detecció obliga a determinar estrictament el moment de l'entrada en apoptosi de les cèl·lules donat que les cèl·lules Annexin V<sup>+</sup>7-ADD<sup>-</sup> solament es troben presents en estadis inicials d'aquest procés.

Les cèl·lules van ser marcades amb Annexin-V i 7-ADD i es va determinar la viabilitat cel·lular per citometria de flux tal i com es descriu en l'apartat 4.6.7.1. de Materials i Mètodes. Els resultats obtinguts es mostren en la Figura 64 on es mostren les cèl·lules viues i les que han patit apoptosi primerenca, tardana i necrosi cel·lular.

Com es pot observar la majoria de cèl·lules són viables en totes les condicions experimentades, trobant un percentatge reduït de cèl·lules necròtiques o bé en apoptosi primerenca o tardana. La vitamina D3 dóna lloc a un percentatge més elevat de cèl·lules que han patit apoptosi primerenca i a una disminució de les cèl·lules viables en comparació amb la resta de condicions.

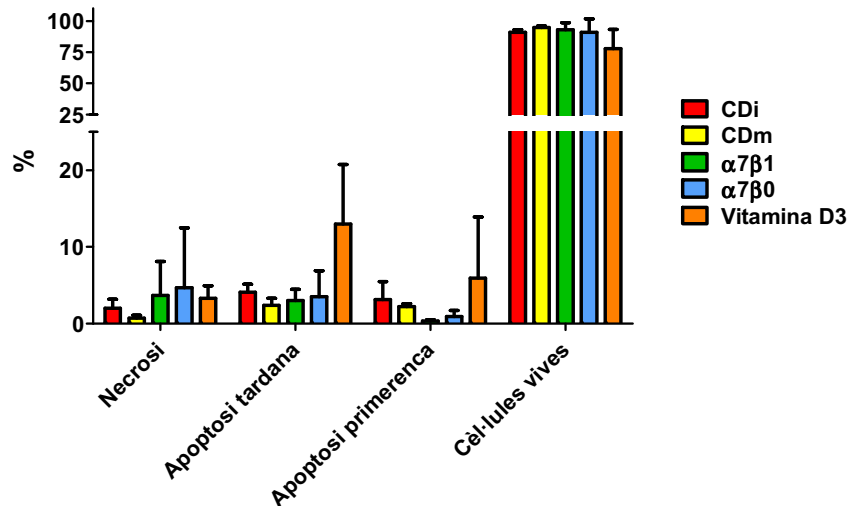


Figura 64. Resultats de l'assaig d'apoptosi realitzat en les CDs tractades amb les isoformes  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$  de la proteïna plasmàtica C4BP. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de percentatge  $\pm$  SD de 8 experiments independents.

## 2. Fenotip

En segon lloc es va determinar el fenotip que caracteritzava aquestes cèl·lules en ser tractades amb les isoformes  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$  de la proteïna plasmàtica C4BP i estimulades a dia 5 amb LPS. Com a control es van incubar les CDs amb vitamina D3 durant tot el cultiu afegint com a estímul maduratiu LPS.

Els resultats de la MFI es mostren com el percentatge de cèl·lules positives per un marcador determinat relativitzat al valor de les CDm, tal i com es pot veure en la Figura 65.

Es pot observar que en tractar les cèl·lules amb  $\alpha 7\beta 0$  i vitamina D3 s'obté disminució dels marcadors CD40, CD83, CD86 i CCR7, respecte les CDm. No obstant, la vitamina D3 dóna una disminució superior. En quant a la resta de marcadors, la vitamina D3 dóna lloc a una disminució de CD1a i HLA-DR, a uns nivells semblants a CDi, mentre que la resta de condicions donen nivells semblants. Aquests resultats concorden amb els que s'havia determinat en experiments anteriors.

En aquest estudi s'ha introduït la determinació de la MFI del marcador CD206 (MRC1, *Macrophage mannose receptor 1*), que és un receptor de manosa o proteïna lectina de tipus C unida a carbohidrats que té per funció reconèixer carbohidrats complexos situats en glicoproteïnes que són part de molts processos biològics diferents. Alguns d'aquests processos inclouen reconeixement cèl·lula-cèl·lula, regeneració de glicoproteïna del sèrum, i neutralització de patògens [229]. La proteïna també actua com a receptor immune de membranes de tipus 1 que mitjança l'endocitosis de glicoproteïnes per macròfags [229]. Tot i això, no es veuen diferències en la seva expressió en les diferents condicions experimentades.



## Resultats

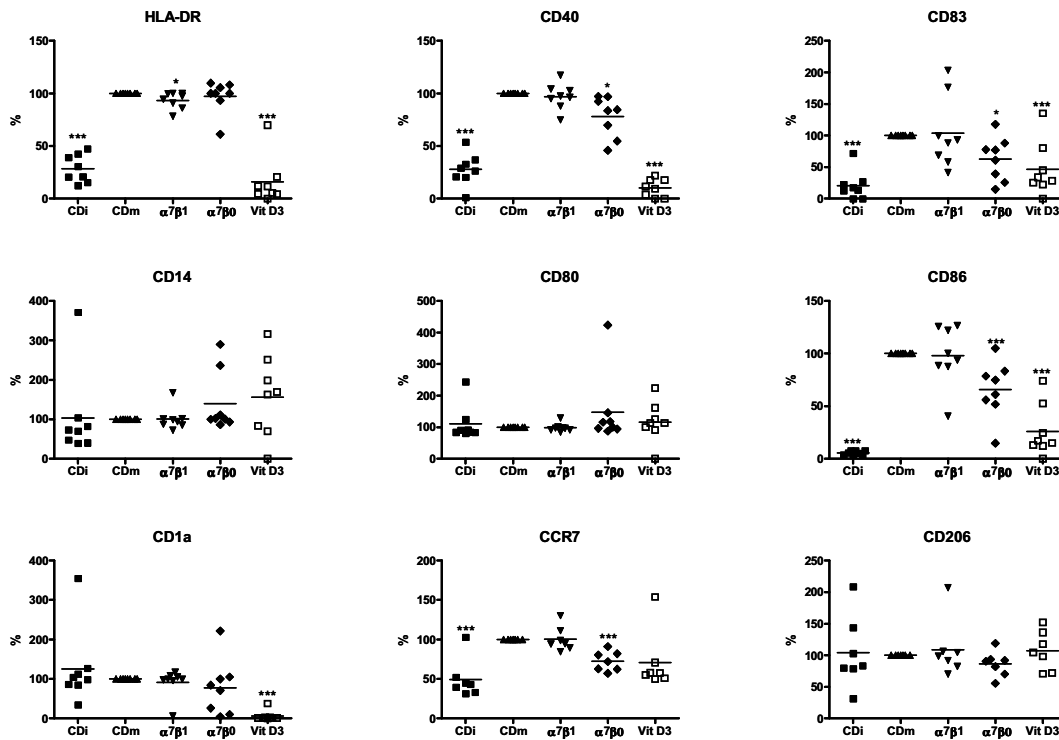


Figura 65. Anàlisi de la MFI dels diferents antigens de superfície analitzats en les poblacions de CDs tractades amb les isoformes  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$  a la concentració de  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  des del primer dia i durant tot el cultiu i a dia 5 afegint l'estímul maduratiu LPS. Com a control positiu s'ha utilitzat cèl·lules cultivades amb vitamina D3 a una concentració  $2.4 \mu\text{M}$ . Els resultats es mostren com la mitja dels valors de MFI relativitzats a  $\text{CDm} \pm \text{SD}$  de 8 experiments independents. \*  $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

### 3. Proliferació de limfòcits T heteròlegs

Després d'examinar les variacions observades en el fenotip de les CDs a causa de la presència de  $\alpha 7\beta 0$ , es va procedir a determinar si la seva capacitat per estimular la proliferació limfocitària heteròloga també es trobava alterada. Per a això es van enfrontar al 7è dia limfòcits heteròlegs marcats amb CFSE amb les CDs tractades amb les isoformes  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$  de la proteïna plasmàtica C4BP durant tot el cultiu i afegint a dia 5 LPS com a estímul maduratiu. Com a control es van cultivar les CDs amb vitamina D3 en les mateixes condicions. Es van realitzar tres relacions dendrítica:limfòcit, 1:40, 1:80 i 1:160 i es van deixar incubant durant 120 h. Passat aquest temps, es van determinar les proliferacions de limfòcits T heteròlegs dels diferents cocultius mitjançant citometria de flux. Les dades obtingudes van ser analitzats amb el programa FlowJo 5.7.2. per obtenir mitjanes estadístiques de les generacions. Es van realitzar 4 rèpliques per cada condició. Com a control positiu es van cultivar els limfòcits T durant 120 hores amb PMA ( $25 \text{ ng}/\text{ml}$ ) i ionomicina ( $250 \text{ ng}/\text{ml}$ ) i com a control negatiu limfòcits T sense marcar.

Els resultats de cada experiment individual es van obtenir calculant el percentatge de la mitja de les 4 rèpliques de cada condició relativitzat al valor de les CDm, ja que les CDs en estat madur tenen la capacitat d'estimular l'auto-proliferació dels limfòcits T. Finalment es va realitzar la mitja dels percentatges dels diferents experiments realitzats.

En la Figura 66 es mostren limfòcits marcats amb CFSE que han proliferat a les 120 hores del cocultiu. Com es pot observar, aquesta propietat depenent en part de l'expressió de molècules de coestimulació, s'inhibeix en tractar les CDs amb la proteïna plasmàtica  $\alpha 7\beta 0$ , a les tres relacions experimentades de cocultiu, així com també s'inhibeix tant l'expressió de molècules de coestimulació, com de molècules d'hiscompatibilitat, implicades en la presentació antigènica. Aquests nivells de proliferació són molt semblants als obtinguts en els cocultius amb CDs immadures.

La vitamina D3 també dóna lloc a una disminució de la proliferació, mentre que la màxima resposta s'observa quan s'utilitza CDs madurades amb LPS i CDs tractades amb la proteïna plasmàtica  $\alpha 7\beta 1$ .

Per tant l'estímul  $\alpha 7\beta 0$  podria propietats "tolerogèniques" a les CDs.

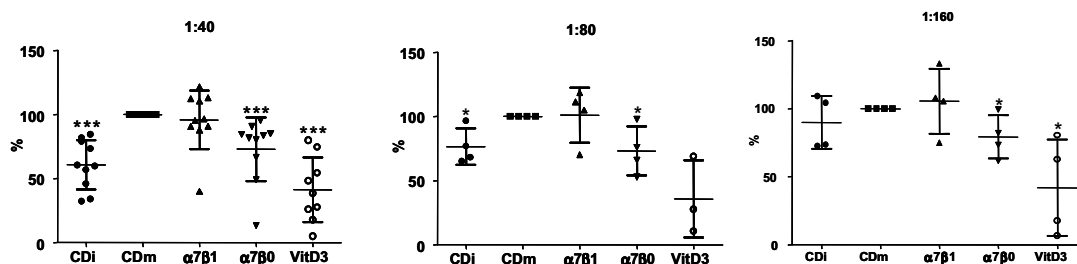


Figura 66. Resultats de l'assaig de proliferació de limfòcits T autòlegs en cocultius de CDs tractades amb les isoformes  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$  de la proteïna plasmàtica C4BP (2  $\mu\text{g/ml}$ ) durant tot el cultiu i afegint a dia 5 l'estímul maduratiu LPS (2  $\mu\text{g/ml}$ ) amb limfòcits T autòlegs a tres relacions de dendrítica:limfòcit T diferents, 1:40, 1:80 i 1:160. Com a control s'han utilitzat CDs tractades amb vitamina D3 a una concentració de 2.4  $\mu\text{M}$ . Els resultats es mostren com la mitja dels valors de percentatge relativitzats a CDm  $\pm$  SD de 8 experiments independents en el cas de la relació 1:40 i de 4 experiments independents en el cas de les relacions 1:80 i 1:160. \* P < 0.05; \*\*\* P < 0.001.

El més lògic seria esperar que la resposta descendís proporcionalment a les dilucions que es produeixen en el nombre de CDs presents. Això no és així a causa de l'extraordinària potència estimuladora i presentadora de les CDs. S'han realitzat estimacions que afirmen que una sola dendrítica és capaç d'activar entre 200 i 3000 limfòcits. Així, en baixar el nombre de CDs presents en el cultiu, aquestes poden suplir aquesta falta incrementant la seva potència estimuladora amb la qual cosa, la resposta immune es produeix amb una intensitat semblant.

## Resultats

Això és cert sobretot per a les relacions 1:10, 1:20 i 1:40 en les quals les disminucions en la proliferació són febles. Quan s'analitzen les relacions més baixes, 1:80 i 1:160, s'observen diferències significatives entre els controls positius (CDm i cèl·lules tractades amb  $\alpha 7\beta 1$ ) i les CDs tractades amb la isoforma  $\alpha 7\beta 0$ .

### ***5.2.3. EFECTE DELS MUTANTS DE LA CADENA $\alpha$ DE LA PROTEÏNA C4BP ( $\alpha 7\beta 0$ ) EN LA MADURACIÓ I DIFERENCIACIÓ DE LES CÈL·LULES DENDRÍTIQUES***

Posteriorment es va realitzar l'estudi del possible efecte de 8 mutants recombinants de la cadena  $\alpha$  de la proteïna C4BP, tots ells cedits per la Dra. Anna Blom, als quals els mancava els dominis CCPs de forma individual ( $\Delta$ CCP), en la diferenciació i maduració de CDs provinents de monòcits CD14<sup>+</sup> de sang perifèrica.

Cada CCP va ser individualment seleccionat resultant en 8 variants. Totes les variants van ser expressades en línies cel·lulars estables i purificades del medi de cultiu per cromatografia d'afinitat emprant un dels dos anticossos monoclonals: mAb 104 dirigit contra CCP1 o mAb 67 reconeixent CCP4 de la cadena  $\alpha$  [217, 230]. En general les mutacions no afecten el reconeixement de C4BP per anticossos monoclonals, suggerint que la conformació total de les variants de C4BP és correcta [230].

#### **5.2.3.1. Efecte en la diferenciació i maduració**

En aquest estudi es va voler determinar quin dels 8 dominis de la cadena  $\alpha$  de la proteïna C4BP era el responsable de l'efecte de  $\alpha 7\beta 0$  i  $\alpha 6\beta 0$  tant en la diferenciació com en la maduració de les CDs. Per realitzar aquest assaig es van testar un total de 8 mutants recombinants als quals els manca de forma individual un dels dominis CCP. Es van sembrar monòcits purificats per adherència al plàstic de la placa de cultiu en medi RPMI + 10% de FBS i suplementat amb IL-4 i GM-CSF a les concentracions descrites en l'apartat 4.6.2.4 de Materials i Mètodes i es van afegir els diferents mutants recombinants de forma individual ( $\Delta$ CCP1-8) a l concentració de 2  $\mu$ g/ml des del primer dia de cultiu. Un cop diferenciats a CDs, es van afegir l'estímul de maduració LPS a la concentració de 5  $\mu$ g/ml o la combinació de cada mutant de la cadena  $\alpha$  de la proteïna C4BP amb LPS a les mateixes concentracions descrites amb anterioritat. Per confirmar si aquests mutants actuaven sobre la diferenciació i la maduració de les CDs, es va determinar l'expressió dels marcadors superficials per citometria de flux a dia 7 del cultiu, tant de les CDs madures (tractades amb LPS), com de les CDs

immadures no estimulades i de les CDs estimulades amb les diferents condicions esmentades (Figura 67). Els resultats obtinguts es mostren en la Figura 68.

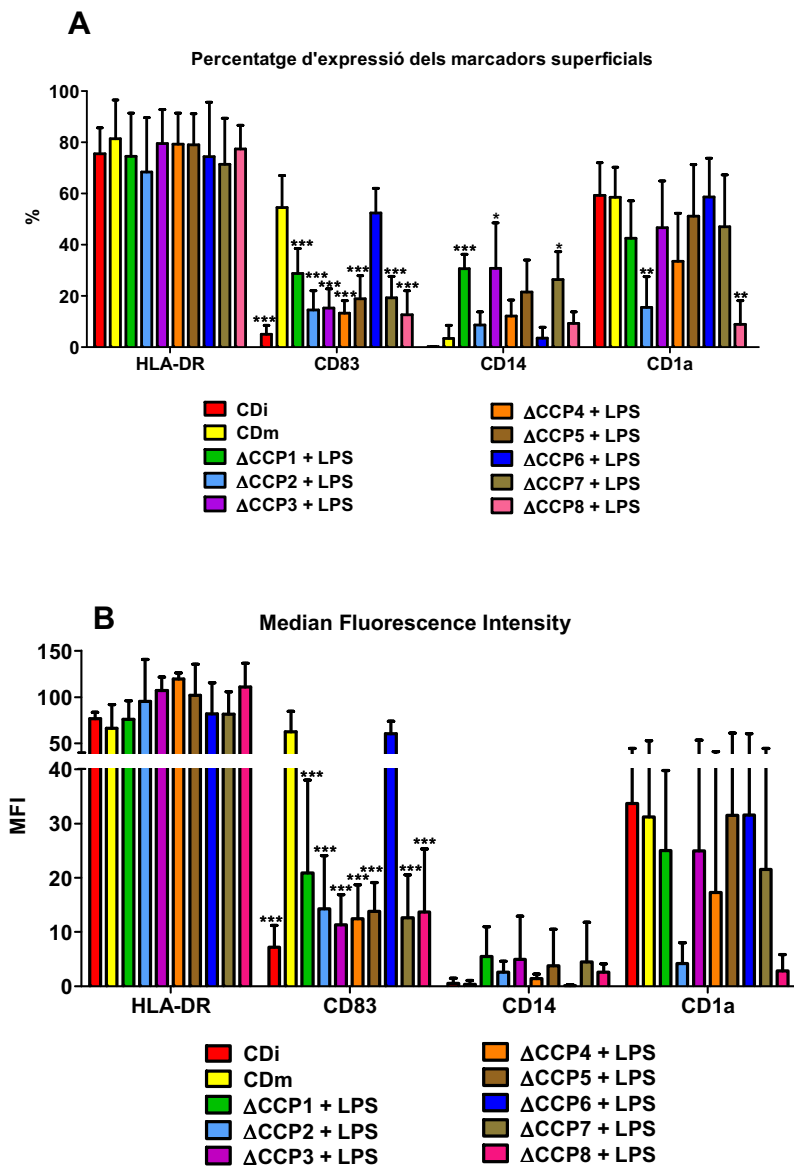
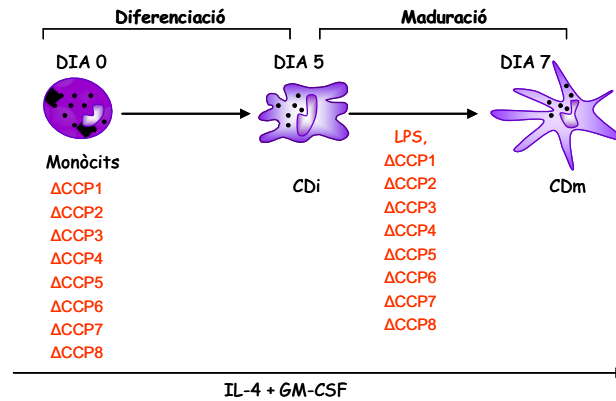


Figura 68. Anàlisi de l'expressió dels diferents antígens de superfície analitzats en les poblacions de CDs analitzades. Percentatge d'expressió (A) i MFI (B) dels marcadors superficials en tractar les CDs amb els diferents mutants de la cadena  $\alpha$  de la proteïna C4BP a la concentració de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  des del primer dia i durant tot el cultiu i a dia 5 afegint l'estímul maduratiu LPS. Els resultats es mostren com la mitja  $\pm$  SD de 4 experiments independents en el cas dels marcadors HLA-DR, CD86 i CD14, mentre que en el cas de CD83 els resultats es mostren com la mitja  $\pm$  SD de 6 experiments independents. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

Es van determinar els marcadors superficials HLA-DR, CD83, CD14 i CD1a tant a nivell de percentatge (A) com de MFI (B). Es va poder observar una disminució de l'expressió

## Resultats

del marcador de maduració CD83 del voltant del 80% respecte CDM, en tractar les CDs amb tots els mutants recombinants excepte el mutant  $\Delta$ CCP6 que va donar uns nivells tant a nivell de percentatge com de MFI semblants a CDM. En quant a la resta de marcadors, no es veuen diferències significatives en l'expressió de HLA-DR entre les diferents condicions, i dels resultats obtinguts per CD14 i CD1a no es pot treure cap conclusió ja que no s'observa un patró determinat.

En la Figura 69 veiem els histogrames d'expressió del marcador superficial CD83, de les CDs tractades amb els diferents mutants recombinants de C4BP d'un experiment representatiu.

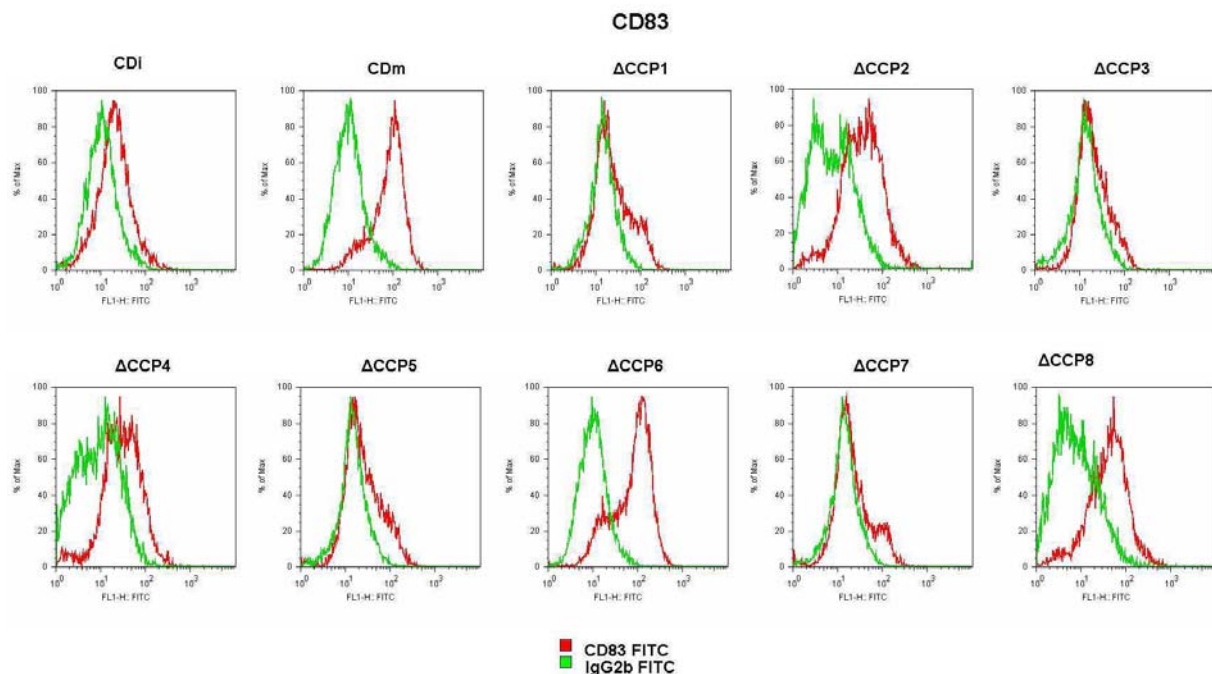


Figura 69. Expressió de la MFI del marcador CD83 associada a cada població representada en histogrames en les poblacions CDI i tractades amb els mutants de la cadena  $\alpha$  de la proteïna C4BP a la concentració de 2  $\mu$ g/ml al 7è dia de cultiu cel·lular respecte els seus isotips controls. Figura representativa de 6 experiments independents.

Per tal de comprovar l'efecte del mutant recombinant  $\Delta$ CCP6 sobre la diferenciació i maduració de les CDs, es va utilitzar un estímul maduratiu diferent al LPS, es va utilitzar el còctel Ribomunyl que conté també INF- $\gamma$  i rHusCD40L/TRAP, el qual està descrit que és un fort estimulador de la maduració de les CDs. El Ribomunyl és un extracte multibacterià que és lligand dels receptors de tipus *Toll-like* [231]. Mentre que, com està descrit en la introducció, la

interacció de les CDs amb els limfòcits T via CD40L, i per la secreció de IFN- $\gamma$  s'indueix una forta maduració de les CDs.

Els resultats es mostren en la Figura 70.

Es va determinar el marcador superficial CD83 tant a nivell de percentatge (A) com de MFI (B). Es va poder observar una disminució de l'expressió del marcador de maduració CD83 en tractar les CDs amb el mutant recombinant  $\Delta$ CCP8, mentre que  $\Delta$ CCP6 que va donar uns nivells semblants a mCDs tant a nivell de percentatge com de MFI.

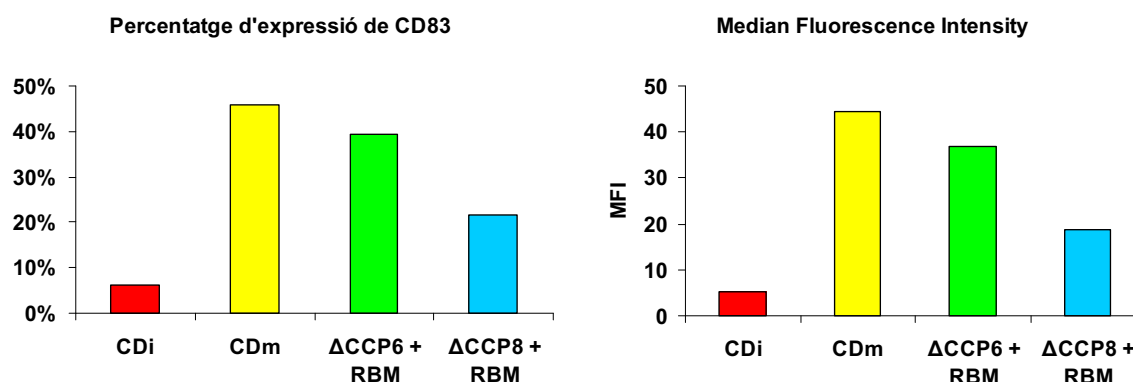


Figura 70. Anàlisi de l'expressió de l'antigen de superfície CD83 analitzat en les poblacions de CDs analitzades. Percentatge d'expressió (A) i MFI (B) del marcador superficial CD83 en tractar les CDs amb els mutants  $\Delta$ CCP8 i  $\Delta$ CCP6 de la cadena  $\alpha$  de la proteïna C4BP a la concentració de 2  $\mu$ g/ml des del primer dia i durant tot el cultiu i a dia 5 afegint el cóctel maduratiu Ribomunyl. Els resultats es mostren com un únic experiment representatiu.

### 5.2.3.2. Perfil transcripcional

Es va avaluar per pRT-PCR semiquantitativa a temps real l'expressió del mRNA del gen IDO en cèl·lules tractades amb els mutants recombinants  $\Delta$ CCP1-8 des del primer dia i durant tot el cultiu a la concentració de 2  $\mu$ g/ml i a dia 5 afegint l'estímul maduratiu LPS (5  $\mu$ g/ml), en les cèl·lules purificades per adherència al plàstic. L'expressió del gen IDO corresponent a la mostra tractada amb el mutant  $\Delta$ CCP4 no es va poder determinar.

A dia 7, es van recollir les cèl·lules i es va procedir a l'extracció de RNA total, el qual es va quantificar mitjançant el Nanodrop® i es va sintetitzar el cDNA a partir de 500 ng de RNA total (descriu en l'apartat 4.7.1. de Materials i Mètodes).

Posteriorment es va procedir a la quantificació relativa del transcrit IDO humà, respecte el gen de referència de la ciclofilina, mitjançant PCR a temps real utilitzant el fluoròfor SyBR Green I i el LightCycler® tal i com es descriu en l'apartat 4.7. de Materials i mètodes. Per confirmar la precisió i reproductibilitat de la PCR a temps real, es van realitzar tres rèpliques de la PCR per a cada condició

## Resultats

En la següent gràfica (Figura 71) es mostra els ratios gen diana/Ciclofilina corresponents a l'expressió del gen IDO en les cèl·lules purificades per adherència al plàstic i tractades amb els diferents mutants de la cadena  $\alpha$  de C4BP i les CDs en estat immadur respecte les cèl·lules madures.

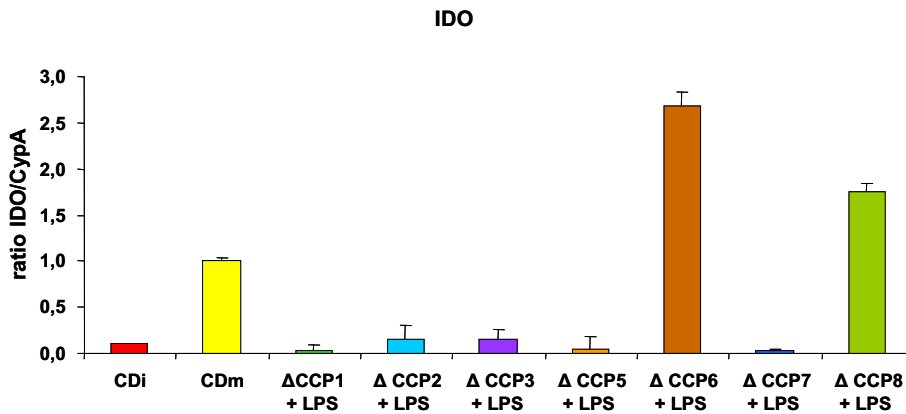


Figura 71. Quantificació de l'expressió del gen IDO en CDs purificades per adherència al plàstic, per RT-PCR a temps real amb el LightCycler®. Els resultats es mostren com la mitja  $\pm$  SD de 3 rèpliques del mateix experiment.

S'observa que a nivell de RNA hi ha una disminució de l'expressió d'IDO en tots els mutants recombinants a excepció dels mutants  $\Delta$ CCP6 i  $\Delta$ CCP8 que donen uns nivells elevats més alts fins i tot que les mCDs.

### 5.2.3.3. Mesura de citoquines en el medi extracel·lular

A partir de CDs, purificades per adherència al plàstic, diferenciades i cultivades amb els mutants recombinants  $\Delta$ CCP6 i  $\Delta$ CCP8 des del primer dia i durant tot el cultiu a la concentració de 2  $\mu$ g/ml i a dia 5 afegint l'estímul maduratiu LPS (5  $\mu$ g/ml) durant 48 hores, es recol·lecta el sobrenedant del cultiu, en el qual es va mesurar la secreció de IL-12p70, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ . Com indica la Figura 72 s'observa una disminució de IL-12, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  en les cèl·lules tractades amb el mutant  $\Delta$ CCP8 comparat amb CDm (aquest mutant es comporta com  $\alpha$ 7 $\beta$ 0).

Mentre que  $\Delta$ CCP6 es comporta semblant a CDm,  $\Delta$ CCP8 es comporta més semblant a CDi. Aquests resultats indiquen que les CDs que han estat inhibides en el seu procés de diferenciació i maduració a causa del tractament amb el mutant  $\Delta$ CCP8, romanen en aquest estat, ja que donen nivells molt semblants als obtinguts en l'ELISA anterior on s'analitzen les isoformes de la proteïna C4BP.

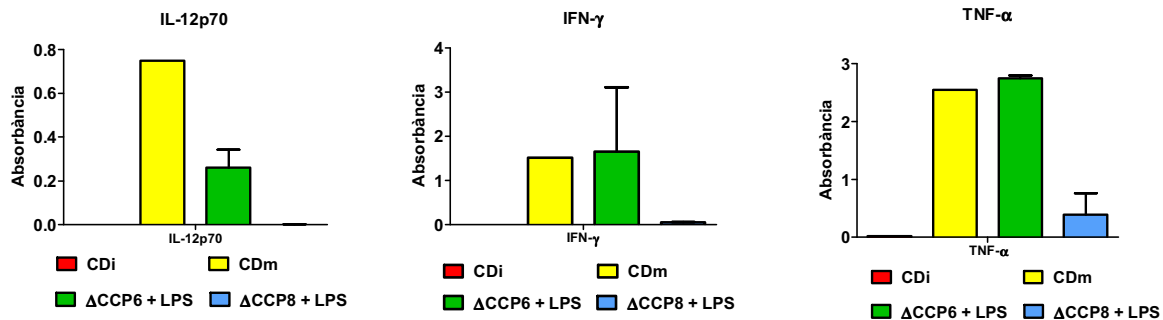


Figura 72. Secreció de citoquines per CDs tractades amb els mutants  $\Delta$ CCP6 i  $\Delta$ CCP8 de la cadena  $\alpha$  de la proteïna C4BP. La quantificació es va realitzar per ELISA de captura utilitzant anticossos específics per a la captura i el revelat. Les dades són representades com el promig  $\pm$  SD de 2 experiments independents en el cas dels mutants i d'un sol experiment representatiu per les mostres CDi i CDm.

#### 5.2.3.4. Microscopia d'escombratge

Es va fer un seguiment visual de les CDs tractades amb els mutants  $\Delta$ CCP4,  $\Delta$ CCP6 i  $\Delta$ CCP8 a la concentració de 2  $\mu$ g/ml durant tot el procés de cultiu i a dia 5 afegint LPS (5  $\mu$ g/ml).

Es va observar que la morfologia del mutant  $\Delta$ CCP6 era semblant a la de les CDm, ja que es podien veure cèl·lules més allargades i amb llargues dendrites. Mentre que amb els mutants  $\Delta$ CCP4 i  $\Delta$ CCP8 es van poder observar cèl·lules més rodones i amb poques prolongacions, donant lloc a una morfologia entremig de CDi i CDm, tal i com es pot veure a la Figura 73.

Per tant, el tractament de les CDs amb els mutants recombinants  $\Delta$ CCP4 i  $\Delta$ CCP8 de la cadena  $\alpha$  de la proteïna C4BP permeten l'obtenció d'una morfologia intermitja entre les CDi i les CDm, de manera que sembla que es queden en un estat semimadur.



## Resultats

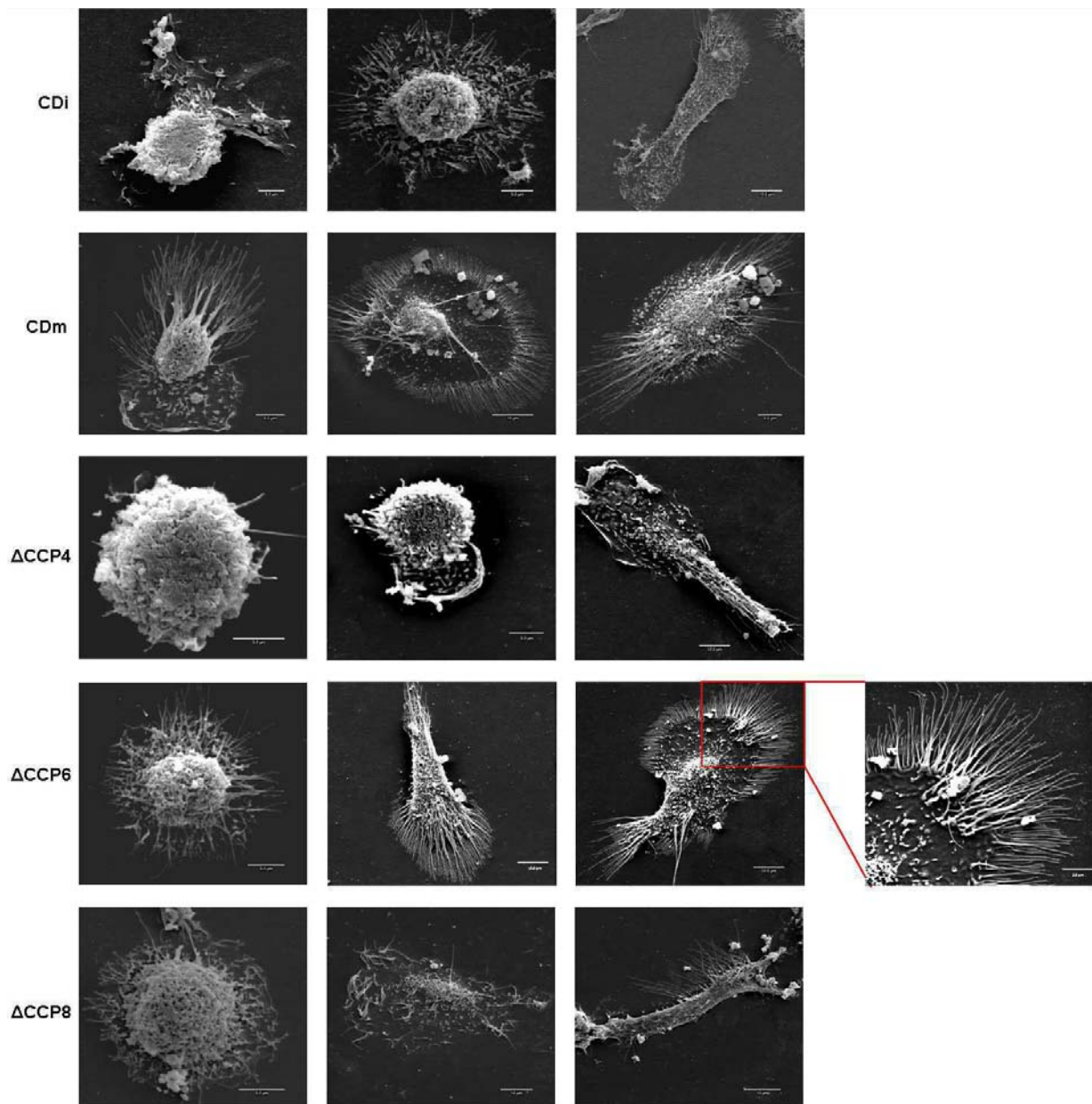


Figura 73. S'observa la morfologia de les CDs en els diferents estats de maduresa i en ser tractades amb els mutants mutants  $\Delta$ CCP4,  $\Delta$ CCP6 i  $\Delta$ CCP8 de la cadena  $\alpha$  de la proteïna C4BP. CDi, CDs immadures; CDm, CDs madures;  $\Delta$ CCP4,  $\Delta$ CCP6 i  $\Delta$ CCP8; mutants recombinants de la cadena  $\alpha$  de la proteïna C4BP.

## 5.2.4. EFECTE DEL FACTOR H EN LA MADURACIÓ I DIFERENCIACIÓ DE LES CÈL·LULES DENDRÍTIQUES

Es va voler determinar si l'altre major regulador del Sistema del Complement en fase fluida, el Factor H (FH), afectava les etapes de diferenciació i/o maduració de les CD.

Primer de tot es va realitzar l'estudi del possible efecte de la proteïna plasmàtica humana FH en la diferenciació i/o maduració de CDs provinents de monòcits CD14<sup>+</sup> de sang perifèrica.

### 5.2.4.1. Efecte en la diferenciació

En aquest estudi es va voler determinar si la proteïna FH podia actuar en la diferenciació dels monòcits a CDs immadures. Es van sembrar monòcits purificats per adherència al plàstic de la placa de cultiu en medi RPMI + 10% de FBS i suplementat amb IL-4 i GM-CSF a les concentracions descrites en l'apartat 4.6.3.1 de Materials i Mètodes i es va afegir la proteïna FH a les concentracions 2 µg/ml, 5 µg/ml i 10 µg/ml des del primer dia de cultiu.

Per confirmar si el FH actuava sobre la diferenciació de les CDs, es va determinar l'expressió dels marcadors superficials per citometria de flux de les CDs immadures i de les CDs estimulades amb les diferents condicions esmentades a dia 5 del cultiu (Figura 74).

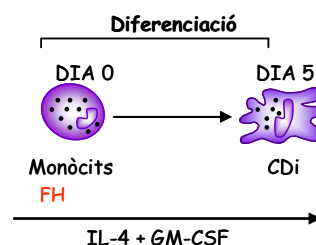


Figura 74. Procés dut a terme per obtenir iCDs.

Els resultats obtinguts es mostren en la Figura 75.

Es van determinar els marcadors superficials HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86, CD14 i CD1a tant a nivell de percentatge (A) com de MFI (B).

A nivell de percentatge es va trobar una lleugera disminució del percentatge de HLA-DR i de CD40 en tractar les CDs amb el FH a les tres concentracions experimentades respecte al control dels monòcits sembrats sense estimular amb la proteïna FH. S'observa una disminució elevada i dosi dependent en el marcador CD86. A més a més, es dona una expressió nul·la de

## Resultats

CD1a en tractar les cèl·lules amb FH. La resta de marcadors no mostren diferències significatives ni a nivell de percentatge.

A nivell de fluorescència, tot i que hi ha una expressió elevada de HLA-DR i CD40, no es veuen diferències significatives. Tampoc es veuen en els marcadors CD80 i CD14, tot i que la seva expressió és molt disminuïda. En els marcadors CD83 i CD14 no s'observa expressió en cap condició experimentada. Finalment veiem una disminució important en els marcadors CD86 i CD1a, en comparació amb l'expressió en les CDi.

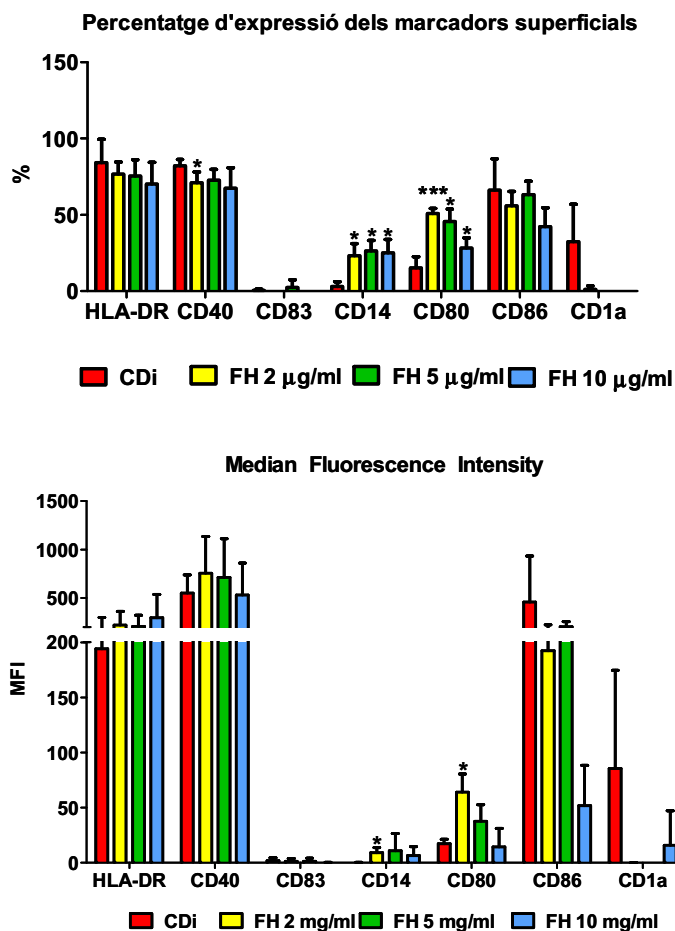


Figura 75. Anàlisi de l'expressió dels diferents antígens de superfície en les poblacions de CDs analitzades. Percentatge d'expressió (A) dels marcadors superficials i MFI (B) dels marcadors superficials en tractar les CDs amb el FH a les concentracions de 2, 5 i 10 µg/ml. Els resultats es mostren com la mitja dels valors del % i la MFI  $\pm$  SD de 4 experiments independents.

\* P < 0.05; \*\*\* P < 0.001.

En la Figura 76 veiem els histogrames d'expressió dels marcadors superficials CD86 i CD1a, de les CDs tractades amb el FH d'un experiment representatiu.

També es va analitzar amb Iodur de propidi per citometria de flux la viabilitat cel·lular de les CDs durant el procés de diferenciació de monòcit a CD en tractar les CDs amb les diferents concentracions de FH. Els resultats es mostren en la Figura 77.

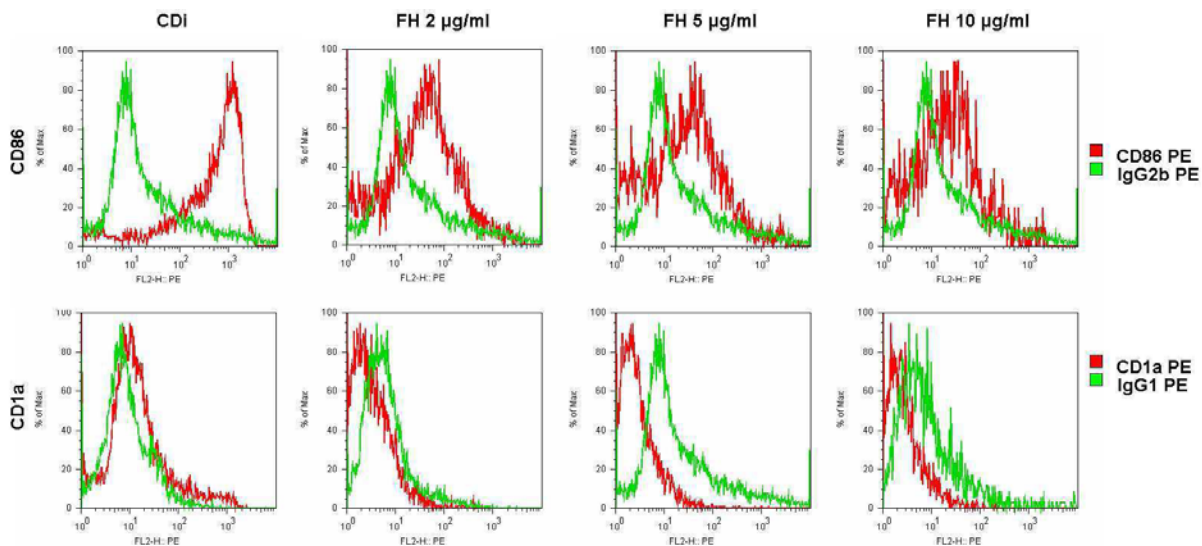


Figura 76. Expressió CD86 i CD1a representada en histogrames en les poblacions CDI i tractades amb FH a les concentracions de 2, 5 i 10 µg/ml al 5è dia de cultiu cel·lular respecte els seus isotips controls. Es van marcar les CDs per determinar l'expressió d'aquestes molècules per citometria de flux. La MFI associada a cada població va ser obtinguda per a cada una de les molècules de superfície. Figura representativa de 2 experiments independents.

S'observa que el tractament de les cèl·lules amb FH afecta a la viabilitat cel·lular de forma dosi dependent ja que el percentatge de cèl·lules vives disminueix en augmentar la dosi de FH.

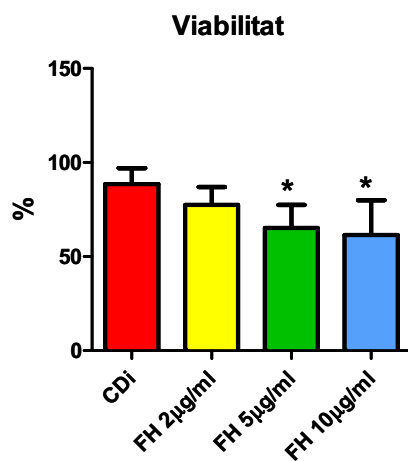


Figura 77. Viabilitat de les CDi i les CDs tractades amb el FH. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de % ± SD de 2 experiments independents.  
\* P < 0.05.

#### 5.2.4.2. Efecte en la maduració

En aquest estudi es va voler determinar si el FH podia actuar en la maduració de les CDs. Es van sembrar monòcits purificats per adherència al plàstic de la placa de cultiu en medi RPMI + 10% de FBS i suplementat amb IL-4 i GM-CSF a les concentracions descrites en l'apartat 4.6.3.2 de Material i Mètodes i es va afegir la proteïna plasmàtica Factor H a les concentracions 2 µg/ml, 5 µg/ml i 10 µg/ml sola o combinada amb LPS (5 µg/ml) al 5è dia de cultiu.

## Resultats

Per confirmar la combinació FH + LPS actuava sobre la maduració de les CDs, es va determinar l'expressió dels marcadors superficials per citometria de flux a dia 7 del cultiu de les CDs madures (tractades amb LPS), de les CDs immadures no estimulades i de les CDs estimulades amb les diferents condicions esmentades (Figura 78).

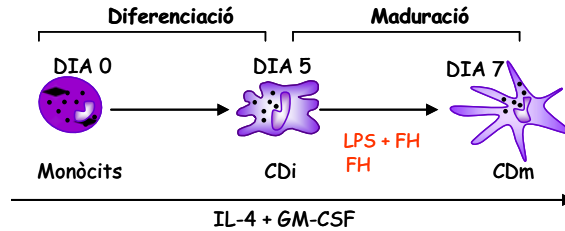


Figura 78. Procés dut a terme per obtenir CDm.

Els resultats obtinguts es mostren en la Figura 79.

En el cas del tractament amb el FH es van determinar els marcadors superficials HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86, CD14 i CD1a tant a nivell de percentatge (A) com de MFI (B). En l'assaig realitzat combinant FH amb LPS, a nivell de percentatge s'observa una tendència a disminuir l'expressió dels marcadors HLA-DR, CD83 i CD1a en tractar les cèl·lules amb la combinació FH + LPS, comparades amb CDm, i sembla que sigui dosi dependent. En la resta de marcadors no es veuen diferències significatives comparades amb CDm. A nivell de fluorescència els nivells de MFI dels marcadors determinats en les diferents condicions experimentades són molt semblants a CDm. S'observa una tendència a disminuir l'expressió de CD83 i CD1a dosi dependent en tractar les cèl·lules amb la combinació FH + LPS. Per tant, sembla que el FH combinat amb LPS a dia 5 que no té massa efecte en la maduració de les CDs.

En l'assaig realitzat sense combinar FH i LPS, a nivell de percentatge s'observa una tendència a augmentar l'expressió dels marcadors CD83 i CD80 en tractar les cèl·lules amb el FH, comparades amb CDm. En la resta de marcadors no es veuen diferències significatives comparades amb CDm. A nivell de fluorescència els nivells de MFI de CD80 augmenten en tractar les CDs amb FH, mentre que disminueix la MFI de CD1a, comparat amb CDm. En la resta de marcadors no es veuen diferències significatives comparades amb CDm. Per tant, sembla que el FH sol afegit a dia 5 podria estimular la maduració de les CDs. Aquests són els resultats de dos experiments preliminars, cal augmentar el nombre de rèpliques.

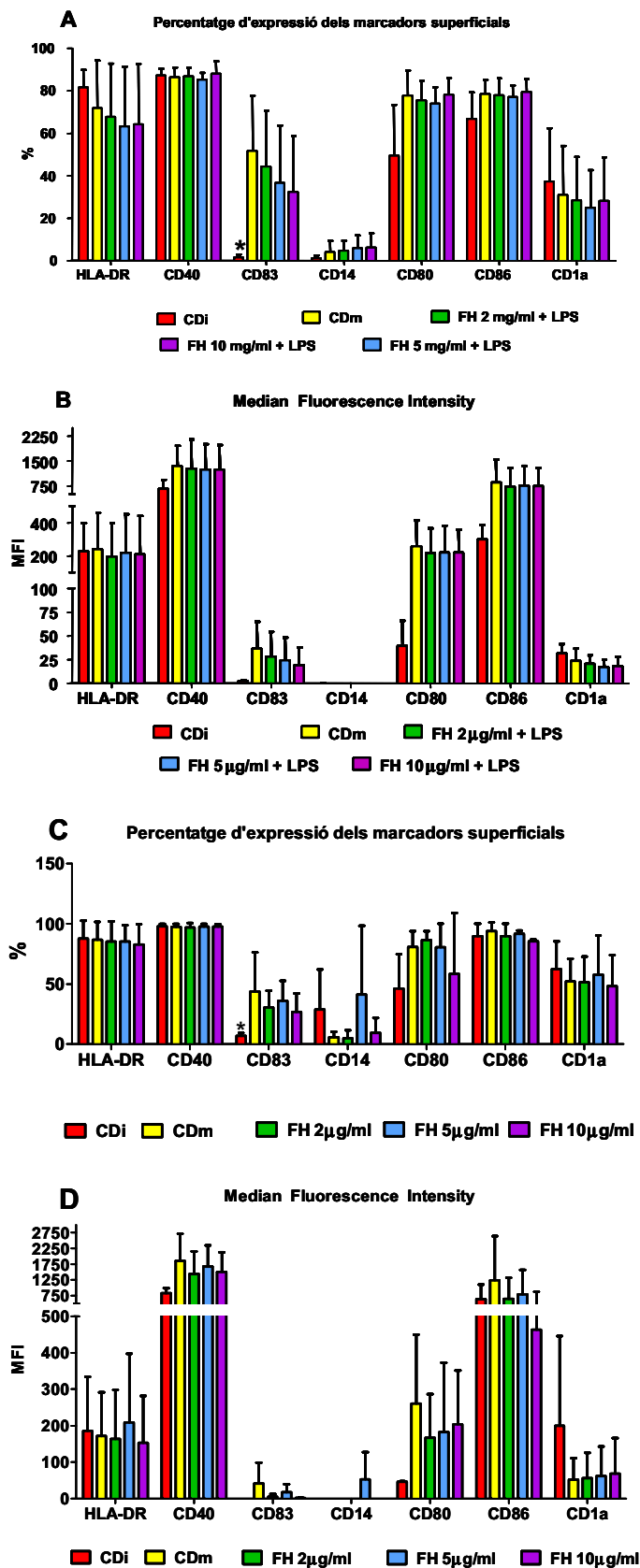


Figura 79. Anàlisi de l'expressió dels diferents antigens de superfície en les poblacions de CDs analitzades. Percentatge d'expressió (A) dels marcadors superficials i MFI (B) dels marcadors superficials en tractar en tractar les CDs a dia 5 amb FH a les concentracions de 2, 5 i 10 µg/ml i combinat amb LPS. Percentatge d'expressió (C) dels marcadors superficials i MFI (D) dels marcadors superficials en tractar en tractar les CDs a dia 5 amb FH a les concentracions de 2, 5 i 10 µg/ml. Els resultats dels assajos de maduració que combinen FH + LPS es mostren com la mitja dels valors de % i MFI ± SD de 4 experiments independents, mentre que els resultats dels assajos de maduració amb FH sol es mostren com la mitja dels valors de % i MFI ± SD de 2 experiments independents.

\* P < 0.05.

## Resultats

També es va analitzar amb Iodur de propidi per citometria de flux la viabilitat cel·lular de les CDs durant el procés de maduració de les CDs en tractar les cèl·lules amb FH sol o combinat amb LPS. Els resultats es mostren en la Figura 80.

S'observa que el tractament de les cèl·lules amb la combinació FH + LPS disminueix lleugerament el percentatge de cèl·lules vives i sembla que aquest efecte sigui dosi dependent.

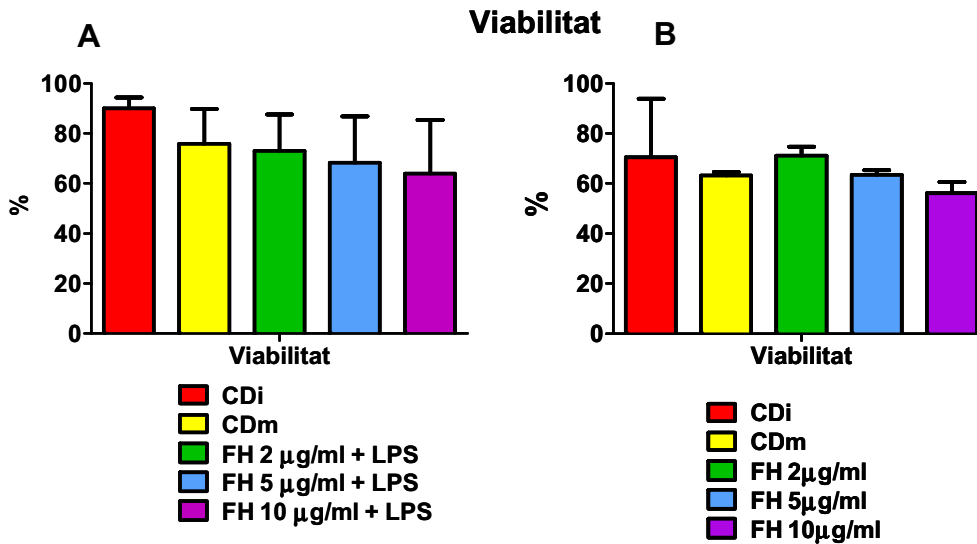


Figura 80. Viabilitat de les CDi i les CDs tractades amb FH combinat amb LPS (A) o sol (B) a dia 5. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de  $\% \pm SD$  de 4 experiments independents en el cas dels assajos on es combina el FH amb LPS i de 2 experiments independents en el cas dels assajos amb FH sol.

### 5.2.4.3. Efecte en la diferenciació i maduració

En aquest estudi es va voler determinar si el Factor H podia actuar tant en la diferenciació com en la maduració de les CDs. Es van sembrar monòcits purificats per adherència al plàstic de la placa de cultiu en medi RPMI + 10% de FBS i suplementat amb IL-4 i GM-CSF a les concentracions descrites en l'apartat 4.6.3.3. de Materials i Mètodes i es va afegir la proteïna plasmàtica Factor H a les concentracions 2 µg/ml, 5 µg/ml i 10 µg/ml des del primer dia de cultiu. Un cop diferenciats a CDs, es van afegir l'estímul de maduració LPS a la concentració de 5 µg/ml o la combinació de Factor H amb LPS a les mateixes concentracions descrites amb anterioritat.

Per confirmar si actuava sobre la diferenciació i la maduració de les CDs, es va determinar l'expressió dels marcadors superficials per citometria de flux tant de les CDs madures (tractades amb LPS), com de les CDs immadures no estimulades i de les CDs estimulades amb les diferents condicions esmentades a dia 7 del cultiu (Figura 81).

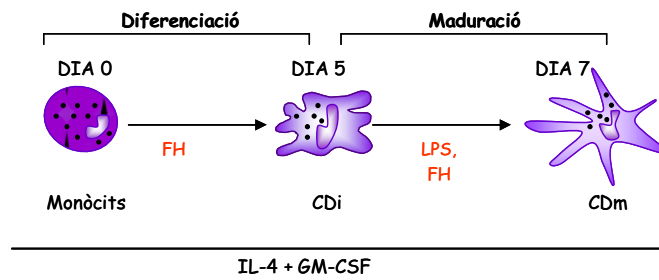


Figura 81. Procés dut a terme per obtenir CDs.

Els resultats obtinguts es mostren en la Figura 82.

En el cas del tractament amb FH es van determinar els marcadors superficials HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86, CD14 i CD1a tant a nivell de percentatge (A) com de MFI (B). Tant a nivell de percentatge com de MFI es va poder observar una disminució de l'expressió dels marcadors CD83, CD86, CD80 i CD1a de forma dosi dependent en les cèl·lules tractades amb el FH a les tres concentracions experimentades.

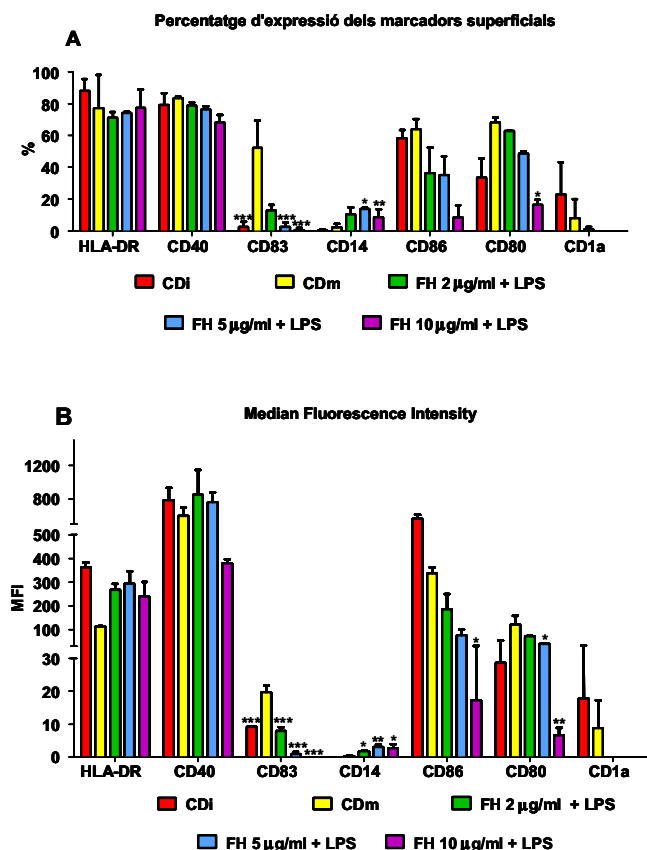


Figura 82. Anàlisi de l'expressió dels diferents antigens de superfície en les poblacions de CDs analitzades. Percentatge d'expressió (A) i MFI (B) dels marcadors superficials en tractar les CDs amb Factor H a les concentracions de 2, 5 i 10 µg/ml des del primer dia i durant tot el cultiu i a dia 5 afegint l'estímul maduratiu LPS. Els resultats es mostren com la mitja ± SD de 5 experiments.

\* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001.

També es va analitzar amb Iodur de propidi per citometria de flux la viabilitat cel·lular de les CDs durant el procés de diferenciació i maduració de les CDs en tractar les cèl·lules amb Factor H i a dia 5 combinant el tractament amb l'estímul de maduració LPS. Els resultats es mostren en la Figura 83.



## Resultats

S'observa que amb el tractament de les cèl·lules amb Factor H obtenim viabilitats del voltant del 70 % en tots els casos.

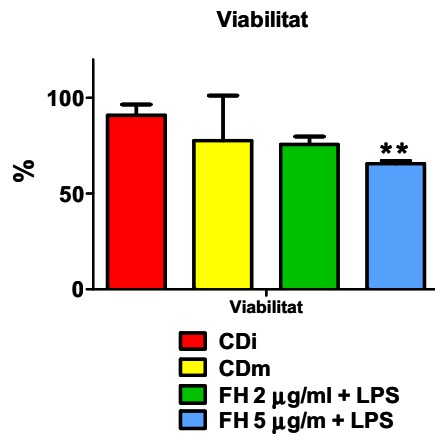


Figura 83. Viabilitat de les CDi i les CDs tractades amb el Factor H. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de %  $\pm$  SD de 4 experiments independents.

\*\* P < 0.01.

En la Figura 84 veiem els histogrames d'expressió dels marcadors superficials CD83, CD86, CD80 i CD1a, de les CDs tractades amb el FH d'un experiment representatiu.

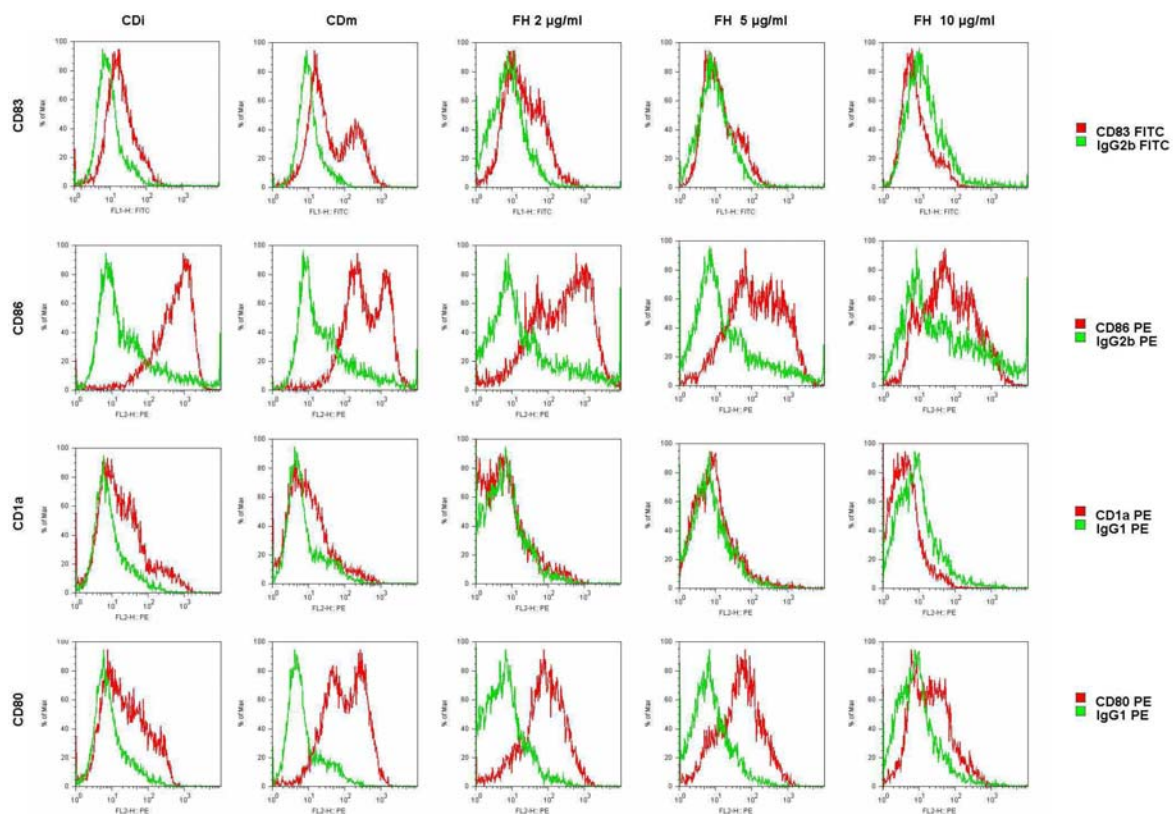


Figura 84. Expressió de CD83, CD86, CD80 i CD1a, representada en histogrames en les poblacions CDi i tractades amb FH a les concentracions de 2, 5 i 10 µg/ml al 7è dia de cultiu cel·lular respecte els seus isotips controls. Les CDs van ser marcades per determinar l'expressió d'aquestes molècules per citometria de flux. La MFI associada a cada població va ser obtinguda per a cada una de les molècules de superfície. Figura representativa de 5 experiments independents.

#### 5.2.4.4. Perfil transcripcional

Es va avaluar per pRT-PCR semiquantitativa a temps real l'expressió dels mRNA dels gens CCR7,IDO, BIC-1 i SOD-2 en CDs purificades per adherència al plàstic i tractades amb la proteïna plasmàtica Factor H des del primer dia i durant tot el cultiu a la concentració de 10 µg/ml i a dia 5 afegint l'estímul maduratiu LPS.

A dia 7, es van recollir les cèl·lules i es va procedir a l'extracció de RNA total, el qual es va quantificar mitjançant el Nanodrop® i es va sintetitzar el cDNA a partir de 500 ng de RNA total (descriu en l'apartat 4.7.1. de Materials i Mètodes).

Posteriorment es va procedir a la quantificació relativa dels trànscrius de CCR7, IDO, BIC-1 i SOD-2 humans mitjançant PCR a temps real utilitzant el fluoròfor SyBR Green I i el LightCycler®.

Totes les rèpliques van amplificar un producte únic. Les eficiències de la PCR tant pels gens estudiats com per la ciclofilina són  $E_{IDO}=1,62$ ,  $E_{BIC}=1,72$ ,  $E_{CCR7}=1,65$ ,  $E_{SOD-2}=1,89$  i  $E_{ciclofilina}=1,96$  i havien estat calculades en estudis anteriors a partir de dil·lucions seriadades de l'amplificació d'aquests gens segons l'equació  $E=10^{(-1/pendent)}$ .

Les dades obtingudes es van normalitzar respecte l'expressió de la ciclofilina (gen de referència), calculant el ratio d'expressió del gen estudiat/Ciclofilina. En aquesta anàlisi semiquantitativa, l'expressió del gen diana de cada mostra tractada s'expressa com a un valor relatiu a la mostra control de CDs madures.

En la següent gràfica es mostra els ratios gens diana/Ciclofilina corresponents a l'expressió dels gens CCR7, IDO, BIC-1 i SOD-2 en les cèl·lules purificades per adherència al plàstic i tractades amb el Factor H i les CDs en estat immadur respecte les cèl·lules madures.

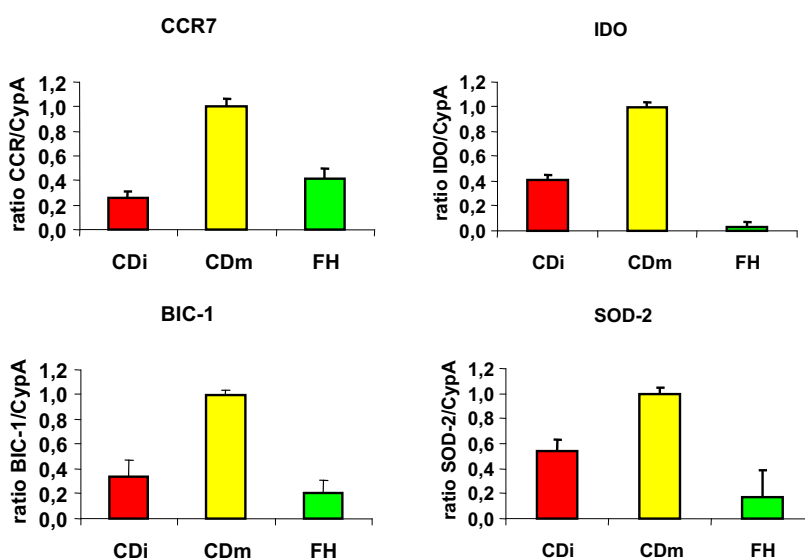


Figura 85. Quantificació de l'expressió dels gens CCR7, BIC-1, IDO i SOD-2 en CDs purificades per adherència al plàstic, per RT-PCR a temps real amb el LightCycler®. Els resultats són relatius a les CDm. Els resultats es mostren com la mitja  $\pm$  SD de 4 experiments independents.

## Resultats

Comparant amb les CDm s'observa una disminució de l'expressió dels gens estudiats en les cèl·lules tractades amb el FH des del començament del cultiu i afegint l'estímul maduratiu LPS a dia 5, comportament semblant al que es pot veure en les CDi.

### 5.2.4.5. Microscopia d'escombratge

Es va fer un seguiment visual de les CDs tractades amb el Factor H a la concentració de 10 µg/ml durant tot el procés de cultiu i a dia 5 afegint LPS, i es va observar que la morfologia de les CDs tractades amb el Factor H era com la de les CDi, cèl·lules més rodones i amb poques prolongacions dendrítiques, tal i com es pot veure a la Figura 86. Mentre que les CDm mostraven una morfologia de cèl·lules més allargades i amb llargues dendrites.

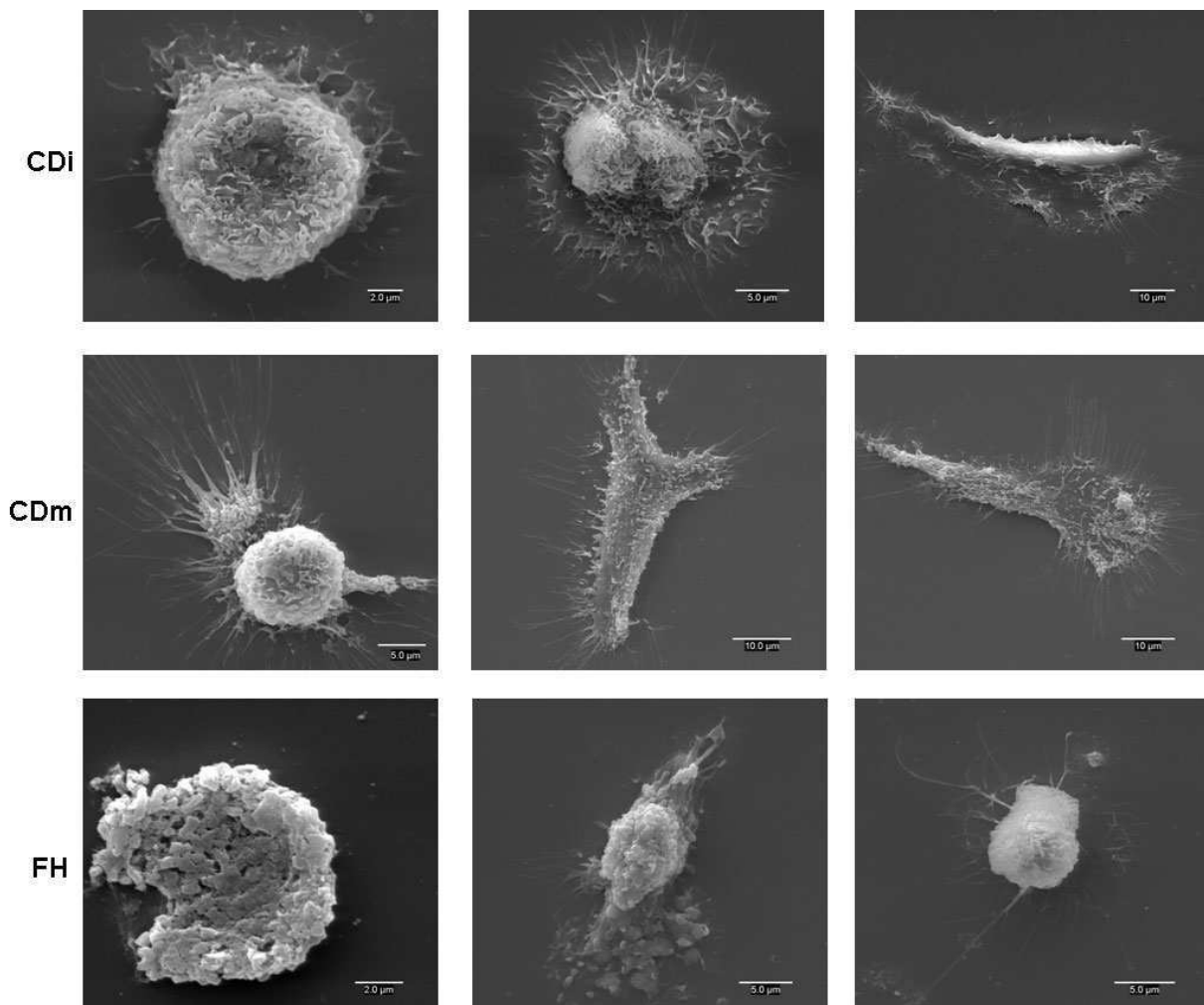


Figura 86. S'observa la morfologia de les CDs en els diferents estats de maduresa i en ser tractades amb FH. CDi, CDs immadures; CDm, CDs madures; FH, Factor H.

Amb el tractament amb Factor H s'obté una morfologia molt semblant a les CDi, de manera que sembla que en tractar les cèl·lules amb el Factor H es queden en un estat immadur.

#### 5.2.4.6. Assajos funcionals

##### a) Avaluació de la capacitat endocítica de les CDs

Per determinar la capacitat d'internalització d'antigen de les CDs tractades amb els diferents estímuls, es va mesurar el comportament d'aquestes cèl·lules per citometria de flux DQ-OVA conjugat al marcador fluorescent BODIPY FL. Les CDs van ser incubades amb DQ-OVA durant 15 min a 37°C per posteriorment determinar la seva MFI associada. Per determinar la MFI associada. Per mesurar l'endocitosi no específica de l'antigen per les CDs, aquestes van ser incubades 15 min a 4°C amb DQ-OVA.

Es va avaluar la capacitat endocítica de les CDs tractades amb el Factor H (a les concentracions de 2, 5 i 10 µg/ml ) des del primer dia de cultiu a dia 5 per citometria de flux per determinar el seu efecte en la diferenciació de monòcits a CD immadures. S'observa una elevada capacitat d'endocitar DQ-OVA per part de les CDi. Les cèl·lules tractades amb el Factor H mostren una disminució forta de l'endocitosi en totes les concentracions estudiades (Figura 87).

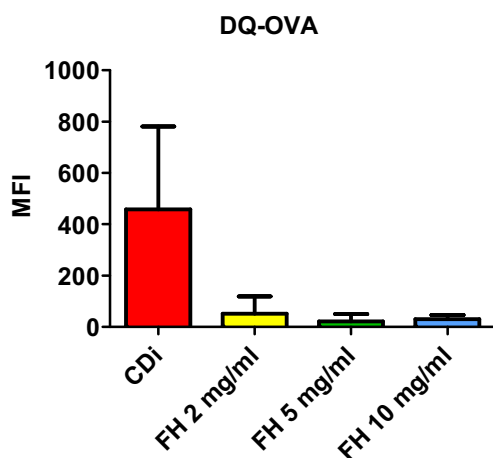


Figura 87. Capacitat endocítica de les CDs tractades amb el Factor H a dia 5 de cultiu comparades amb les CDi que mostren nivells alts d'endocitosi. S'observa una disminució de la capacitat d'endocitar i de processar DQ-OVA en CDs tractades amb el factor H. Els resultats es mostren com la mitja  $\pm$  SD de 2 experiments independents.

També es va determinar aquesta capacitat d'endocitosi de DQ-OVA a dia 7, en CDs tractades amb el Factor H a les tres concentracions analitzades des dels 5è dia de cultiu sol o combinat amb LPS, per avaluar els seus efectes en la maduració d'aquestes cèl·lules. Com s'observa en la Figura 88 les CDi eren capaces d'endocitar i processar DQ-OVA a alts nivells. Mentre que les CDM, tractades amb LPS durant 48 hores, tenen una menor capacitat d'endocitosi comparada amb les CDi sense tractar. Les CDs tractades amb el factor H sol o combinat amb LPS a les concentracions analitzades, van mostrar una baixa capacitat d'endocitar l'antigen comparable a les CDs tractades amb LPS.

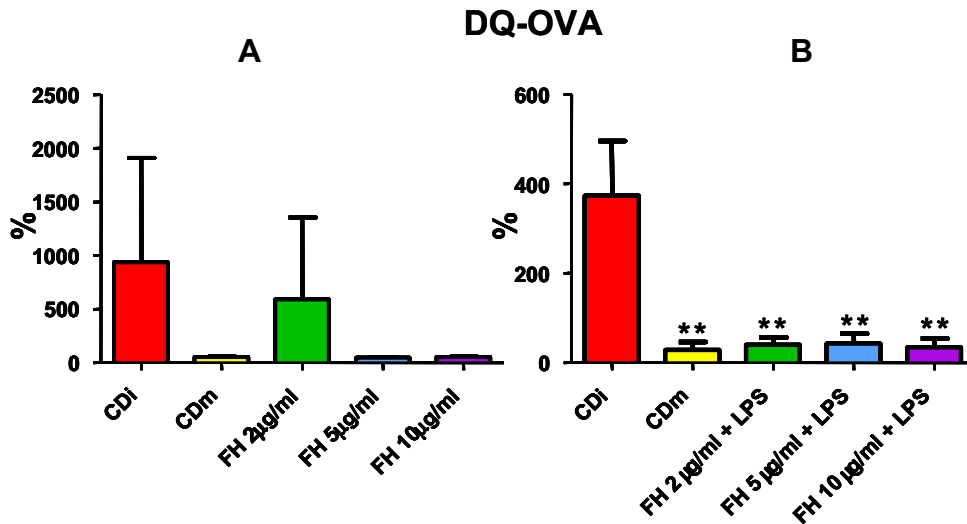


Figura 88. Capacitat endocítica de les CDi, a dia 7 de cultiu, tractades amb Factor H sol (A) o combinat amb LPS (B) a dia 5 i comparades amb les CDm i les CDi. S'observa una disminució de la capacitat d'endocitar i de processar DQ-OVA en CDi tractades amb Factor H sol o combinat amb LPS durant 48 hores, comparades amb les CDi que mostren nivells alts d'endocitosi. Les CDm donen nivells baixos d'endocitosi. Els resultats es mostren com la mitja  $\pm$  SD de 4 experiments independents. \*\* P < 0.01.

Finalment es va determinar aquesta capacitat d'endocitosi de DQ-OVA a dia 7, en CDi tractades amb el Factor H a les tres concentracions analitzades des del primer moment de cultiu i estimulant la maduració durant 48 hores amb LPS, per avaluar els seus efectes en la diferenciació i maduració d'aquestes cèl·lules. Com s'observa en la Figura 89 les CDi eren capaces d'endocitar i processar DQ-OVA a alts nivells. Mentre que les CDm, tractades amb LPS durant 48 hores, tenen una menor capacitat d'endocitosi comparada amb les CDi sense tractar. Les CDi tractades amb Factor H a les concentracions descrites des del primer moment de cultiu i combinades amb LPS, van mostrar una baixa capacitat d'endocitar l'antigen comparable a les CDi tractades amb LPS indicant un comportament funcional de CDi en estat semimadur de desenvolupament.

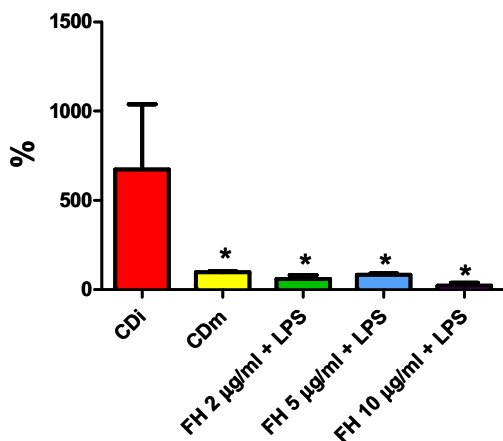


Figura 89. Capacitat endocítica de les CDi a dia 7 de cultiu tractades amb el Factor H comparades amb les CDm i les CDi. S'observa una disminució de la capacitat d'endocitar i de processar DQ-OVA en CDi tractades amb Factor H durant tot el cultiu i a dia 5 estimulant les cèl·lules amb LPS durant 48 hores, comparades amb les CDi que mostren nivells alts d'endocitosi. Les CDm donen nivells baixos d'endocitosi. Els resultats es mostren com la mitja  $\pm$  SD de 4 experiments independents. \* P < 0.05.

## b) Assaig de quimiotaxi

Posteriorment es va determinar l'expressió de la molècula de superfície CCR7. Per qRT-PCR es van comprovar els nivells de RNA del gen CCR7 (descriu a l'apartat 5.2.5.4 de Resultats). Es van recollir les CDs a dia 7 després de ser tractades amb el Factor H des del primer dia de cultiu a la concentració de 10 µg/ml i a dia 5 afegint LPS com a estímul de maduració. S'observa disminució de l'expressió de CCR7 en tractar les CDs amb el Factor H.

Es va comprovar també l'expressió de CCR7 a nivell superficial per citometria de flux. Els resultats de l'expressió es mostren en la Figura 90 tant a nivell de percentatge com de fluorescència.

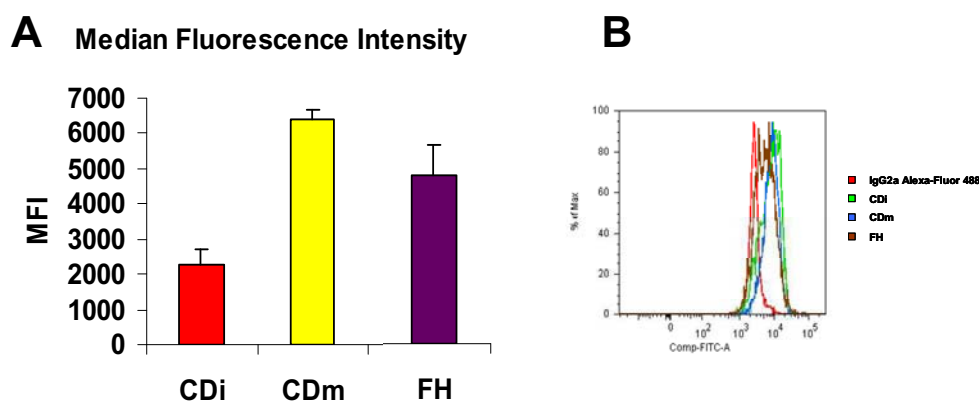


Figura 90. Anàlisi de l'expressió de l'antigen de superfície CCR7 en les poblacions de CDs analitzades. MFI (A) i histograma (B) de CCR7 en tractar les CDs amb FH des del primer dia i durant tot el cultiu i a dia 5 afegint l'estímul maduratiu LPS. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de % i MFI  $\pm$  SD de 3 experiments independents.

Es va realitzar un assaig de quimiotaxi per comprovar la capacitat migratòria de les CDs que havien estat tractades amb el Factor H tal i com es descriu a l'apartat 4.6.6 de Materials i Mètodes. A les dues hores d'incubació a 37°C en les plaques de *traswells*, es van recollir les cèl·lules i es va determinar el nombre total de cèl·lules que han migrat fixant un temps concret per citometria de flux.

Els resultats de la migració es mostren en la Figura 91 com el percentatge del nombre mig de cèl·lules migrades respecte el total i relativitzats a les CDm. Es van realitzar un total de 2 experiments independents i cada experiment va comptar amb 3 rèpliques de cada condició estudiada. Es pot observar que les CDs tractades durant tot el cultiu amb Factor H i a dia 5 estimulades amb LPS tenen capacitat migratòria nul·la comparada amb les CDm.

## Resultats

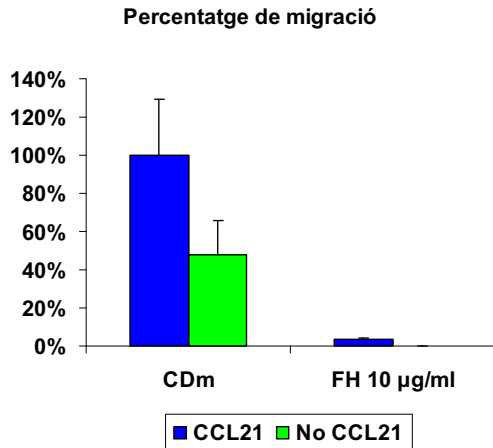


Figura 91. Resultats de l'assaig de migració de les CDm i les CDs tractades amb Factor H durant tot el cultiu i a dia 5 combinant-les amb l'estímul maduratiu LPS. Els resultats mostren les cèl·lules que han migrat en afegir la quimioquina CCL21 en la part inferior del *transwell*. Els resultats es mostren com la mitja  $\pm$  SD de 2 experiments independents.

### c) Assaig de proliferació de Limfòcits T

Per realitzar aquest assaig primer de tot es va determinar l'apoptosi cel·lular de les CDs que havien estat cultivades en presència del Factor H i estimulades a dia 5 amb LPS. Com a control es van incubar les CDs amb vitamina D3 durant tot el cultiu afegint com a estímul maduratiu LPS.

Les cèl·lules van ser marcades amb Annexin-V i 7-ADD i es va determinar la viabilitat cel·lular per citometria de flux tal i com es descriu en l'apartat 4.6.7.1. de Materials i Mètodes. Els resultats obtinguts es mostren en la Figura 92 on es mostren les cèl·lules vives i les que han patit apoptosi primerenca, tardana i necrosi cel·lular.

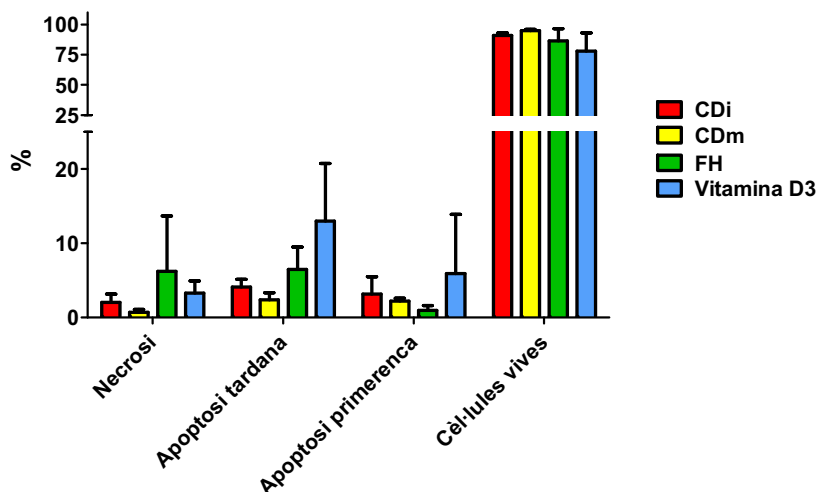


Figura 92. Resultats de l'assaig d'apoptosi realitzat en les CDs tractades amb el Factor H. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de percentatge  $\pm$  SD de 8 experiments independents.

Com es pot observar la majoria de cèl·lules són viables en totes les condicions experimentades, trobant un percentatge reduït de cèl·lules necròtiques o bé en apoptosi primerenca o tardana. La vitamina D3 dóna lloc a un percentatge més elevat de cèl·lules que han patit apoptosi i a una disminució de les cèl·lules viables en comparació amb la resta de condicions.

## 2. Fenotip

En segon lloc es va determinar el fenotip que caracteritzava aquestes cèl·lules en ser tractades amb el Factor H i estimulades a dia 5 amb LPS. Com a control es van incubar les CDs amb vitamina D3 durant tot el cultiu afegint com a estímul maduratiu LPS.

Els resultats de la MFI es mostren com el percentatge de cèl·lules positives per un marcador determinat relativitzat al valor de les CDm, tal i com es pot veure en la Figura 93. Es pot observar que en tractar les cèl·lules amb el Factor H s'obté disminució dels marcadors HLA-DR, CD40, CD83, CD86 i CD1a, i lleugerament de CCR7 i CD206, respecte les CDm. Mentre que la vitamina D3 dona una disminució superior d'aquests marcadors. En quant a la resta de marcadors no es veuen diferències significatives entre ells.

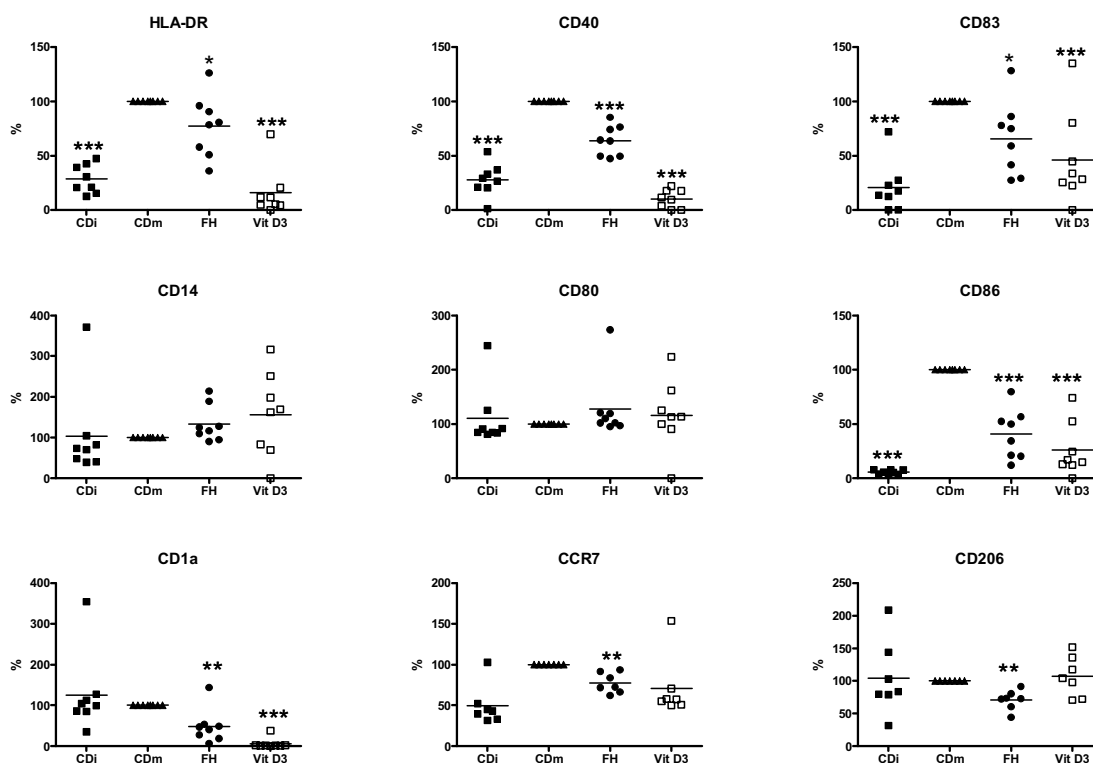


Figura 93. Anàlisi de la MFI dels diferents antigens de superfície analitzats en les poblacions de CDs tractades amb el Factor H a la concentració de 5 µg/ml des del primer dia i durant tot el cultiu i a dia 5 afegint l'estímul maduratiu LPS. Com a control positiu s'ha utilitzat cèl·lules cultivades amb vitamina D3 a una concentració 2.4 µM. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de MFI relativitzats a CDm  $\pm$  SD de 8 experiments independents. \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001.

## 3. Proliferació de limfòcits T heteròlegs

Després d'examinar les variacions observades en el fenotip de les CDs a causa de la presència del Factor H, es va procedir a determinar si la seva capacitat per estimular la proliferació limfocitària heteròloga també es trobava alterada. Per a això es van enfrontar al 7è



## Resultats

dia limfòcits heteròlegs marcats amb CFSE amb les CDs tractades amb el Factor H durant tot el cultiu i afegint a dia 5 LPS com a estímul maduratiu. Com a control es van cultivar les CDs amb vitamina D3 en les mateixes condicions. Es van realitzar tres relacions dendrítica:limfòcit, 1:40, 1:80 i 1:160 i es van deixar incubant durant 120 hpres. Passat aquest temps, es van determinar les proliferacions de limfòcits T heteròlegs dels diferents cocultius mitjançant citometria de flux. Les dades obtingudes van ser analitzats amb el programa FlowJo 5.7.2. per obtenir mitjanes estadístiques de les generacions. Es van realitzar 4 rèpliques per cada condició. Com a control positiu es van cultivar els limfòcits T durant 120 hores amb PMA (25 ng/ml) i ionomicina (250 ng/ml) i com a control negatiu limfòcits T sense marcar.

Els resultats de cada experiment individual es van obtenir calculant el percentatge de la mitja de les 4 rèpliques de cada condició relativitzat al valor de les CDm. Finalment es va realitzar la mitja dels percentatges dels diferents experiments realitzats.

En la Figura 94 es mostren limfòcits marcats amb CFSE que han proliferat a les 120 hores del cocultiu. Com es pot observar en tractar les CDs amb el Factor H, a les tres relacions experimentades de cocultiu, es produeix una disminució de la proliferació així com també s'inhibeix tant l'expressió de molècules de coestimulació, com de molècules d'hiscompatibilitat, implicades en la presentació antigènica. Aquests nivells de proliferació són molt semblants als obtinguts en els cocultius amb CD immadures.

La vitamina D3 també dóna lloc a una disminució de la proliferació, mentre que la màxima resposta s'observa quan s'utilitza CDs madurades amb LPS.

Per tant el factor H podria estar implicat en la semi-maduració de les CDs.

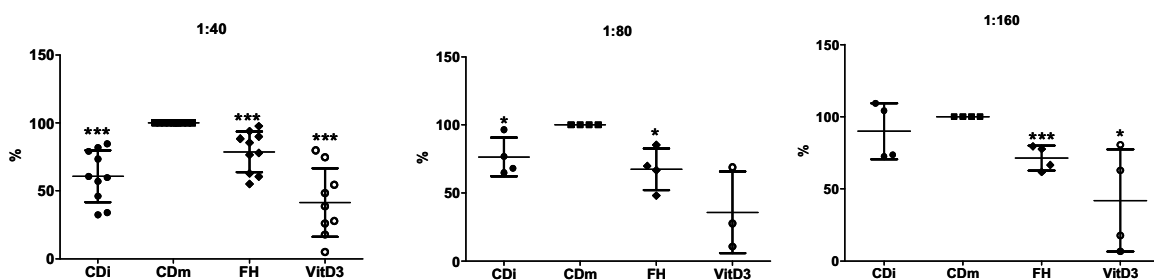


Figura 94. Resultats de l'assaig de proliferació de limfòcits T heteròlegs en cocultius de CDs tractades amb el Factor H (5 µg/ml) durant tot el cultiu i afegint a dia 5 l'estímul maduratiu LPS (2 µg/ml) amb limfòcits T autòlegs a tres relacions de dendrítica:limfòcit T diferents, 1:40, 1:80 i 1:160. Com a control s'han utilitzat CDs tractades amb vitamina D3 a una concentració de 2.4 µM. Els resultats es mostren com la mitja dels valors de percentatge relativitzats a CDm ± SD de 8 experiments independents independents en el cas de la relació 1:40 i de 4 experiments independents en el cas de les relacions 1:80 i 1:160. \* P < 0.05; \*\*\* P < 0.001.





## **6. DISCUSSIÓ**



L'alteració anòmala de la resposta inflamatòria és la causa de moltes patologies com l'aterosclerosi, les malalties autoimmunes, la fibrosi pulmonar, l'asma o el rebuig en el trasplantament d'òrgans. Tant les cèl·lules endotelials com les cèl·lules dendrítiques són claus en aquest procés. Les cèl·lules endotelials estan en contacte directe amb el sistema immune i són un component essencial de la vasculatura. Mentre que les cèl·lules dendrítiques són un tipus de cèl·lules especialitzades característiques del sistema immunitari de mamífers. Encara que formen part de la immunitat innata, sent capaces de fagocitar patògens, la seva funció principal és processar material antigènic, retornar-lo a la seva superfície i presentar-lo a les cèl·lules especialitzades del sistema immunitari adaptatiu.

### **6.1. CÈL·LULES ENDOTELIALS HUVEC**

Les cèl·lules endotelials formen una monocapa unida a la membrana basal subjacent constituint l'endoteli vascular, el qual ajuda al manteniment i a l'estabilitat de la paret vascular. A més, són fonamentals en el reclutament leucocitari durant el procés inflamatori i controlen la immunitat innata, la immunitat adaptativa i els processos de coagulació i angiogènesi.

El receptor CD40 està implicat en l'amplificació d'aquesta resposta inflamatòria en cèl·lules endotelials. Estudis previs en el nostre grup van aprofundir en el coneixement a nivell molecular del procés d'activació endotelial i les rutes de senyalització activades exclusivament via CD40 implicades en el procés inflamatori.

L'objectiu principal d'aquest estudi va ser caracteritzar a nivell molecular la contribució del sistema CD40-CD40L en l'activació de l'endoteli. Els resultats mostrats fins ara s'han obtingut activant les cèl·lules endotelials amb el CD40L ancorat a la membrana de les cèl·lules Jurkat D1.1 (mCD40L), un clon de limfòcits T que sobreexpressa el lligand fisiològic del receptor CD40, i amb el CD40L soluble (sCD40L). Es creu que la principal font de sCD40L plasmàtic prové de plaquetes activades i també seria capaç d'unir-se a CD40 de la superfície de la cèl·lula endotelial i desencadenar respostes biològiques. S'ha establert que el sCD40L, present en el sistema circulatori pot representar un biomarcador de processos inflamatoris com l'infart de miocardi i síndromes coronaris aguts, tot i així, es desconeix la seva funció biològica.

Per tal de determinar la funció biològica de sCD40L i si aquesta difereix de la que presenta la isoforma mCD40L, es van comparar els perfils globals d'expressió gènica resultants de la interacció de sCD40L i mCD40L amb el receptor CD40 en cèl·lules endotelials.

## Discussió

### **6.1.1. Inhibició de l'expressió de CD40 mitjançant un siRNA-antiCD40 en cèl·lules endotelials HUVEC**

Amb la finalitat d'assolir la inhibició de l'expressió gènica de CD40 es va utilitzar la tecnologia del silenciament de l'expressió gènica utilitzant siRNAs. S'ha descrit que aquesta tecnologia és molt més efectiva que altres estratègies com l'ús d'anticossos bloquejants o oligonucleòtids antisentit. L'eficàcia del bloqueig és més potent i el silenciament del gen diana és més específic [232]. El nivell d'inhibició mig causat per un siRNA és de l'ordre de 100 a 1000 vegades superior que la d'un oligonucleòtid fosforilat òptim dirigit contra el mateix gen diana [233]. A més, s'han descrit que els siRNAs són més resistents a la degradació per nucleases intracel·lulars i extracel·lulars que els oligonucleòtids antisentit [234].

En aquest treball s'ha utilitzat un siRNA potent i específic capaç de reduir l'expressió del receptor de CD40 humà en un 80%-90% en cèl·lules endotelials HUVEC, que havia estat desenvolupat en el nostre grup [202]. Es va demostrar que aquest siRNA bloqueja l'activació endotelial via CD40L, impeding la inducció de l'expressió de les molècules d'adhesió (ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina) [202].

Posteriorment es va realitzar un estudi amb aquestes mateixes cèl·lules tractades amb el siRNA anti-CD40 i estimulades amb mCD40L durant 3 temps d'estimulació diferents, 4, 10 i 16h [197]. Es va determinar per anàlisi d'ontologia gènica i es va confirmar per qRT-PCR la inducció de gens involucrats en resposta immune i processos inflamatoris, com molècules d'adhesió cel·lular (E-selectina, ICAM-1, VCAM-1), gens antiapoptòtics (BIRC-3), citokines i quimioquines proinflamàtores (CCL2, CXCL1, IL-8), factors de transcripció (NFκB, RelB), gens implicats en la presentació d'antigen (TAP1). Aquest patró d'expressió gènica confirma el paper clau de la senyalització via CD40 i de les cèl·lules endotelials en l'inici i el desenvolupament dels processos immunoinflamatoris.

Per tant, en aquest treball s'ha caracteritzat la inhibició de l'expressió de CD40 mitjançant RNAi i s'han estudiat els efectes funcionals del bloqueig del senyal coestimulador CD40-sCD40L en cèl·lules endotelials *in vitro*.

### **6.1.2. Anàlisi del perfil d'expressió gènica en cèl·lules endotelials activades via sCD40L utilitzant microarrays**

Es va realitzar una anàlisi del perfil global d'expressió gènica, en cèl·lules endotelials humanes activades via CD40 mitjançant la unió amb el seu lligand soluble, sCD40L, en les quals s'inactiva específicament la senyalització via CD40 per RNAi. Posteriorment es va

voler comparar aquest perfil d'expressió gènica amb l'obtingut en un anàlisi paral·lel activant la via mCD40-CD40L.

Dels resultats d'aquest treball i de l'anterior realitzat en el nostre grup [197], es desprèn que aquest siRNA anti-CD40 podria considerar-se com una alternativa a l'ús d'anticossos bloquejants per interferir de manera específica amb aquesta via de senyalització en processos immunoinflamatoris.

Pel que fa al nombre total de gens regulats transcripcionalment, resultats a 4 hores d'estimulació indiquen que l'activació de les cèl·lules endotelials per sCD40L és menor que la induïda per mCD40L. No obstant, aquest patró global d'expressió confirma el paper clau de la senyalització per CD40 en l'activació de les cèl·lules endotelials en l'inici i progressió dels processos inflamatoris.

Entre els principals gens induïts per CD40 en cèl·lules endotelials conjuntament regulats per les dues isoformes de CD40L (sCD40L i mCD40L) trobem molècules d'adhesió (E-selectina, VCAM-1 i ICAM-1), gens implicats en apoptosi (BIRC3 i CASP-1), citokines i quimioquines (CXCL2, CXCL3, CCL2, IL-8 (CXCL8)). Gran part d'aquests gens estan involucrats en l'activació de diferents processos implicats en la resposta immunoinflamatòria ja que controlen l'ativació i atracció dels leucòcits i la seva migració a través de l'endoteli cap al lloc d'inflamació.

A més de l'expressió de gens proinflamatoris que s'indueixen en resposta a l'estímul, existeix un nombre considerable de gens amb funció inhibidora que també veuen incrementada la seva expressió, com és el cas d'un dels principals inhibidors del factor de transcripció de NFκB, NFκBIA.

Per altra banda, entre els gens més reprimits per ambdós tipus d'estímuls es troba l'enzim antioxidant de la PRDX5 implicat en l'estrés oxidatiu.

Cal destacar que hi ha alguna diferència d'expressió remarcable entre els dos tipus d'estímuls utilitzats. El gen més induït per mCD40L és la quimioquina CX3CL1 implicada en la quimiotaxi i l'adhesió cel·lular. Mentre que el pèptid vasoactiu APLN és el més reprimat per mCD40L però no per sCD40L.

De l'estudi a nivell global per l'anàlisi d'ontologia gènica (GO) dels gens identificats com a diferencialment regulats en cèl·lules endotelials entre ambdós estímuls: sCD40L i mCD40L es desprenen dos importants processos biològics que s'indueixen preferentment via mCD40L: un d'ells és la quimiotaxi, en el que es troben involucrades quimioquines proinflamatòries de la subfamília CC implicades en el reclutament de monòcits i limfòcits; i quimioquines de la família CXC importants en l'atracció de neutròfils (CXCL10, PLAU,



## Discussió

CCL5, CXCL5, CX3CL1, CCL20 i CXCL11). L'altre procés que cal destacar és el catabolisme del triptòfan, en el que es troben induïts els gens que codifiquen pels enzims *indoleamina 2,3 dioxigenasa* (IDO) i kinureninasa (KYNU). La regulació diferencial d'aquesta via metabòlica és molt interessant, ja que les cèl·lules que sobreexpressen l'enzim IDO activen els mecanismes de defensa que regulen d'excessiva activació de l'endoteli.

Recentment s'ha descrit que la força i persistència de la senyalització per CD40 determina el tipus de resposta immune en cèl·lules dendrítiques i macròfags [235, 236]. Aquesta diferent capacitat d'interacció amb el receptor CD40, podria traduir-se en l'activació de vies de transducció de senyals i funcions biològiques alternatives entre sCD40L i mCD40L.

### **Via de transducció del IFN- $\gamma$ i del metabolisme del triptòfan**

IFN- $\gamma$  és una citoquina pleiotròpica. Produïda per cèl·lules T i NK, indueix la producció d'enzims antimicrobials com són la sintasa d'Òxid Nítric (NO) i la IDO. També juga un paper fonamental en les respostes del sistema immunitari a tumors *in vivo* [237]. Moltes investigacions han indicat que tant la neutralització del IFN- $\gamma$  com la inhibició de la via mitjançada per IFN- $\gamma$  promouen la formació de tumors de forma espontània *in vivo* [238, 239, 240], la qual cosa recolza fortament la implicació del IFN- $\gamma$  en el procés d'immunosupervivència. A més a més, IFN- $\gamma$  té efectes negatius directes sobre tumors inhibint la proliferació cel·lular i estimulant l'apoptosi cel·lular [241]. Els receptors del IFN- $\gamma$  (IFNGR) consten de dues subunitats: IFNGR1 (cadena  $\alpha$  del receptor del IFN- $\gamma$ ) i IFNGR2 (cadena  $\beta$  del receptor del IFN- $\gamma$ ) [242]. El conjunt és responsable de la unió del lligand i és requerit, però no suficient, per a la transducció de senyal. Després de la unió del receptor del IFN- $\gamma$ , els IFNGRs provoquen la fosforilació i activació de la quinasa JAK1 (*Janus-activated kinase 1*), JAK2, i les vies de STAT-1 per regular la transcripció de molts gens induïbles per IFN- $\gamma$  [237], dos dels quals són el factor regulador d'IFN- $\gamma$  1 (IRF-1) i IRF-2 [243, 244]. IRF-1 és induït per IFN- $\gamma$  eficaçment en molts tipus de cèl·lules [243], i quan es transloca al nucli, IRF-1 s'uneix a regions del promotor de molts gens induïts per IFN- $\gamma$  i activa la seva transcripció donant lloc a la inhibició de la proliferació cel·lular i l'estimulació de l'apoptosi cel·lular [244]. IRF-1 és així un mediador important per als efectes antivírics, immunomoduladors, antiproliferatius, i proapoptòtics del IFN- $\gamma$  [246]. IRF-2, un altre membre de la família de IRF, també és induït per IFN- $\gamma$  però actua com a antagonista de IRF-1 bloquejant la via mitjançada per IFN- $\gamma$  [246]. Sembla que IRF-1 es pot comportar com a supressor de tumors, mentre que IRF-2 té activitat oncogènica [243, 244].

Encara que tant IRF-1 com IRF-2 són gens diana del IFN- $\gamma$  [243, 244], només la inducció d'IRF-1 invariablement té lloc després de l'exposició a IFN- $\gamma$ , suggerint que la inducció d'IRF-2 per IFN- $\gamma$  podria ser condicional. Coherentment, un estudi realitzat l'any 2008 pel grup de Yan Wang en carcinoma cel·lular esquamós esofagial (ESCC, *esophageal squamous cell carcinomas*) van mostrar que la concentració alta de IFN- $\gamma$  provocava expressió d'IRF-1 sense inducció d'IRF-2, mentre que la concentració baixa de IFN- $\gamma$  estimulava l'expressió tant d'IRF-1 com d'IRF-2. A més, van trobar que l'expressió d'IRF-2 induït per IFN- $\gamma$  era mitjançada principalment per IRF-1, que és coherent amb informació prèvia que descriuen que els llocs d'unió d'IRF-1 es troben en el promotor d'IRF-2 [247]. Per tant la concentració alta de IFN- $\gamma$  era capaç d'activar fortament i ràpidament les vies proapoptòtiques i antiproliferatives, que podrien ocasionar la destrucció de l'estructura cel·lular i la mort cel·lular immediatament sense inducció d'IRF-2 per IRF-1, mentre que la concentració baixa de IFN- $\gamma$  no exercia efectes òbviament negatius sobre cèl·lules d'ESCC ni canviava la fisiologia de les cèl·lules, que podrien crear condicions intracel·lulars favorables per la sobrerregulació d'IRF-2. També s'han realitzat estudis en animals genèticament manipulats que els manca IFN- $\gamma$  o IFNGR1 i s'ha vist que tenen una incidència més alta o progressió de tumors [238, 239, 240], suggerint que la disminució de la regulació de IFNGR1 potencialment realça l'habilitat de cèl·lules cancerígenes per escapar-se dels mecanismes d'immunosupervivència.

IRF-1 és un important regulador de IDO. Aquest enzim és un mecanisme efector immune important per l'eliminació de patògens específics intracel·lulars [248, 249, 250, 251, 252]. IFN- $\gamma$  és el major inductor de l'activitat IDO [253], i el seu efecte pot ser sobrerregulat per un cert nombre de mediadors proinflamatoris, incloent-hi LPS, IL-1, i TNF- $\alpha$  [254, 255]. Encara que el mecanisme d'aquesta sinergia no s'ha definit encara, els estudis previs en macròfags humans mostraven que els augments en l'activitat IDO tenien un augment concomitant en el seu mRNA. En un estudi realitzat amb cèl·lules epitelials pel grup de Robinson l'any 2003 es va demostrar que canvis en l'activitat IDO es correlacionaven amb un augment de l'activitat del promotor i un increment en la concentració de mRNA de IDO, suggerint que mediadors proinflamatoris augmenten l'activació transcripcional del gen IDO. Els dos activadors transcripcionals induïts per IFN- $\gamma$ , STAT-1 i IRF-1, eren més abundants en el nucli després de tractament combinat amb IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  que amb qualsevol citoquina sola.

## Discussió

L'efecte antiproliferatiu de IFN- $\gamma$  es dona en part per la inducció deIDO, el qual és un enzim que catalitza la degradació de l'aminoàcid essencial L-triptòfan a N-formilkinurenina. Aquesta posteriorment és degradada per l'enzim kinureninasa a serotonina, melatonina i niacina. Kinureninasa (KYNU) és un enzim de tipus 3-hidroxikinureninasa implicat en el via de la kynurenina per a la biosíntesi de cofactors de NAD des de triptòfan. Catalitza la conversió de L-3-hidroxikinurenina i L-kinurenina a àcid 3-hidroxiantranílic i àcid antranílic, respectivament. Els nivells elevats d'activitat de kinureninasa s'han observat en condicions inflamatòries cerebrals i sistèmiques [257]. Una deficiència de kinureninasa ha estat associada amb el metabolisme de triptòfan anormal.

Per a molts organismes (incloent-hi humans), el triptòfan és un aminoàcid essencial. Això significa que no pugui ser sintetitzat per l'organisme i per això hagi incorporat en la dieta. Els aminoàcids, incloent-hi triptòfan, serveixen de blocs de construcció en la biosíntesi de proteïna. Els nivells alts de triptòfan eviten la síntesi de triptòfan a través d'un *feedback* negatiu i, quan es redueixen els nivells de triptòfan de la cèl·lula, la transcripció continua. L'organització genètica permet estretament respostes regulades i ràpides a canvis en els nivells de triptòfan interns i externs de la cèl·lula.

En el nostre treball hem pogut comprovar que la via d'activació CD40-CD40L en cèl·lules endotelials a 4 hores d'estimulació, tant si el lligand es troba en forma soluble com unit a membrana, desencadena l'activació de la via de transducció de senyals del IFN- $\gamma$  ja que es dona inducció del factor de transcripció STAT-1 que dona lloc a la transcripció del gen IRF-1 que també està augmentat, el qual és un important regulador deIDO. La unió de CD40 al seu lligand en cèl·lules endotelials, en ambdós tipus d'estímuls, desencadena l'activació dels gensIDO i KYNU implicats en el metabolisme del triptòfan, però aquesta activació és superior quan les cèl·lules endotelials interaccionen amb mCD40L (D1.1) .

Per tant, en condicions proinflamatòries es dona un augment de la via del IFN- $\gamma$  que té efectes antivírics, immunomoduladors, antiproliferatius, i proapoptòtics; i un augment del metabolisme del triptòfan en veure's augmentada l'expressió dels seus enzims de degradació principals.

En la Figura 95 es mostra un esquema de la via de senyalització de IFN- $\gamma$  i del metabolisme de degradació del triptòfan.

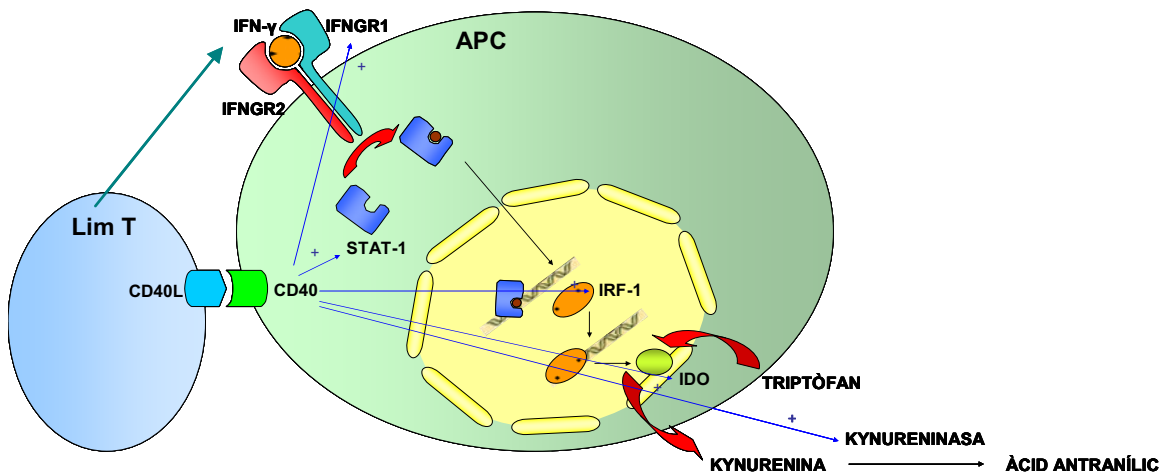


Figura 95. Activació de la via de senyalització de IFN- $\gamma$  i del metabolisme de degradació del triptòfan per acció de la unió CD40-CD40L en cèl·lules endotelials.

### microRNAs

La resposta inflamatòria dels mamífers a infeccions implica la inducció d'uns quants centenars de gens, un procés que ha de ser prudentment regulat per aconseguir l'eliminació del patògen i evitar les conseqüències d'expressió gènica irregular, com càncer. Últimament, els microRNAs (miRNAs) han emergit com una classe de reguladors de l'expressió gènica que també ha estat connectat amb càncer. Han mostrat un paper important en la biologia del tumor, incloent l'oncogènesi, la progressió, invasió, metàstasi i angiogènesi. A més són reconeguts per la seva important funció de control postranscripcional de l'expressió gènica. L'expressió aberrant o mutada d'aquests microRNAs suggereix que poden funcionar com a oncogens o gens supressors de tumors, i s'està començant a investigar la seva implicació específica en la metàstasi [258]. Tanmateix, la relació entre inflamació, immunitat innata, i miRNA s'està començant a estudiar. En l'estudi present, amb la tecnologia dels microarrays s'han identificat 3 transcrits hostes de 3 miRNAs que estarien regulats per l'activació de la via CD40-CD40L en cèl·lules endotelials.

BIC-1 és el transcrit hoste que codifica per el microRNA155 (miR-155), que es va identificar originalment com un lloc comú d'integració retroviral del virus de la leucosi d'avian durant la inducció de limfomes de cèl·lules B en pollastres, que mostren alts nivells d'expressió de BIC [258]. microRNA155 també s'ha trobat a alts nivells en limfomes de cèl·lules B humans i en altres tumors [259].

## Discussió

C9orf5 és el transcrit hoste que codifica per el microRNA32 (miR-32) i es troba sobreexpressat en tumors de pròstata. miR-32 es troba augmentat en el càncer de còlons i pancreàtic [260] i és un mediador de defensa antiviral de cèl·lules humanes [261]. És aquesta funció de microRNA32 la qual podria ser l'enllaç causal entre l'expressió alterada i el desenvolupament del càncer de pròstata perquè uns quants dels gens coneguts de susceptibilitat de càncer de pròstates també estan implicats en la defensa de l'hoste [262].

TMEM-49 és el transcrit hoste que codifica per el microRNA21 (miR-21) i mostra una forta conservació evolutiva a través d'un ampli rang d'espècies de vertebrats en mamífers, peixos i viada suggerint un paper conservatiu per la regulació d'aquest gen. Estudis d'expressió gènica en mostres tumorals i cèl·lules cancerígenes mostren que microRNA21 és l'únic microRNA sobrerregulat en 6 tipus de tumors sòlids (pit, còlon, pulmó, pàncrees, pròstata i estómac). També es troba sobrerregulat en altres tipus de càncers com glioblastoma, càncer esofagial, carcinomes (ovàrics, hepatocel·lulars, tiroide papilar, cel·lular esquamós de llengua), càncer de cap i coll, cervical, leucèmia limfocítica crònica i limfoma de cèl·lules B. Aquest extens perfil d'expressió el converteix en una molècula clau associada amb la transformació neoplàsica i en un biomarcador i determina el seu paper en la inducció de proliferació cel·lular, antiapoptosi, migració, invasió o metàstasi suggerint el seu rol en la progressió de l'oncogènesi/tumor [258].

En els nostres estudis s'ha pogut comprovar que en condicions proinflamàtores es dona sobreexpressió dels tres transcrits que inclouen els microRNAs descrits a 4 hores d'estimulació conseqüència de l'activació de la via CD40-CD40L. Per tant, podrien ser utilitzats com a marcadors de la progressió de malalties inflamàtores.

### **Estrès oxidatiu**

L'estrès oxidatiu és un tret característic de la resposta inflamatòria. L'acció de CD40 també regula l'expressió d'enzims involucrats en la detoxificació de ROS, com SOD-2 (validat per qRT-PCR), amb efecte antioxidant que veu augmentada la seva expressió tant si el lligand es troba en forma soluble com unit a membrana, i el transcrit de Peroxiredoxina 5 (PRDX5), un enzim antioxidant amb paper protector en processos inflamatoris, que a diferència de SOD-2, veu disminuïda la seva expressió a 4 hores d'estimulació en el cas del lligand unit a membrana. Mentre que la seva expressió no es veu alterada en estimular el CD40 de les cèl·lules endotelials amb el sCD40L.

### **Angiogènesi**

Les metal·loproteases de matriu (MMPs) són enzims proteolítics dependents de Zinc que intervenen en la remodelació dels components de la matriu extracel·lular. Les MMPs estan implicades en la regulació de molts processos fisiològics, entre ells l'angiogènesi, que requereix la degradació de la membrana basal vascular i la remodelació de la matriu extracel·lular per permetre a la cèl·lula endotelial migrar i envair el teixit circumdant. La seva alteració està implicada en processos patològics com l'artritis reumatoide, l'aterosclerosi i malalties del sistema nerviós central com l'esclerosi múltiple i malaltia d'Alzheimer. Actualment es coneixen més de 20 metal·loproteases humanes i les seves homòlogues en altres espècies. Històricament, les MMPs es dividien en col·lagenases, gelatinases, estromelisines o matrilisines en base a l'especificitat amb el component de la matriu extracel·lular que degraden. Avui en dia s'agrupen segons la seva estructura. A més de contribuir en el procés d'angiogènesi degradant els components de la matriu extracel·lular, les MMPs intervenen en el procés inflamatori. Tal i com passa amb altres factors inflamatoris, l'expressió de MMPs incrementa durant la conversió de l'endoteli d'un estat inactiu a un estat activat. En cèl·lules endotelials s'havia establert que la interacció CD40-CD40L induïx l'expressió de MMP1, MMP2, MMP3 i MMP9, implicades en la inestabilitat de la placa ateroscleròtica i ruptura d'aquests [264]. En el nostre treball realitzat al 2008 [197] es va determinar la inducció tardana de MMP10, també anomenada estromelisina-2 o transina-2, involucrada en la degradació dels col·làgens tipus III, IV, V, IX, X i de l'elastina, la fibronectina, la gelatina, la laminina i el proteoglicà. Es va descriure l'efecte de la via de senyalització de CD40 en el manteniment de la integritat vascular. S'ha descrit que un increment en l'expressió de MMP10 causa defectes cardiovasculars que inclouen dilatació i ruptura dels vasos sanguinis i una disminució del diàmetre de la paret del miocardi. Aquest augment va acompanyat de defectes en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula [265]. El balanç entre MMPs i l'activitat de inhibidors endògens de MMPs (TIMPs), altament expressats en cèl·lules endotelials, és crític pel manteniment de la integritat dels sistema vascular. Canvis en l'expressió de MMPs i TIMPs estan associats amb insuficiència cardíaca i dilatació ventricular [266]. En concret, MMP10 i TIMP1 han estat associats a aneurisme de l'aorta, que es caracteritza per un remodelatge destructiu de la matriu extracel·lular vascular i la ruptura de la part dels vasos sanguinis. De fet s'ha suggerit l'ús potencial de inhibidors de MMP10 en el restabliment de la funció cardíaca en aquests desordres.

Es va determinar inhibició de l'expressió a 10 i 16 hores d'estimulació de la via, mentre que no es veia efecte a 4 hores [197]. En els resultats que es presenten aquí es determina aquesta

## Discussió

absència d'efecte en estimular la via CD40-CD40L a 4 hores d'estimulació tant si el lligand es troba en estat soluble com unit a membrana.

### **Sistema de transport d'aminoàcids: LAT-1 o CD98**

El transport d'aminoàcids és un procés de gran transcendència metabòlica ja que regula el flux d'aminoàcids entre la cèl·lula i l'espai extracel·lular.

CD98 és una glicoproteïna de 125 kDa (GP125) formada per una cadena pesada de 85 kDa (CD98HC) [266, 267] i una cadena lleugera de 40 kDa, CD98LC [268]. L'antigen de CD98 s'expressa en limfòcits T i B, NKs, granulòcits, i en totes les línies cel·lulars humanes i cèl·lules tumorals transformades.

S'ha vist que CD98 modula els fluxes de calci dependents de sodi en múscul cardíac i esquelètic [269]. La proteïna de CD98 juga un paper regulador en sistemes de transport d'aminoàcids [270]. Mitjançant estudis realitzats amb ratolins *knock-out* per aquesta proteïna mostren defectes en l'adhesió cel·lular i en l'activació gènica induïda [271]. Aquestes cèl·lules són també molt sensibles a mort cel·lular per apoptosi provocada per la pèrdua d'adherència a substrat.

Juga un paper en la síntesi d'òxid nítric en cèl·lules endotelials HUVECs via transport de L-arginina i és requerit pel creixement cel·lular normal i neoplàsic. Està també implicat en el transport de L-DOPA a través de la barrera cervell-sang, i d'hormones tiroidees, triiodotironina (T3) i tiroxina (T4), a través de la membrana cel·lular en teixits com placenta. I intervé en l'homeòstasi i toxicitat d'ions metàl·lics [272]. S'expressa de manera ubiqüa en ronyó, placenta i testis i nivell més dèbil en timus. Expressat en HUVECs i en baixos nivells en limfòcits T de sang perifèrica i en fibroblasts quiescents. També es troba expressat en fetge fetal, en el procés astrocític de gliomes astrocític primaris i en cèl·lules endotelials de la retina [272]. També se sap que està altament expressat en diversos tipus de cèl·lules cancerígenes [273].

S'ha vist que quan l'expressió de LAT1 es redueix a suprimir l'absorció d'aminoàcids, el creixement d'un tumor se suprimeix en un model de ratolí trasplantat amb càncer (Patent Núm. 2000-157286), i es considera així que la supressió de l'activitat de LAT1 és prometedora per a la teràpia de càncer.

Els nostres resultats mostren l'augment de l'expressió de LAT-1 en aquestes cèl·lules es produeix via CD40 en interaccionar amb mCD40L. Mentre que la seva expressió no es veu afectada en tractar activar la via CD40 amb sCD40L. Per tant en condicions proinflamatòries, es veuria augmentada la seva expressió donant lloc a un augment del transport d'aminoàcids, la qual cosa confirma el seu paper important en procés cancerigen.

## **Hemostàsia i coagulació sanguínia**

Després de la seva activació, les cèl·lules endotelials adquireixen un estat procoagulant i vasopressiu característic del procés inflamatori. Els resultats d'aquest estudi juntament amb el que es va publicar en el nostre grup amb anterioritat [197] indiquen que CD40 influencia també aquests processos regulant l'expressió de gens implicats en el manteniment de l'homeòstasi vascular com Apelin, involucrada en el control de la pressió sanguínia, i Trombomodulina i SERPINDI (*Serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1*), involucrades en la unió de trombina i en la seva inhibició respectivament.

El gen més inhibït com a conseqüència de la senyalització via CD40 durant interacció de les cèl·lules endotelials amb els limfòcits T va ser *AGTRL1 ligand gene APLN*, que codifica per a l'Apelin. Entre les funcions fisiològiques múltiples que s'estan atribuint a aquest pèptid bioactiu, s'ha suggerit que té un important paper en la regulació de la funció cardiovascular i en l'homeòstasi fluida. També es secreta en el calostre on tindria una funció reguladora de la resposta immune [274] i en els adipòcits on funcionaria com una hormona. S'ha descrit que els nivells d'Apelin en plasma es troben incrementats en obesitat i estan associats a resistència a insulina i hiperinsulinèmia [275]. Apelin s'ha detectat en plasma en diversos estudis, tot i que els seus nivells són més baixos del que s'esperaria en comparació amb la concentració d'altres pèptids presents en circulació sanguínia que funcionen com a hormones. Nivells augmentats d'aquest pèptid en plasma en les primeres etapes d'insuficiència cardíaca i en etapes posteriors de la malaltia o en casos d'insuficiència cardíaca severa, tindria lloc una disminució dels nivells d'Apelin [276], possiblement reflectint una disfunció de l'endoteli que allibera el pèptid.

Un estudi de la distribució d'Apelin humana en diferents teixits descriu l'Apelin en cèl·lules endotelials d'endocardi, artèries i venes [277]. En la cèl·lula endotelial s'ha descrit el paper d'Apelin com a agent mitogènic, quimiotàctic i proangiogènic [278].

La inhibició de l'expressió del pèptid Apelin en aquestes cèl·lules es produeix via CD40 en interaccionar amb les dues isoformes del lligand, mCD40L i sCD40L. En estudis previs es mostra aquesta inhibició de l'expressió en cèl·lules endotelials en entrar en contacte amb les citoquines proinflamàtores TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  [197] on es postula també que la disminució de la regulació de l'apelin endotelial en un ronyó trasplantat inflammat és un factor major de disfunció de l'homeòstasi fluida associada amb el rebuig de trasplantament renal [197].

Els nostres resultats indiquen que la senyalització de CD40 dona lloc a una disminució de la regulació del pèptid vasoactiu de l'apelin en cèl·lules endotelials i confirmen la rellevància d'aquest pèptid en els processos immunoinflamatoris.



### **6.2. CÈL·LULES DENDRÍTIQUES**

Inicialment la immunologia s'havia enfocat en els antígens i en els limfòcits, però aquests no són suficients per induir immunitat. Recentment s'ha comprès la importància i versatilitat de les cèl·lules dendrítiques (CDs), ja que abans es pensava que l'únic paper de les CDs era la inducció de la resposta adaptativa, però avui en dia se sap que són importants mitjancers en la tolerància perifèrica i en el manteniment de l'homeòstasi immune [279]. A més, han aparegut noves teràpies basades en l'ús de les CDs, que busquen estimular o suprimir la resposta immune en diverses malalties com al·lèrgia, asma, trasplantament, infecció, càncer i autoimmunitat [280].

Les CDs són cèl·lules presentadores d'antigen (APCs) professionals que juguen un paper principal en la iniciació de la resposta immune primària i secundària. Es troben en diferents estats funcionals. En estat immadur resideixen en teixits no limfoides i posseeixen una alta capacitat per capturar i processar l'antigen. Les CDi són altament fagocítiques i expressen nivells baixos de molècules coestimuladores com CD40, CD80 i CD86 [281, 282, 105]. Sota l'estimulació per productes patogènics o senyals activadores, CDi incrementen transitòriament la seva capacitat fagocítica [283] i ràpidament pateixen un canvi fenotípic. Aquest canvi està caracteritzat per un increment en l'expressió de molècules MHC, de molècules coestimuladores com a CD80 i CD86 ([284, 285], i la subsegüent disminució de la regulació de la seva habilitat per incorporar antígens. A més s'incrementa la seva capacitat per migrar cap a àrees de cèl·lules T dels teixits limfoides per al *priming* de les cèl·lules T [142, 105]. L'antigen és presentat com un complex pèptid-MHC classe I i/o II que és reconegut per cèl·lules T CD8+ i CD4+, respectivament.

Aquests canvis en les CDs apareixien per dotar-les amb una capacitat estimuladora superior de cèl·lules T, reforçant la idea que la immunogeneïtat està intrínsecament lligada a maduració [70]. Aquest model clàssic, conegut com a paradigma de la maduració de les CDs, suggereix que les CDi indueixen tolerància mentre que les CDm indueixen immunitat. Aquest punt de vista de desenvolupament de les CDs té un propòsit atractiu que és que l'estimulació sola de TCR no és suficient per generar respostes productives en les cèl·lules T.

Històricament, aquest model ha donat un important esquema per investigar la funció de les CDs, però interessantment té limitacions evidents [284]. Desviacions d'aquest model clàssic inclouen:

- a) pobra correlació entre els estats d'activació *in vivo* de les CDs (CDs migratòries apareixen constitutivament madures, fins i tot en absència d'infecció o altres factors estimuladors, mentre que CDs desenvolupades en teixits limfoides són relativament immadures);
- b) Pobra correlació entre l'estat de maduració i la inducció d'immunitat (per exemple proliferació de cèl·lules T és la via comuna d'unió entre CDs-cèl·lules T que precedeix la inducció tant de la immunitat com de la tolerització de les cèl·lules T);
- c) Diferències en l'origen i l'estat d'activació de les CDs poden donar lloc al desenvolupament de cèl·lules T polaritzades. Així, les CDs no existeixen en un simple estat funcional *on* o *off* però les CDi pateixen una progressiva diferenciació en resposta a estímuls endògens (citoquines, hormones o cèl·lules apoptòtiques) o exògens (patògens virals o bacterians) que provoquen qualitats efectores en les CDs (producció de citoquines) que guien el màxim objectiu efector per les cèl·lules T.

Gran part dels treballs realitzats en cèl·lules d'origen humà han abordat l'estudi de les CDs en base al model de CDs derivades de monòcit (MDDC). L'ús preferent d'aquest model respon, probablement, a la dificultat d'obtenir CDs o els seus precursors en sang perifèrica a causa de la seva escassetat. No obstant, el model MDDC és molt interessant per dues raons clau: 1) s'ha demostrat *in vivo* que alguns estímuls influencien la diferenciació de monòcits a CDs, per tant es tracta d'un model "fisiològic"; 2) qualsevol teràpia cel·lular que utilitzi CDs ha de basar-se en el model MDDC per qüestions merament numèriques.

Les CDs obtingudes amb medi sintètic de cultiu poden madurar en rebre estímuls maduratius durant 24 hores amb la barreja de citoquines que s'ha demostrat més eficaç (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  i PGE<sub>2</sub>). Aquesta maduració és molt similar a la que s'aconsegueix amb cultius suplementats amb sèrums exògens, respecte a l'expressió en superfície de molècules coestimuladores, encara que les cèl·lules immadures generades amb el medi sintètic tenen una menor expressió de CD40, CD80 i CD86. Es pot veure un augment molt significatiu de les molècules coestimuladores CD40, CD80 i CD86, l'expressió de nou de CD83, com a molècula que clarament defineix l'estat maduratiu de les CDs, encara que no es coneix la seva funció, i si te algun paper durant la presentació antigènica, com suggereix la seva funcionalitat en la generació de la resposta cel·lular [286]. També es pot veure un augment en l'expressió de les molècules de classe I i classe II (DR), aquest fenotip correspon a un estat on predomina la presentació d'antigen i la generació d'una resposta immunitària. L'elevada presència de CD80 i CD86 en la superfície de l'APC, fa que amb la interacció amb la cèl·lula T específica, la resposta generada sigui de tipus Th1.

## Discussió

La inhibició de molècules implicades en la maduració i activació de les CD és una de les estratègies importants per la manipulació de les CD per tal d'induir tolerància. Hi ha molts mètodes que indueixen tolerància de les CD *in vitro*. Per exemple, la modificació de les condicions de cultiu, el bloqueig de NF- $\kappa$ B i altres factors de transcripció i la prevenció de la maduració de les CD mitjançant agents farmacològics poden generar CD immadures o semimadures. L'ús d'anticossos, de proteïnes de fusió i oligonucleòtids antisentit per bloquejar molècules coestimuladores poden donar lloc a la generació de CD tolerogèniques.

Descobriments recents demostren que immunosupressors tradicionals com tacrolimus i ciclosporina A poden estimular la producció de CD tolerogèniques, resultant indirectament en una supressió immune [287, 288, 289, 290].

Manipulant genèticament les CD es pot aconseguir tolerància específica d'antigen i la inducció de cèl·lules T reguladores per citoquines Th2/Th3 (IL-10, TGF- $\beta$ ), i lligand Fas, CTLA-4 (un lligand de proteïnes Notch) [291].

En aquest estudi, es va estudiar l'efecte de dos reguladors del sistema del complement, C4BP i el Factor H, en els processos de diferenciació i maduració de les CD.

### *6.2.1. Cèl·lules dendrítiques i els reguladors del sistema del complement*

El sistema del complement és un component clau de la immunitat innata. A més de ser un sistema de protecció front microorganismes invasors a través de les seves activitats opsonitzants, inflamatòries i lítiques, també incrementa la immunitat adquirida i participa en el procés d'eliminació de cèl·lules apoptòtiques.

#### **Paper de la proteïna C4BP en la diferenciació/maduració de les cèl·lules dendrítiques**

S'ha suggerit que la senyalització via CD40 pot alterar-se per canvis en les respostes immunes innates. Així, Brodeur i col·laboradors han demostrat que la proteïna C4BP, un component regulador del sistema del complement present en circulació [19], és capaç d'unir-se directament al receptor CD40 i activar les cèl·lules B induint la seva proliferació, la sobreexpressió de CD54 (ICAM-1) i CD86, així com el canvi d'isotip IgE depenent de IL-4 [180]. Pel contrari, un altre estudi recent en colangiòcits suggereix que C4BP s'uneix indirectament a CD40 en formar un complex amb CD40L, la qual cosa permetria modular la senyalització CD40-CD40L per prevenir l'apoptosi de dites cèl·lules [181]. Per altra banda, tant C4BP com CD40 poden unir-se a antigens bacterians [19, 292, 293, 294]. Per tant, la interacció C4BP-CD40 podria relacionar respostes immunes innates i adquirides. A més, s'ha descrit que altres proteïnes del complement com C1q són capaces de regular la senyalització

LPS/TLR en CDs [295]. Es desconeix la influència de C4BP en l'activació d'altres APCs, com les CDs, cèl·lules endotelials, etc...i el seu efecte en la senyalització via CD40. Donat que C4BP sembla exercir un paper rellevant en el procés de maduració de les cèl·lules B, la interacció de C4BP amb les CDs, ja sigui via CD40 i/o mitjançant altres receptors de membrana, és plausible que pugui també afectar als processos de diferenciació i/o maduració de dites cèl·lules, com suggereixen els nostres resultats. De fet, en els últims anys s'han descrit diferents citoquines (IL-21, VIP,...) [296, 297] i altres biomolècules (Vitamina D3 (1,25-dihydroxyvitamin D3, calcitriol) [298], mitomicina C [299]...) capaces de regular l'activació i/o maduració de les CDs. Alternativament, molt recentment s'han descrit molècules que exerceixen una regulació molt més subtil i específica de la conversió a CDs tolerogèniques. Concretament, tant les hormones activina A i inhibina A [300], com certs oligonucleòtids [301] semblen induir un estat semimadur a les CDs, que es caracteritzen fonamentalment per una inhibició de l'expressió de HLA-DR, sense influir significativament en l'expressió d'altres marcadors com CD40, CD83 i CD86.

En aquest sentit, s'ha indicat que una disminució de l'eficiència del sistema del complement (concretament de l'expressió de la cadena alfa de la proteïna C4BP) podria resultar un factor clau en la reducció de la funció immune que s'observa amb l'edat [302].

Un dels objectius principals d'aquesta tesi ha estat analitzar la resposta de les CDs a la proteïna reguladora del complement C4BP, un lligand alternatiu de CD40, recentment caracteritzat [180]. Hem observat que la seva cadena alfa (C4BPA) mitjançant l'ús de la proteïna recombinant (rec $\alpha$ 6 $\beta$ 0) indueix un estat semimadur a les CDs, caracteritzat fonamentalment per una baixa expressió de CD83 i una reduïda internalització i processament d'antígens.

En tractar els monòcits amb la isoforma plasmàtica  $\alpha$ 7 $\beta$ 1 o amb la proteïna recombinant  $\alpha$ 6 $\beta$ 0, hem aconseguit obtenir CDs derivades de monòcits de sang perifèrica de donants sans després de 7 dies de cultiu en presència de GM-CSF i IL-4 caracteritzant-les fenotípicament i funcionalment en tres estats de maduració o diferenciació. L'estat immadur de les CDs es va obtenir per tractament en cultiu amb GM-CSF i IL-4. Aquestes posseeixen una alta capacitat fagocítica representada per la seva propietat d'endocitar ovalbúmina (DQ-OVA), baixos nivells d'expressió de la molècula coestimuladora CD83 i de CD40, alta secreció de citoquines antiinflamatòries com IL-10 i baixa producció de IL-12p70. Sota estimulació amb LPS d'*E. coli* durant 48 hores, les CDs mostren un fenotip madur, caracteritzat per una baixa capacitat d'endocitar ovalbúmina, una regulació positiva de CD40, CD86, CD83 i CD80, disminució en la secreció de IL-10 i un augment de IL-12p70. Resultats idèntics es van obtenir en tractar les

## Discussió

cèl·lules amb la isoforma plasmàtica de C4BP ( $\alpha7\beta1$ ). Finalment, es va obtenir un estat intermedi mitjançant la incubació amb la proteïna recombinant que exhibeix característiques fenotípiques indicadores d'un estat "semimadur". Aquesta última població tenia una expressió molt reduïda dels marcadors CD83, característic de les CDm, i CD1a, comparat amb l'expressió en les CDm, i podria correspondre a CDs amb característiques "reguladores" o "tolerogèniques". També es va observar una disminució de la capacitat endocítica de DQ-OVA. La diferència entre la isoforma  $\alpha7\beta1$  i  $\alpha6\beta0$  és que la primera és la proteïna plasmàtica completa purificada de sang perifèrica mentre que la segona és una proteïna recombinant a la qual li manca una cadena alfa i la cadena beta. Això ens fa pensar que l'absència de la cadena beta condiciona l'efecte observat i que la cadena alfa s'uniria d'alguna manera a les CDs donant lloc a l'estat "semimadur".

Aquest efecte no es va observar a nivell de la diferenciació ni de la maduració.

Veient l'efecte que produïa l'absència de la cadena beta de la proteïna C4BP en la diferenciació i maduració de les CDs, es va voler comprovar si aquest efecte era a causa de l'ús d'una proteïna recombinant. Per això, es va obtenir la isoforma plasmàtica purificada  $\alpha7\beta0$  de sang perifèrica i es van tractar les CDs des del començament del cultiu estimulants la seva maduració a dia 5 amb LPS. El resultat va ser l'obtenció d'una reducció més pronunciada del marcador de maduració CD83, i de les molècules coestimuladores CD80 i CD1a.

També es va poder observar que el tractament amb aquestes proteïnes no afectava la viabilitat cel·lular ja que donava percentatges de cèl·lules vives equivalents a les CDi i les CDm.

Amb aquests resultats podem deduir que, a causa del tractament amb la isoforma  $\alpha7\beta0$ , el reconeixement antigènic no induiria la diferenciació cap a limfòcits T al·logènics, produint-se d'aquesta manera, la tolerància a antígens.

Un altre dubte que es va plantejar era si el mètode de purificació dels monòcits de sang perifèrica afectava als resultats obtinguts. Es van obtenir monòcits de sang perifèrica purificats per adherència a la placa i per boles magnètiques mitjançant un anticòs anti-CD14 que és un marcador característic de la població monocítica. Tant els resultats fenotípics obtinguts com les viabilitats en ambdós casos van ser equivalents. Per tant, es va poder comprovar que el mètode de purificació no afectava als resultats observats.

A partir d'aquí els nostres estudis es van centrar en estudiar l'efecte d'aquestes proteïnes en els processos de diferenciació i maduració.

També es van determinar la morfologia de les CDs mitjançant microscopia d'escombratge veient que les CDi tenen la típica forma estelada, que els ve donada per uns

processos citoplasmàtics anomenats dendrites que sobresurten del cos de la cèl·lula. En les cèl·lules vives, aquestes projeccions estan en constant moviment, retorçant-se, contraient-se i tornant-se a estendre pel costat contrari [70]. En tractar les cèl·lules amb la isoforma plasmàtica purificada  $\alpha 7\beta 0$  durant la diferenciació i maduració s'observen aquestes mateixes característiques. En aquesta fase immadura, les cèl·lules també tenen una gran quantitat de vesícules endocítiques riques en proteïnes lisosomals. Aquest fenotip immadur es caracteritza per l'escassetat de proteïnes del MHC i l'absència completa de molècules B7 coestimuladora. Durant la seva migració cap als òrgans limfàtics secundaris, després d'haver capturat un antigen durant una infecció, la morfologia de les cèl·lules dendrítiques canvia i perden la capacitat de fagocitar i de processar antigens. Les dendrites es transformen en plects i projeccions membranals semblants a vels, per la qual cosa se les anomena cèl·lules veliformes [303, 304]. En alguns casos, sembla que les CDm estiguin polaritzades. Aquestes característiques són les que s'han pogut observar en les CDm i en tractar les CDs amb la isoforma plasmàtica purificada  $\alpha 7\beta 1$  durant tot el cultiu i estimulant la seva maduració amb LPS.

### ***Significats funcionals de les alteracions fenotípiques***

En aquest apartat de la discussió general es relacionen les alteracions fenotípiques que s'han observat en presència de les isoformes  $\alpha 7\beta 0$  i  $\text{re}\alpha 6\beta 0$  amb el resultat obtingut d'inhibició de la capacitat estimuladora de les CDs tractades amb aquestes sobre els limfòcits. Es comentaran exclusivament els canvis fenotípics que s'han produït sobre CDm ja que són les úniques que poden relacionar-se amb les proliferacions limfocitàries.

### **CD80/CD86**

Tant l'antigen CD80 com el CD86 són lligands de CD28 i també de CTLA-4 (CD152) [305, 306, 307]. CD28 és un receptor de limfòcits la senyalització del qual és essencial a l'hora de produir IL-2 i activar la proliferació limfocitària. CTLA-4 (CD152) és un altre membre de la família del CD28 que s'expressa després de l'activació limfocitària i indueix un senyal negatiu en el limfòcit T activat oposant-se així directament a l'acció de CD28. Els antigens CD28 i CTLA-4 exerceixen papers crucials però oposats en l'estimulació de les cèl·lules T. Tots dos comparteixen dos lligands, CD80 i CD86, que són expressats per les APCs. Fins fa poc no es coneixia amb exactitud com era el paper que cadascun d'aquests lligands exercia sobre la resposta limfocitària. Se sap que tots dos són capaços d'activar CD28 encara que

## Discussió

CD86 s'uneix a CD28 amb major afinitat que CD80. També se sap que en absència d'un d'ells, l'altre és capaç d'activar la resposta. Així doncs, són complementaris però al mateix temps i, paradoxalment, els dos lligands han estat identificats com els responsables de la unió a CTLA-4 i, per tant, també de la regulació negativa de la resposta immune.

Treballs molt recents han aconseguit aclarir, parcialment almenys, aquesta paradoxa. En les poblacions limfocitàries existeixen una sèrie de poblacions minoritàries (5-15%) compostes per limfòcits reguladors. En concret, se sap ara que la població reguladora CD25<sup>+</sup> T CD4 és capaç de frenar la resposta limfocitària gràcies a la seva unió a CD80/CD86. En aquesta població reguladora els dos lligands B7 desenvolupen papers diferenciats. CD80 s'uneix a CTLA-4, la qual cosa incrementa la capacitat supressora del limfòcit regulador. D'altra banda CD86 s'uneix a CD28, inhibint la capacitat supressora del limfòcit i, alhora, enviant al mateix un senyal de proliferació o de supervivència [308]. D'aquesta forma, en presència de CDi, les quals no expressen CD86 però sí una mica de CD80, l'activitat que prevaldria seria la supressora. Això explicaria el paper d'aquestes cèl·lules en processos de tolerància i la seva incapacitat per desencadenar respostes immunes. D'altra banda, en presència de CDm, les quals expressarien grans quantitats de CD86, l'activitat supressora dels limfòcits reguladors es trobaria parada i el seu nombre s'estaria incrementant bé perquè proliferen o bé perquè augmenta el seu temps de supervivència.

$\alpha 7\beta 0$  i  $\text{reca}6\beta 0$  forcen descensos en els nivells de CD86 en les CDm. S'ha suggerit que la disminució de CD86 pot inhibir l'activitat supressora dels limfòcits T reguladors, com s'ha pogut comprovar en estudis realitzats amb dexametasona, amb la qual cosa s'obtidrien respostes immunes menys intenses a causa que aquests limfòcits es trobarien més actius [309]. S'ha vist que l'addició de dexametasona durant la diferenciació dels monòcits a CDs redueix l'expressió de MHC-II, CD80/86 i CD83 amb la conseqüent disminució de la proliferació de cèl·lules T en un cultiu mixt limfocitari. Al mateix temps, els descensos en CD86 també actuarien sobre els limfòcits activadors disminuint el seu grau de coestimulació i contribuint a produir respostes immunes menys intenses. Aquest efecte també es van poder observar en estudis realitzats amb vitamina D3 la qual vé acompanyada amb una reducció de CD40 [310].

## **CD83**

CD83 en un clar marcador de maduració en CDs. És necessari perquè aquest procés es desenvolupi correctament i, encara que la seva funció no ha estat completament elucidada, se sap que CD83 també és necessari per a l'activació de la proliferació de cèl·lules T [311, 312,

286]. Per tant una menor expressió de CD83 implica l'obtenció de CDs menys madures i amb menor capacitat de coestimulació limfocitària pel que, lògicament, les proliferacions limfocitàries haurien de ser menys intenses. Estudis realitzats amb cortisol mostren que la seva addició als monòcits durant la diferenciació a CDs inhibeix l'augment de l'expressió de CD83, acompanyat de reducció de la producció de IL-12 i de la capacitat al·loestimuladora en resposta a estímuls maduratius (TNF- $\alpha$ ) [313]. Aquests efectes també es van trobar en estudis realitzats amb dexametasona com s'ha comentat amb anterioritat [309] i amb vitamina D3. Aquest mateix efecte va ser l'observat en tractar les CDs amb  $\alpha 7\beta 0$  i  $\text{re}\alpha 6\beta 0$  que provoquen en la CD madura un descens significatiu de CD83 en superfície.

### **MHC II**

Per reconèixer a l'antigen les cèl·lules han d'establir contacte amb les APCs mitjançant la formació de les anomenades sinapsis immunològiques on s'uneixen receptors TCR i molècules coestimuladores amb molècules MHC [314]. La durada i magnitud de la unió sinàptica determina la intensitat de l'estimulació que es produirà. La maduració de la CD implica bàsicament una transformació de cèl·lula capturadora d'antigen a cèl·lules presentadora del mateix [315]. Per aconseguir-ho, són necessàries grans quantitats de MHC II en superfície de manera que s'assegurin així processos sinàptics prou intensos. Estudis realitzats amb vitamina D3 en cultius de monòcits en la etapa inicial de cultiu mostren un bloqueig parcial en la diferenciació cap a CDs inmadures. En cultius de CDs inmadures inhibeix la maduració, amb disminució de l'expressió de molècules coestimuladores i pot revertir parcialment la diferenciació [316]. Aquest efecte no va ser observat en tractar els monòcits amb les isoformes  $\alpha 7\beta 0$  i  $\text{re}\alpha 6\beta 0$ .

### **CD1a**

Les fortes caigudes en CD1 que es produeixen en presència de  $\alpha 7\beta 0$  i  $\text{re}\alpha 6\beta 0$  impedeixen en principi l'activació de la població de limfòcits T restringits per a CD1 que, a diferència d'aquells que reconeixen el MHC, són autoreactius. Les cèl·lules T restringides per a CD1a, CD1b i CD1c en humans produeixen patrons de citoquines Th1 i són citolítiques. Aquestes cèl·lules poden ser importants en respostes antimicrobianes i poden contribuir significativament en les respostes antitumorals. El resultat de l'addició de  $\alpha 7\beta 0$  i  $\text{re}\alpha 6\beta 0$  als cultius és que una part de la població limfocitària, que contribueix activament mitjançant la secreció de citoquines, no s'activarà i la resposta immunitària llavors perdrà intensitat. Convé



## Discussió

ressaltar aquí que aquest mecanisme, la inhibició de CD1, és utilitzat amb èxit per un paràsit, *Leishmania Donaban*, el qual és capaç d'induir el descens de CD1 en les CDs de l'hoste prevenint així l'activació de les cèl·lules T restringides per CD1. Aconseguir evadir la presentació de CD1 podria ser una estratègia de *Leishmania* per evitar el reconeixement dels seus glicolípidis parasitaris abundants i impedir reaccions immunes contra ell [317]. Estudis realitzats amb vitamina D3 també mostren una reducció de l'expressió de CD1a [310].

### *Assajos funcionals*

El següent pas va ser determinar el seu efecte a nivell funcional. Per això es van realitzar assajos d'endocitosi mitjançada per receptor, assajos de migració i d'expressió del receptor CCR7 i assajos de cultiu mix limfocitari per determinar si l'efecte "tolerogènic" de les cèl·lules donava reducció de la proliferació dels limfòcits T.

#### 1. Endocitosi mitjançada per receptor

Les CDi tenen una capacitat d'endocitosi elevada ja que disposen de mecanismes per capturar microorganismes invasors, processar-los i presentar els antígens encaixats en les MHC-I i II quan aquestes es troben en estat madur. Mentre que les CDm perden la capacitat d'endocitar i processar antígens. Aquestes diferències es van observar en els assajos d'endocitosi mitjançada per receptor. Les CDi mostraven uns nivells d'endocitosi de DQ-OVA elevats, mentre que els de les CDm era molt baix. En tractar les cèl·lules amb les isoformes plasmàtiques purificades  $\alpha 7\beta 1$  i  $\alpha 7\beta 0$  i la proteïna recombinant  $\text{re}\alpha 6\beta 0$  i determinar el seu efecte en la diferenciació i maduració de les CDs, es va observar una endocitosi molt baixa, equivalent a l'obtinguda en les CDm. Per tant, les CDs tractades amb  $\alpha 7\beta 0$  o  $\text{re}\alpha 6\beta 0$ , tot i estar en un estat "semimadur" mostren nivells reduïts d'endocitosi. Cal dir que CDi diferenciades amb  $\alpha 7\beta 0$  ja mostren una lleugera disminució d'endocitosi.

Com s'ha comentat amb anterioritat, l'addició de vitamina D3 en un cultiu de monòcits durant la seva diferenciació a CDs dona lloc a cèl·lules "semimadures" que també tenen capacitat de captació d'antigen reduïda, tal i com s'ha observat en els nostres assajos [310].

#### 2. Assaig de migració i expressió de CCR7

Les CDs constitueixen les més potents APCs conegudes, exercint un paper fonamental en la resposta immune. Perquè aquesta resposta es dugui a terme adequadament, les CDs han de migrar cap als ganglis limfàtics, on presentaran antígens als limfòcits T. Aquesta migració depèn de l'expressió del receptor de quimioquines CCR7. Aquest receptor, que reconeix els

l·ligands CCL19 i CCL21, expressats a elevats nivells en els ganglis, regula mecanismes moleculars quimiotàctics responsables de dirigir les CD als ganglis. A part de la quimiotaxi, CCR7 regula en les CD la velocitat migratòria i la supervivència d'aquestes cèl·lules [150].

Es va realitzar un assaig de migració per comprovar si les cèl·lules tractades amb la isoforma plasmàtica  $\alpha 7\beta 0$  tenien disminuïda aquesta capacitat. Es va poder observar que no eren capaces de migrar en condicions favorables de migració ja que van ser estimulades amb la CCL21. Mentre que les CD tractades amb la isoforma  $\alpha 7\beta 1$  si que migraven en ser estimulades amb el lligand de CCR7, donant el mateix resultat que l'obtingut en les CDm.

També es va comprovar l'expressió de CCR7 a nivell de mRNA i de proteïna i es va observar una disminució en les cèl·lules tractades amb la isoforma plasmàtica  $\alpha 7\beta 0$  i la proteïna recombinant  $\alpha 6\beta 0$ , tant en cèl·lules purificades per adherència com per boles magnètiques. Aquesta baixa expressió també es pot veure en les CDi, mentre que les cèl·lules en estat madur i aquelles que van ser tractades amb la isoforma plasmàtica  $\alpha 7\beta 1$  van mostrar una expressió elevada.

### 3. Paper de les citoquines en la determinació de la resposta immune

Les citoquines TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  i IFN- $\beta$  són mediadores de la immunitat natural i del reclutament limfocitari necessari per a la resposta immune específica. Les respostes immunes específiques requereixen de l'activació i proliferació dels limfòcits T que són estimulats per la IL-2 i la IL-15. Les respostes immunes específiques s'han dividit clàssicament en funció dels mecanismes efectors implicats, en respostes mitjançades per cèl·lules i en respostes humorals. Les citoquines participen en la determinació d'aquests dos tipus de resposta immune. Les respostes mitjançades per cèl·lules requereixen que els limfòcits CD4 proinflamatoris estimulin el creixement i la diferenciació de limfòcits T citotòxics, així com l'activació dels macròfags. L'acció proinflamatòria d'aquests limfòcits és estimulada per la producció de les citoquines IL-12, IL-18, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i TNF- $\beta$ . En les respostes mitjançades per anticossos, els limfòcits T CD4 cooperen amb els limfòcits B estimulants la seva proliferació i diferenciació cap a cèl·lules productores d'immunoglobulines. L'acció cooperadora dels limfòcits CD4 és estimulada per les citoquines IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 i IL-14.

Les cèl·lules T cooperadores poden ser dividides en dos tipus, definits per diferents patrons de producció de diferents citoquines [318]. Els limfòcits T cooperadors de tipus 1 (Th1) produeixen IL-2, IFN- $\gamma$  i TNF- $\beta$ , i per tant, són els responsables de la promoció de les

## Discussió

respostes cel·lulars. Aquestes respostes van passar a denominar-se respostes immunes de tipus 1. Els limfòcits T cooperadors de tipus 2 (Th2) produeixen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13 i serien els responsables de la cooperació amb les cèl·lules B en les respostes humorals. Aquestes respostes es coneixen com a respostes immunes de tipus 2 [319]. En la Taula 22 es mostren els patrons de citoquines en cada un dels tipus de resposta, Th1 o TH2.

<b>TAULA 22. Patrons Th1 i Th2 de secreció de citoquines</b>		
<b>Citoquina</b>	<b>Th1</b>	<b>Th2</b>
IL-2	++	-
IFN- $\gamma$	++	-
IL-12	++	-
TNF- $\beta$	++	-
TNF- $\alpha$	++	+
GM-CSF	+	++
IL-3	+	++
IL-4	-	++
IL-5	-	++
IL-10	+	++

No obstant això, els estudis dels patrons de secreció en cèl·lules individuals humanes han demostrat que només un petit percentatge dels limfòcits encaixa en les categories Th1 i Th2 [320, 321]. Els limfòcits T cooperadors humans presenten patrons de secreció de citoquines no excloents que freqüentment combinen la secreció d'alguna citoquina tipus 1 amb la d'una altra tipus 2. Per exemple, la IL-10, una citoquina Th2 per excel·lència, és produïda tant per limfòcits T productors de IL-4, com pels productors de IFN- $\gamma$  [321]. Encara que les cèl·lules T que secreten IL-4 no solen secretar IFN- $\gamma$  i viceversa, existeixen cèl·lules que secreten qualsevol de les combinacions de la resta de citoquines segons patrons d'associació aleatoris [322]. Per tant, podem concloure que encara que existeixen respostes de tipus 1 i de tipus 2 ben diferenciades, aquestes no es basen (almenys en l'espècie humana) en el predomini de dos tipus de clons Th1 o Th2, sinó en el predomini de clons productors de IL-4 o IFN- $\gamma$ .

Finalment, l'acció reguladora de les citoquines sobre les respostes immunes també pot ser negativa. Existeixen citoquines inhibidores com TGF- $\beta$  i IL-1Ra, així com formes solubles dels receptors, que inhibeixen específicament l'acció de les citoquines a les quals s'uneixen. Així mateix, es produeixen relacions d'antagonisme recíproc. Les citoquines IL-4 i IL-10 inhibeixen els efectes de IL-12 i IFN- $\gamma$ , i aquests al seu torn inhibeixen els efectes de les primeres.

### **Polarització de la resposta per les APCs**

Per respondre de manera apropiada als diferents patògens, el sistema immune selecciona entre diferents tipus de respostes antígen-específiques que són mitjançades per cèl·lules efectores funcionalment polaritzades (Th1, Th2 i Th3) que es diferencien a partir de cèl·lules novençanes precursoras de cèl·lules cooperadores. Les APCs que endociten i presenten els antígens dels patògens aporten senyals polarizants. Aquests senyals polaritzen als limfòcits T reconeixadors d'aquests antígens presentats per elles. Les CDs són cèl·lules sentinelles situades en llocs potencials d'entrada de patògens. Aquestes cèl·lules comproven el seu entorn i s'activen per la unió de les molècules dels patògens als seus receptors per a PAMP. Els mediadors endògens com el IFN- $\gamma$  i la PGE<sub>2</sub> també contribueixen a la polarització de les CDs cap a CD1 (inductores de limfòcits Th1) i CD2 (inductores de limfòcits Th2) respectivament.

Aquestes cèl·lules CD1 produeixen IL-12 i indueixen diferenciació de limfòcits T cap a limfòcits cooperadors productors de IFN- $\gamma$ . Les CD2 no produeixen IL-12, sinó que produeixen IL-10 i indueixen diferenciació de limfòcits T cap a limfòcits cooperadors productors de IL-4.

Els nostres resultats van mostrar una expressió elevada de IL-10 en les cèl·lules tractades amb la isoforma plasmàtica purificada  $\alpha 7\beta 0$  i la proteïna recombinant rec $\alpha 6\beta 0$ , respecte a les CDm i a les CDs tractades amb  $\alpha 7\beta 1$  durant el seu procés de diferenciació i maduració. IL-10 és probablement el millor exemple de proteïna immunomoduladora que promou la inducció de cèl·lules T reguladores. Una propietat important de IL-10, des d'una perspectiva immunomoduladora, és la seva capacitat per inhibir les cèl·lules Th1. La inhibició de la via cel·lular Th1 per IL-10 és mitjançada per diversos mecanismes, incloent inhibició de la producció de IL-12 per part de les APCs, i bloquejant la síntesi de IFN- $\gamma$  per cèl·lules T diferenciades [323]. Aquesta inhibició de la producció de IL-12 és la que també es pot observar en tractar les CDs amb la isoforma plasmàtica purificada  $\alpha 7\beta 0$  i la proteïna recombinant rec $\alpha 6\beta 0$ , respecte a les CDm i a les CDs tractades amb  $\alpha 7\beta 1$  durant el seu procés de diferenciació i maduració, les quals secreten grans quantitats d'aquesta citoquina. Aquesta característica també s'ha pogut observar en estudis realitzats en tractar els monòcits amb cortisol durant el procés de diferenciació dels monòcits a CDs [313].

IL-10 inhibeix fortament citoquines proinflamatòries com IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  i GM-CSF, a més a més de reduir l'estrès oxidatiu donant lloc a l'activació de macròfags humans i de ratolí. En els nostres estudis es va poder veure que hi havia una disminució de la secreció de les citoquines IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  en tractar les CDs amb  $\alpha 7\beta 0$  i rec $\alpha 6\beta 0$ , respecte

## Discussió

a les CDm i a les CDs tractades amb  $\alpha 7\beta 1$  durant el seu procés de diferenciació i maduració, les quals secreten grans quantitats d'aquestes citocines.

Les fortes propietats antiinflamatòries intrínseques de IL-10 es veuen augmentades per la seva capacitat d'induir cèl·lules T reguladores. En particular, la presència d'IL-10 durant la diferenciació de cèl·lules T CD4<sup>+</sup> resulta en el desenvolupament d'un subconjunt definit de cèl·lules T reguladores (Tr1) caracteritzades per una proliferació baixa, absència de producció d'IL-2, i un específic perfil de citocines caracteritzat per la producció de IL-10 i IFN- $\gamma$  però no de IL-4 ni IL-5 [324].

Els nostres resultats són molt semblants als observats en estudis realitzats amb la vitamina D3 com s'ha comentat anteriorment [316]. La seva acció inhibidora és deguda a la interferència en les vies de senyalització que porten a la producció de citocines; puntualment inhibeix la transcripció de IL-12 en les CDs i macròfags. Aquesta inhibició s'acompanya d'un augment de la producció de IL-10, que causa disminució de l'activitat de cèl·lules T. La falta de diferenciació i maduració de les CDs, així com la modulació de la seva activació, porta a l'aparició de CDs amb un fenotip tolerogènic. Aquests efectes s'observen *in vivo* en models experimentals amb trasplantaments al·logènics. En tractaments curts amb vitamina D3, l'hormona és responsable d'induir limfòcits T reguladors CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, cèl·lules que serien responsables d'intervenir en la tolerància als trasplantaments [325, 326].

També s'ha pogut observar que la producció de la citocina proinflamatòria IFN- $\gamma$ , la funció principal de la qual és l'activació dels macròfags, tant en les respostes immunitàries innates com les respostes cel·lulars adaptatives, durant el procés de diferenciació i maduració de les CDs és totalment absent en tractar les cèl·lules amb  $\alpha 7\beta 0$  i  $\alpha 6\beta 0$ . Mentre que les CDm i les CDs tractades amb  $\alpha 7\beta 1$  secreten grans quantitats d'aquesta citocina.

És possible que aquestes funcions inhibidores d'IL-10 i de les citocines relacionades puguin trobar aplicacions terapèutiques, i la seva activitat modulant les funcions de les APCs i promovent el desenvolupament de cèl·lules T reguladores suggereix un possible ús en el tractament de malalties autoimmunes [327]. Donant suport a aquesta hipòtesi, un estudi realitzat en un model de colitis severa va mostrar que aquesta era abolida en realitzar l'administració sistèmica de IL-10 però, interessantment, no d'IL-4. A més a més, el tractament amb IL-10 pot millorar el lupus de ratolí mitjançant inhibició de citocines Th1 patogèniques [323]. El tractament d'IL-10 està actualment provant-se en condicions inflamatòries múltiples, incloent-hi l'artritis reumatoide, malaltia d'intestí inflamatòria, psoriasi, rebuig d'alloempelts i hepatitis C crònica [327].

#### 4. Indoleamine 2,3-dioxygenase

Un mecanisme pel qual les CDs poden regular respostes T cel·lulars és mitjançant l'expressió de *indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO), l'enzim limitant del catabolisme de triptòfan. CDs transgèniques per IDO disminueixen la concentració de triptòfan, augmenten la concentració de kynurenina, el metabòlit principal de triptòfan, i suprimeixen la proliferació de cèl·lules T al·logèniques *in vitro*, perquè els catabolits suppressius del triptòfan exerceixen una acció citotòxica preferentment en cèl·lules T activades [328]. Encara que el concepte que les cèl·lules que expressen IDO puguin suprimir respostes de cèl·lules T i promoguin tolerància és un paradigma relativament nou en la immunologia, l'evidència dona suport a aquesta possibilitat, incloent-hi estudis sobre tolerància maternal al fetus, resistència de tumors, infeccions cròniques i malalties autoimmunes [328, 329]. En particular, CDs que expressen IDO contribueixen a la generació i manteniment de la tolerància perifèrica eliminant cèl·lules T autoreactives [328, 329]. IDO també intervindria en la regulació de la síntesis de prostaglandines [330].

Així, l'expressió induïble d'IDO sembla jugar un paper important induint CDs tolerogèniques, i la seva modulació té aplicacions terapèutiques potencials.

Aquesta característica no es va observar en els nostres estudis ja que en tractar les CDs amb  $\alpha 7\beta 0$  es va determinar una disminució de l'expressió del gen que codifica per IDO. Mentre que si que es va induir la seva expressió en CDs tractades amb  $\alpha 7\beta 1$  i en les CDm.

#### 4. miRNA155 o BIC-1

Els MicroRNAs (miRNAs) són RNAs no codificants que poden regular l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes a nivell posttranscripcional durant l'emparellament de bases amb la regió 3'UTR del mRNAs diana [331]. Hi ha evidències creixents que suggereixen que els miRNAs regulen una gamma àmplia de processos biològics, incloent aquells que connecten amb càncer i immunitat.

miRNA-155 (microRNA155, miR-155) ha emergit com un regulador essencial de la fisiologia cel·lular; especialment important en el sistema immunitari dels mamífers [332, 333, 334]. Per exemple, miRNA-155 es detecta durant un resposta immunitària en cèl·lules B madures activades i en limfòcits T [335], cèl·lules B dels centres germinals [332], i monòcits [336]. Ratolins knock-out BIC/miR-155 van donar lloc a una resposta immunitària deteriorada i la producció de citoquines [332], donant suport al paper vital de miR-155 en immunologia. En el càncer, la desregulació de miR-155 està implicada en un ampli rang de malignitats incloent-hi diverses formes de limfoma i carcinomes de pit, pulmó, pàncrees, cap i coll, i ronyó

## Discussió

[337, 338, 339, 340, 341]. En immunologia i limfoma, miR-155 ha estat extensament investigat; tanmateix, és evident que l'expressió de miR-155 és elevada en càncer de pit [339, 341], contribuint a la quimioresistència [342].

En els nostres estudis en tractar les CDs amb  $\alpha 7\beta 0$  es va determinar una disminució de l'expressió del gen que codifica per BIC-1, tant en cèl·lules purificades per adherència a la placa com per boles magnètiques. Mentre que si que es va trobar expressió en CDs tractades amb  $\alpha 7\beta 1$  i en les CDm.

### 5. Cultiu mixt limfocitari

Una de les propietats més analitzades en la literatura de les CDs és la seva capacitat de generar una forta resposta al·logènica en cultiu mixt, resposta que possiblement depengui de l'elevat nivell d'expressió de molècules coestimuladores quan maduren i en menor mesura de la producció de determinades citoquines per les CDs en maduració. Malgrat és una prova àmpliament utilitzada per la caracterització d'aquestes cèl·lules, només dóna idea de la seva capacitat immunogènica, però no ens dóna cap tipus d'informació sobre si hi ha processament i presentació d'antigen.

La maduració de les CDs amb LPS genera cèl·lules madures amb una elevada capacitat al·loestimuladora. Aquesta propietat, depenent en part de l'expressió de molècules de coestimulació, s'inhibeix en presència de  $\alpha 7\beta 0$ , que també inhibeix l'expressió de molècules de coestimulació, implicades en la presentació antigènica. Com a control positiu s'ha utilitzat la Vitamina D3 [310], molècula coneguda per donar un fenotip de CDs semimadures amb una disminució de la seva capacitat al·loestimuladora. De manera que  $\alpha 7\beta 0$  podria estar implicada en la semimaduració de les CDs.

### **Cèl·lules dendrítiques i els mutants de la cadena $\alpha$ de C4BP**

Un dels objectius d'aquest estudi es basa en caracteritzar els requeriments estructurals de C4BP per la seva unió a les CDs utilitzant els mutants recombinants que tenen absència d'un dels dominis individuals. La conformació elongada de la cadena C4BP $\alpha$  i el fet que estan exclusivament organitzades en dominis individuals la fa particularment adient per aquest tipus d'estudi [211]. Per un total de 8 mutants estudiats, CCP6 és el més important en la unió amb les CDs essent crucial per a la inhibició de la maduració d'aquestes cèl·lules i deixar-les en un estat de tolerància immunològica.

En tractar els monòcits amb els mutants recombinants de la cadena C4BP $\alpha$ , hem aconseguit obtenir CDs derivades de monòcits de sang perifèrica de donants sans després de 7

dies de cultiu en presència de GM-CSF i IL-4 caracteritzant-les fenotípicament i funcionalment en tres estats de maduració o diferenciació. L'estat immadur de les CDs es va obtenir per tractament en cultiu amb GM-CSF i IL-4, posseeixen baixos nivells d'expressió de la molècula coestimuladora CD83 i baixa producció de IL-12p70. Sota estimulació amb LPS d'*E. coli* per 48 hores, les CDs mostren un fenotip madur, caracteritzat per una regulació positiva de CD83 i un augment de les citoquines IL-12p70, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ . Resultats idèntics es van obtenir en tractar les cèl·lules amb el mutant recombinant  $\Delta$ CCP6. Finalment, es va obtenir un estat intermedi mitjançant la incubació amb la resta de mutants recombinants ( $\Delta$ CCP1,  $\Delta$ CCP2,  $\Delta$ CCP3,  $\Delta$ CCP4,  $\Delta$ CCP5,  $\Delta$ CCP7 i  $\Delta$ CCP8) que exhibeixen característiques fenotípiques indicadores d'un estat semimadur. Aquestes poblacions tenien una expressió molt reduïda del marcador CD83, característic de les CDm, comparat amb l'expressió en les CDm, i podrien correspondre a CDs amb característiques reguladores o tolerogèniques. La diferència entre els diferents mutants recombinants és que els manca un dels dominis individuals de la cadena alfa de la proteïna C4BP. Això ens fa pensar que la presència del domini 6 de la cadena alfa en el mutant recombinant  $\Delta$ CCP6, podria ser el responsable del fenotip semimadur que s'observa en la resta de mutants estudiats.

També es va comprovar aquest efecte utilitzant un estímul maduratiu diferent al LPS per determinar si s'obtenien els mateixos resultats. El còctel d'estimulació utilitzat va ser l'extracte bacterià Ribomunyl combinat amb IFN- $\gamma$  i rHusCD40L/TRAF. S'ha pogut comprovar que també es dona disminució del marcador de maduració CD83 en tractar les cèl·lules amb el mutant recombinant  $\Delta$ CCP8 i combinat amb aquest còctel. En tractar les CDs amb el mutant  $\Delta$ CCP6 s'obté una expressió elevada de CD83, equivalent a les CDs madurades amb el còctel Ribomunyl.

També es va determinar la morfologia d'aquests tipus de CDs generades mitjançant microscopia d'escombratge. Les CDi tenen la típica forma estelada, amb les dendrites que sobresurten del cos de la cèl·lula. En tractar les cèl·lules amb els mutants recombinants  $\Delta$ CCP4 i  $\Delta$ CCP8 durant la diferenciació i maduració s'observen aquestes mateixes característiques. Les dendrites de les CDm es transformen en plects i projeccions membranals, que els dona aparença més allargada. Aquestes característiques són les que s'han pogut observar en les cèl·lules tractades amb el mutant recombinant  $\Delta$ CCP6 durant tot el cultiu i estimulants la seva maduració amb LPS.



## Discussió

### *Assajos funcionals*

#### 1. Paper de les citoquines en la determinació de la resposta immune

Els nostres resultats van mostrar una expressió disminuïda de IL-12p70 en les cèl·lules tractades amb el mutant recombinant, respecte a les CDm i a les CDs tractades amb el mutant  $\Delta$ CCP6 durant el seu procés de diferenciació i maduració.

També s'ha pogut observar que la producció de les citoquines proinflamatòries IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  durant el seu procés de diferenciació i maduració de les CDs és totalment absent en tractar les cèl·lules amb  $\Delta$ CCP8. Mentre que les CDm i les CDs tractades amb  $\Delta$ CCP6 secreten grans quantitats d'aquestes citoquines.

#### 2. *Indoleamine 2,3-dioxygenase*

En tractar les CDs amb els mutants recombinants  $\Delta$ CCP6 i  $\Delta$ CCP8 es va determinar una elevada expressió del gen que codifica per IDO, mentre que en la resta de mutants es va observar una expressió disminuïda respecte a les CDm i comparable a les CDi.

Per tant, tenint en compte tots els resultats descrits es pot concloure que en analitzar la resposta de les CDs a la proteïna reguladora del complement C4BP, descrit també com a lligand alternatiu de CD40, la seva cadena alfa sembla induir un estat semimadur en aquestes cèl·lules caracteritzat per una baixa expressió del marcador de maduració CD83 i de les molècules coestimuladores CD86, CD80 i CD1a, una reduïda internalització i processament d'antígens i un augment de la secreció de la citoquina inflamatòria IL-10 i reducció de l'expressió de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IL-12, juntament amb una disminució de la quimiotaxi i de l'expressió del receptor CCR7, implicat en la migració de les CDs cap als nòduls limfàtics. Per últim es descriu una disminució de la proliferació dels limfòcits T donant lloc a una disminució de la resposta al·logènica. Aquestes CDs semimadures podrien ser considerades CDs reguladores de la resposta immunitària.

La caracterització més exhaustiva dels dominis de la cadena alfa permet determinar que  $\Delta$ CCP6 és el responsable de l'activitat inhibidora que exerceix la isoforma  $\alpha$ 7 $\beta$ 0 en la diferenciació i maduració de les CDs, independentment de l'estímul maduratiu utilitzat.

S'ha pogut comprovar que el sistema de purificació dels monòcits provinents de sang perifèrica no afecta als resultats obtinguts i que el tractament amb les diferents isoformes i els mutants recombinants de C4BP no afecta significativament la viabilitat cel·lular.

Per tant, la caracterització funcional detallada de la interacció de C4BP $\alpha$  sobre les CDs (via CD40 i/o a través de receptors alternatius) i la dissecció del domini de C4BP $\alpha$  implicat en la

inducció de CDs reguladores pot permetre el disseny de pèptids específics i efectius capaços de “programar” CDs amb propietats tolerogèniques o reguladores, d'enorme potencial per a la seva avaluació en el trasplantament d'òrgans, amb el fi d'aconseguir la supervivència a llarg termini de l'òrgan trasplantat.

### **Paper del Factor H en la diferenciació i maduració de les cèl·lules dendrítiques**

Un cop analitzada la resposta de les CDs a la proteïna reguladora del complement C4BP, es va voler comprovar si el Factor H [18], un altre regulador soluble del complement, induïa també un estat semimadur a les CDs, caracteritzat fonamentalment per una baixa expressió de CD83 i una reduïda internalització i processament d'antígens. Aquestes dues proteïnes, a part de ser regulars del sistema del complement, comparteixen la característica que estan formats per dominis CCPs (també anomenats *Short Consensus Repeats* o *sushi domains*).

S'han realitzat tres tipus d'anàlisi de l'efecte de la proteïna plasmàtica purificada Factor H en la diferenciació i/o maduració de les CDs derivades de monòcits de sang perifèrica de donants sans. En tractar els monòcits amb el Factor H i determinar l'efecte en la diferenciació s'ha vist que dona un estat cel·lular amb disminució de l'expressió de la CD86 i de CD1a, implicats en la presentació d'antigen. En afegir el Factor H sol a dia 5 i determinar l'expressió de marcadors en l'estat de cèl·lules madures s'observa augment de CD83 i CD86 respecte CDi mentre que es dona una disminució de HLA-DR, CD83 i CD1a en combinar-lo amb LPS. En estudiar el procés de diferenciació i maduració s'obtenen CDs tres estats cel·lulars. Les CDi es va obtenir per tractament en cultiu amb GM-CSF i IL-4, aquestes posseeixen una alta capacitat endocítica representada per una elevada endocitosi d'ovalbúmina (DQ-OVA). Sota estimulació amb LPS d'*E. coli* durant 48 hores, les CDs mostren un fenotip madur, caracteritzat per una baixa capacitat d'endocitar ovalbúmina, una regulació positiva de CD40, CD86, CD83 i CD80. Finalment, es va obtenir un estat intermedi mitjançant la incubació amb el Factor H que exhibeix característiques fenotípiques indicadores d'un estat semimadur. Aquesta última població tenia una expressió molt reduïda dels marcadors CD83, característic de les CDm, i CD1a, i de les molècules coestimuladores CD86 i CD80, comparat amb l'expressió en les CDm, i podria correspondre a CDs amb característiques reguladores o tolerogèniques. Mostra també una baixa capacitat d'endocitosi de DQ-OVA. Totes aquestes característiques semblen ser dosi dependent en tots els estudis realitzats, sense comprometre la viabilitat cel·lular. Això ens fa pensar que el Factor H, tal i com s'ha vist en el cas de l'absència de la cadena beta de la proteïna plasmàtica purificada C4BP, s'uniria d'alguna manera a les CDs donant lloc a un estat “semimadur” d'aquestes.

## Discussió

Amb aquests resultats podem deduir que en absència dels senyals coestimuladores, a causa del tractament amb el Factor H, el reconeixement antigènic no induiria la diferenciació cap a limfòcits T efectors, produint-se d'aquesta manera, la tolerància a antígens. Aquest mecanisme de seguretat previndria l'activació dels limfòcits amb autoantígens que podria provocar respostes immunes inadequades que danyarien els teixits propis.

També es van determinar la morfologia d'aquests tipus de CDs generades mitjançant microscopia d'escombratge veient que les CDi tenen la típica forma estelada. En tractar les cèl·lules amb el Factor H durant la diferenciació i maduració s'observen aquestes mateixes característiques, cèl·lules arrodonides amb poques dendrites. Mentre que les CDm mostren un aspecte més allargat amb dendrites més pronunciades i allargades.

### *Significats funcionals de les alteracions fenotípiques*

En aquest apartat de la discussió general es relacionaran les alteracions fenotípiques que s'han observat en presència del Factor H amb el resultat obtingut d'inhibició de la capacitat estimuladora de les CDs tractades amb aquests sobre els limfòcits. Es comentaran exclusivament els canvis fenotípics que s'han produït sobre CDm ja que són les úniques que poden relacionar-se amb les proliferacions limfocitàries.

El Factor H força descensos en els nivells de CD86 i CD80 en les CDm. Aquests descensos actuarien sobre els limfòcits activadors disminuint el seu grau de coestimulació i contribuint a produir respostes immunes menys intenses.

Una menor expressió de CD83 implica l'obtenció de CDs menys madures i amb menor capacitat de coestimulació limfocitària pel que, lògicament, les proliferacions limfocitàries haurien de ser menys intenses. El Factor H provoca en la CD madura un descens de CD83 en superfície.

Les fortes caigudes en CD1a que es produeixen en presència del Factor H impedirien l'activació de la població de limfòcits T restringits per a CD1 que, a diferència d'aquells que reconeixen el MHC, són autoreactius. El resultat de l'addició del Factor H als cultius és que una part de la població limfocitària, que contribueix activament mitjançant la secreció de citoquines, no s'activarà i la resposta immunitària llavors perdrà intensitat.

### *Assajos funcionals*

El següent pas va ser determinar el seu efecte a nivell funcional. Per això es van realitzar assajos d'endocitosi mitjançada per receptor, assajos de migració i d'expressió del receptor CCR7 i assajos de cultiu mix limfocitari per determinar si l'efecte "tolerogènic" de les cèl·lules donava reducció de la proliferació dels limfòcits T.

#### 1. Endocitosi mitjançada per receptor

En els assajos d'endocitosi mitjançada per receptor realitzats, les CDi mostraven uns nivells d'endocitosi de DQ-OVA elevats, mentre que els de les CDm era molt baix. En tractar les cèl·lules amb el Factor H i determinar el seu efecte en la diferenciació i maduració de les CDs, es va observar una endocitosi molt baixa, equivalent a l'obtinguda en les CDm, tant a nivell de la diferenciació, de la maduració com del procés sencer. Per tant, les CDs tractades amb el Factor H, tot i estar en un estat semimadur mostren nivells reduïts d'endocitosi.

#### 2. Assaig de migració i expressió de CCR7

Es va realitzar un assaig de migració per comprovar si les cèl·lules tractades amb el Factor H durant els processos de diferenciació i maduració tenien disminuïda aquesta capacitat. Es va poder observar que no eren capaces de migrar en condicions favorables de migració, és a dir, en ser estimulades amb la CCL21. Mentre que les CDm si que migraven.

També es va comprovar l'expressió de CCR7 a nivell de mRNA i de proteïna i es va observar una disminució en les cèl·lules tractades amb el Factor H durant els processos de diferenciació i maduració. Aquesta baixa expressió també es pot veure en les CDi, mentre que les cèl·lules en estat madur van mostrar una expressió elevada.

#### 3. *Indoleamine 2,3-dioxygenase*

Es va voler determinar l'expressió de l'enzim limitant del catabolisme del triptòfan, *indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO), en les CDs tractades amb el Factor H en el procés de diferenciació i maduració. Es va obtenir una disminució de l'expressió del gen que codifica per IDO en aquestes cèl·lules i en les CDi. Mentre que si que es trobar expressió en les CDm.

#### 4. miRNA155 o BIC-1

En els nostres estudis en tractar les CDs amb el Factor H es va determinar una disminució de l'expressió del gen que codifica per BIC-1. Mentre que si que es trobar expressió en les CDm.

## Discussió

### 5. Superòxid dismutasa 2 o SOD-2

Aquest gen és un membre de la família de la superòxid dismutasa de ferro/manganès. Codifica una proteïna de matriu mitocondrial que forma un homotetramer i lliga un ió de manganès per subunitat. Aquesta proteïna transforma l'ió superòxid, un bioproducte de la cadena de transport d'electrons mitocondrial, en aigua oxigenada i oxigen diatòmic. Per tant és una important defensa antioxidant en la majoria de les cèl·lules exposades a l'oxigen [343].

En tractar les CDs amb el Factor H es va determinar una disminució de l'expressió del gen que codifica per SOD-2. Mentre que si que es trobar expressió en les CDm.

### 6. Cultiu mixt limfocitari

Tal i com es va determinar per la isoforma  $\alpha7\beta0$  de la proteïna C4BP, es va voler comprovar si el factor H també podia reduir la resposta al·logènica en el cultiu mixt limfocitari. El resultat va ser una disminució d'aquesta propietat acompanyada d'una menor expressió de molècules de coestimulació, implicades en la presentació antigènica. Com a control positiu s'ha utilitzat també la Vitamina D3. Per tant, el Factor H podria estar implicat en la semimaduració de les CDs.

Per tant, el Factor H afecta als processos de diferenciació i maduració de les CDs de forma independent. Com es va poder comprovar utilitzat les isoformes  $\alpha7\beta0$  i  $\text{reca}6\beta0$ , i com s'havia vist en estudis publicats amb vitamina D3, cortisol o dexametasona, el Factor H addicionat al cultiu de monòcits dóna lloc a CDs en un estat semimadur caracteritzat per disminució de molècules coestimuladores, de CD83, acompanyada d'una disminució de la capacitat antigènica i de la proliferació de limfòcits T al·logènics.

#### **6.2.2. Cèl·lules dendrítiques i trasplantament**

En les últimes dues dècades s'ha donat un progrés significatiu en l'àrea del trasplantament d'òrgans resultant en una acceptació de l'empelt. Això ha estat possible principalment gràcies a la introducció de nous fàrmacs immunosupressors, millor selecció dels receptors, i una millora de la recuperació postoperatòria del malalt trasplantat. No obstant, la persistència del rebuig crònic així com dels efectes secundaris dels immunosupressors (per exemple, infecció crònica, càncer i aterosclerosi) són dos dels principals problemes que encara limiten l'èxit a llarg termini del trasplantament d'òrgans vascularitzats. En un esforç per resoldre aquests problemes, s'han realitzat un gran nombre de recerques durant els últims deu

anys per aconseguir tolerància immunològica permanent, resultant en una acceptació permanent de l'empelt sense cap règim immunosupressor.

Com s'ha anat constatant, un cop realitzat el trasplantament és necessari resoldre els problemes immunològics que obstaculitzen l'acceptació de l'empelt a curt, mig i llarg termini. En aquest sentit cal fer un esforç per conèixer millor els mecanismes de tolerogènesi que s'estableixen en molts trasplantaments i la seva potenciació terapèutica. Evidències experimentals suggereixen que les CDs "tolerogèniques" al·logèniques del donant són capaces d'incrementar la supervivència dels òrgans trasplantats quan s'infonen al receptor [208, 344]. Per tant, existeix un gran interès en la identificació de substàncies i/o protocols de teràpia cel·lular destinats a toleritzar les CDs, que juguen un paper clau en la inducció de tolerància immune. Així, seria desitjable l'ús de CDs terapèutiques selectives per prevenir o reduir l'aparició de rebuig i induir tolerància, o mitigar la malaltia de l'empelt contra l'hoste (GVHD). Això podria ser possible mitjançant el desenvolupament d'un protocol específic i d'un cost moderat per a ús clínic utilitzant C4BPA o Factor H.

Els agents utilitzats fins al moment (anticossos, fàrmacs immunosupressors...), poden conduir a una reactivació de la maduració de les CDs, o desenvolupen efectes secundaris importants. Una potencial teràpia immunològica amb C4BPA o amb Factor H es podria plantejar per modular les CDs de manera eficient, específica i segura, tant *in vitro* com *in vivo*, mitjançant l'administració sistèmica, un cop analitzat el perfil de toxicitat d'aquestes biomolècules.

Per altra banda, l'obtenció i caracterització funcional de les CDs reguladores induïdes per C4BPA i pèptids mimètics homòlegs a aquesta molècula o per Factor H ampliarà el coneixement de la interacció entre el sistema del complement i el sistema immune cel·lular en processos immunoinflamatoris com el rebuig en trasplantament d'òrgans. A més, la caracterització de la interacció CD-C4BPA i CD-Factor H pot conduir a la identificació de noves dianes terapèutiques en les vies de transducció de senyals implicades, ja sigui a través del receptor CD40, o a través d'altres receptors de membrana afins a C4BPA, en el cas de C4BP, o de receptors de membrana afins al Factor H.

### **Paper immunoterapèutic de les cèl·lules dendrítiques**

La immunoteràpia amb CDs ha estat plantejada com una alternativa als tractaments tradicionals del càncer (cirurgia, quimioteràpia o radioteràpia) [345]. Aquest tractament tindria l'avantatge que seria el propi cos el que detectaria i eliminaria les cèl·lules tumorals, sense necessitat de tractaments que tinguin efectes secundaris perjudicials físics o psicològics per al

## Discussió

pacient. Entre uns altres, ha estat provat en pacients amb hepatocarcinoma, melanoma i carcinoma renal, amb especial èxit en els pacients amb melanoma o limfoma [345]. L'alteració genètica de les CDs també pot contribuir a guarir o alleujar els efectes de malalties autoimmunes com l'artritis reumatoide, un trastorn en el qual els leucòcits ataquen el cartílag de les articulacions en confondre'l amb proteïnes alienes al cos. Aquesta resposta immunitària excessiva acaba danyant els ossos. Existeix un estudi que argumenta que la proteïna RelB impedeix la generació de la proteïna CD40 en CDs. Aquest canvi fa que les cèl·lules dendrítiques inhibeixin els limfòcits T en lloc d'activar-ho, regulant així la resposta immunitària [346].

D'altra banda, la inducció de CDs amb capacitat tolerogènica per estimulació amb alguna de les proteïnes que constitueixen els engranatges d'aquest circuit (Galectina-1, IL-27 o IL-10) brindaria importants beneficis terapèutics en processos inflamatoris crònics, malalties autoimmunes com l'esclerosi múltiple, l'artritis, la malaltia de Crohn i en la prevenció del rebuig de trasplantaments, tots processos en els quals es necessita "desactivar" la resposta immune. De fet, en els últims anys s'han descrit diferents citoquines (IL-21, pèptid vasoactiu intestinal...) [296, 297] i altres biomolècules (vitamina D3 [298], mitomicina C [299]...) capaces de regular l'activació i/o maduració de les CDs. La incubació de CDs generades *in vitro* amb IL-21 redueix significativament el seu potencial per induir proliferació de cèl·lules T [296]. Un altre estudi va mostrar que CDs tractades amb mitomicina C toleritzaven limfòcits T al·logènics i aquesta propietat podria ser mitjançada per la disminució de l'expressió de CD80, CD86 i ICAM-1 [299].

Alternativament, s'han descrit molècules que exerceixen una regulació més subtil i específica de la conversió a CDs tolerogèniques. Concretament, tant les hormones activina A i inhibina A [300], com certs oligonucleòtids [301] semblen induir un estat semimadur a les CDs, que es caracteritzen fonamentalment per una inhibició de l'expressió de HLA-DR, sense influir significativament en l'expressió d'altres marcadors com CD40, CD83 i CD86.

Per tant l'estudi detallat del potencial dels reguladors del complement, C4BP i Factor H, per "programar" a CDs tolerogèniques pot tenir rellevància terapèutica millorant la supervivència de l'òrgan trasplantat.

### **Perspectives futures**

Els resultats d'aquest treball poden donar peu a l'estudi del potencial valor diagnòstic de noves molècules implicades en l'activació de la resposta inflamatòria i regulades per la

interacció CD40-CD40L en cèl·lules endotelials. Aquesta aproximació podria ser d'utilitat per al diagnòstic de malalties amb un component inflamatori important com les malalties vasculars.

Per altra banda, l'acció dels reguladors del complement, C4BP i Factor H, en l'activació de les cèl·lules dendrítiques, fins ara desconeguda, obre noves possibles línies de recerca per a avançar en el coneixement de la tolerància en processos immunoinflamatoris.





## **7.CONCLUSIONS**



1. La determinació dels perfils d'expressió gènica mitjançant microarrays juntament amb la tecnologia de RNAi, ha permès verificar que la interacció CD40-CD40L desencadena un patró d'expressió específic en cèl·lules endotelials, tant si es tracta de la isoforma unida a membrana (mCD40L) com de la isoforma soluble (sCD40L).
2. La isoforma sCD40L produeix una activació endotelial anàloga a l'obtinguda amb la isoforma mCD40L. Encara que la magnitud d'activació de sCD40L és significativament menor, aquesta isoforma es capaç també d'induir en les cèl·lules endotelials una resposta defensiva a estrès de tipus immunoinflamatori en el que es veuen implicades les principals vies de senyalització proinflamatòries (NF-kB, MAPK/SAPK) i els seus factors de transcripció associats.
3. Segons l'anàlisi diferencial (SAM) dels perfils transcripcionals globals obtinguts mitjançant interacció mCD40L-CD40 i sCD40L-CD40 durant 4 h en cèl·lules endotelials, mCD40L regula 442 gens (90% induïts i 10% reprimits), mentre que sCD40L regula 357 gens (70% induïts i 30% reprimits). A més, 38.5% dels gens regulats via mCD40L i 50% dels gens regulats via sCD40L estarien coregulats. Això confirma el paper general de CD40L com "activador" de les cèl·lules endotelials, encara que també suggereix algunes particularitats funcionals diferencials entre ambdós isoformes de CD40L.
4. La validació per RT-PCR de la inhibició de l'expressió d'alguns d'aquests gens, mitjançada per RNAi contra CD40, confirma que la regulació és dependent d'aquest receptor i que gens involucrats en resposta inflamatòria es troben induïts després del tractament amb sCD40L, de manera anàloga al que s'havia descrit prèviament per mCD40L.
5. Una anàlisi d'ontologia gènica (GO) dels 84 gens identificats com a diferencialment regulats en cèl·lules endotelials entre ambdós estímuls, sCD40L i mCD40L, ha revelat dos importants processos biològics que s'indueixen preferentment via mCD40L: 1) Quimiotaxi, en el que es troben implicats quimioquines com: CXCL10, PLAU, CCL5, CXCL5, CX3CL1, CCL20 i CXCL11; i 2) catabolisme del triptòfan, en el que es troben induïts els gens que codifiquen pels enzims *indoleamine 2,3 dioxigenasa* (IDO) i kinureninasa (KYNU). La regulació diferencial d'aquesta via metabòlica és molt interessant, ja que les cèl·lules que sobreexpressen l'enzim IDO indueixen una potent activitat immunosupressora a les cèl·lules T.

## Conclusions

6. La isoforma majoritària  $\alpha 7\beta 1$  de la proteïna reguladora del sistema del complement C4BP no afecta ni al procés de diferenciació ni al de maduració de les CDs quan aquestes s'enfronten a un estímul proinflamatori (LPS).

7. Les isoformes  $\alpha 7\beta 0$  (minoritària) i  $\alpha 6\beta 0$  (recombinant) de C4BP afecten al procés de diferenciació/maduració de les CDs induint-les un estat semimadur. Aquest efecte es mostra amb canvis fenotípics (disminució del marcador de maduració CD83 i de les molècules coestimuladores CD80, CD86 i CD1a), morfològics amb un aspecte semblant a les CDs immadures, disminució de la capacitat d'internalitzar antígens, disminució de la migració i de l'expressió, tant a nivell de proteïna com de mRNA, del receptor CCR7, i a nivell de secreció de citokines un augment de IL-10 i una disminució de IL-12p70, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ .

8. En tractar les CDs amb C4BP  $\alpha 7\beta 0$  durant tot el procés d'activació cel·lular proinflamatòria, s'ha determinat un perfil transcripcional caracteritzat per una disminució de la expressió del gen IDO, implicat en el catabolisme del triptòfan, i del gen hoste del microRNA-155, BIC-1.

9. Les CDs tractades amb C4BP  $\alpha 7\beta 0$  durant el procés de diferenciació/maduració són capaces de reduir significativament l'apoptosi quan s'enfronten amb limfòcits T CD3<sup>+</sup> provinents de sang perifèrica.

10. El domini CCP6 de la cadena alfa de C4BP (C4BPA) és el responsable de l'activitat antiinflamatòria o "tolerogènica" de les CDs induïdes mitjançant un estímul proinflamatori ja que en tots els mutants  $\Delta$ CCP(1-8) de C4BPA excepte  $\Delta$ CCP6, es mostren nivells més baixos de CD83, acompanyats de canvis morfològics, donant lloc a un aspecte semblant a CD's immadures, i disminució de la secreció de IL-12p70, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ , de manera anàloga al que succeeix en tractar les CDs amb la isoforma  $\alpha 7\beta 0$  de C4BP.

11. El Factor H afecta als processos de diferenciació i maduració de les CDs de forma individual donant lloc a canvis fenotípics, disminució de les molècules coestimuladores CD86 i CD1a en el cas de la diferenciació i del marcador de maduració CD83 i de CD1a en la maduració quan es combina amb LPS.

12. El Factor H induïx un estat semimadur a les CDs que afecta conjuntament al seu procés de diferenciació/maduració quan són estimulades per un estímul proinflamatori (LPS). Aquest efecte es mostra amb canvis fenotípics (disminució del marcador de maduració CD83, de les molècules coestimuladores CD80, CD86, CD40, i CD1a), morfològics amb un aspecte

semblant a les CD<sub>s</sub> immadures, disminució de la capacitat d'internalitzar antígens, i disminució de la migració i de l'expressió, tant a nivell de proteïna com de mRNA, del receptor CCR7.

13. En tractar les CD<sub>s</sub> amb Factor H durant tot el procés d'activació cel·lular proinflamatòria, s'ha determinat un perfil transcripcional caracteritzat per una disminució de l'expressió del gen IDO, implicat en el catabolisme del triptòfan, del transcrit hoste del microRNA-155, BIC-1, i del gen antioxidant SOD-2.

14. Les CD<sub>s</sub> tractades amb Factor H durant el procés de diferenciació/maduració són capaces de reduir significativament l'alloproliferació quan s'enfronten amb limfòcits T CD3<sup>+</sup> provinents de sang perifèrica.

15. La comprensió dels mecanismes moleculars per els quals C4BP i Factor H modulen la diferenciació/maduració de les CD<sub>s</sub> podrà conduir al desenvolupament d'estratègies terapèutiques per reprimir l'activació d'aquestes en processos amb un important component immunoinflamatori, com l'aterosclerosi, les malalties autoimmunes i el rebuig en trasplantament d'òrgans.



## **8. BIBLIOGRAFIA**





1. Blanch-Olzewska Z. *Innata Immunity: cells, receptors, and signalling pathways*. Arch Immunol Ther Exp 2005 May-Jun; 53(3):245-53.
2. Banchereau J., Pascual V., and Palucka K., *Autoimmunity through Cytoquine-Induced Dendritic Cell Activation*. Immunity 2004 May; 20:539-550.
3. Krensky, A.M., Weiss, A., Crabtree, G., Davis, M.M., Parham, P., *T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection*. N Engl J Med 1990 Feb; 322: 510-517.
4. Euzeby J.P. *Le Systeme immunitaire de l'appareil respiratoire du porc: revue bibliographie*. Revue Med Vet 1993; 144:8-9.
5. Rumyantsev S.N. *Constitutional and non-specific immunity to infection*. Rev Sci Tech Off Int Epiz 1998 Apr; 17:25-42.
6. Pappaterra Mendoza G.J. *Efecto in Vitro e in vivo de un inmunomodulador compuesto por LPS de E.coli y Propionibacterium granulosum sobre el sistema inmune del cerdo*. 2002. Tesis doctoral.
7. Zipfel P.F. and Skerka C. *Complement regulators and inhibitory proteins*. Nature Reviews Immunology 2009 Oct; 9(10):729–740.
8. Carroll M.C. *The complement system in regulation of adaptive immunity*. Nat Immunol 2004, Oct; 5(10):981-6.
9. Fujita T., Endo Y., Nonaka M. *Primitive complement system--recognition and activation*. Mol Immunol 2004 Jun; 41(2-3):103-11.
10. Nonaka M., Yoshizaki F. *Evolution of the complement system*. Mol Immunol 2004 Feb; 40(12):897-902
11. Blom A.M. et al. *Functions of human complement inhibitor C4b-binding protein in relation to its structure*. Arch Immunol Ther Exp 2004 Mar-Apr; 52(2):83-95..
12. Janeway C.A. Jr., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J. (2001). Immunobiology. (5th ed.). Garland Publishing. (via NCBI Bookshelf) ISBN 0-8153-3642-X.
13. García Olivares E., Alonso A., Miró M. i Peña J.. *El Complemento*, [www.inmunologiaenlinea.es](http://www.inmunologiaenlinea.es)
14. Dragon-Durey M.A., Frémeaux-Bacchi V. *Atypical haemolytic uraemic syndrome and mutations in complement regulator genes*. Springer Semin Immunopathol 2005 Nov; 27(3):359-74.
15. Zipfel P.F., Misselwitz J., Licht C., Skerka C. *The role of defective complement control in hemolytic uremic syndrome*. Semin Thromb Hemost 2006 Mar; 32(2):146-54.

## Bibliografía

16. Mooijaart S.P., Koeijvoets K.M., Sijbrands E.J., Daha M.R., Westendorp R.G. *Complement Factor H polymorphism Y402H associates with inflammation, visual acuity, and cardiovascular mortality in the elderly population at large*. *Experimental Gerontology* 2007 Nov; 42(11):1116-22.
17. Blom A.M., Villoutreix B.O., Dahlbäck B. *Functions of human complement inhibitor C4b-binding protein in relation to its structure*. *Arch Immunol Ther Exp* 2004 Mar-Apr; 52(2):83-95.
18. de Córdoba S.R., de Jorge E.G. *Translational mini-review series on Complement Factor H: genetics and disease associations of human complement factor H*. *Clin Exp Immunol* 2008 Jan; 151(1):1-13.
19. Blom A.M., Villoutreix B.O. and Dahlback B. *Complement inhibitor C4b-binding protein—friend or foe in the innate immune system?*. *Mol Immunol* 2004 Apr; 40(18):1333-46.
20. Sánchez-Corral P. et al. *Isoforms of human C4b-binding protein I. Molecular basis for the C4BP isoform pattern and its variations in human plasma*. *The Journal of Immunology* 1995 Oct 15; 155(8):4030-6.
21. Blom AM. *Structural and functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein*. *Biochem Soc Trans* 2002; Nov; 30 (Pt 6): 978-82.
22. Blom A.M., Zadura A.F., Villoutreix B.O., Dahlbäck B. *Positively charged amino acids at the interface between alpha-chain CCP1 and CCP2 of C4BP are required for regulation of the classical C3-convertase*. *Mol Immunol* 2000; Jun; 37(8):445-53.
23. Pangburn M.K. *Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement*. *Immunopharmacology* 2000 Aug; 49(1-2):149-57.
24. Rodríguez de Córdoba S., Esparza-Gordillo J., Goicoechea de Jorge E., Lopez-Trascasa M., Sánchez-Corral P. *The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations*. *Mol Immunol* 2004 Jun; 41(4):355-67..
25. Estaller C., Schwaeble W., Dierich M., Weiss E.H., *Human complement factor H: two factor H proteins are derived from alternatively spliced transcripts*. *Eur J Immunol* 1991 Mar; 21(3):799-802.
26. Morris K.M., Aden D.P., Knowles B.B., Colten H.R., *Complement biosynthesis by the human hepatoma-derived cell line HepG2*. *J Clin Invest* 1982 Oct; 70(4): 906–913.
27. Schwaeble W., Zwirner J., Schulz T.F., Linke R.P., Dierich M.P., Weiss E.H., *Human complement factor H: expression of an additional truncated gene product of 43 kDa in human liver*. *Eur J Immunol* 1987 Oct; 17(10):1485-9.

28. Esparza-Gordillo J., Soria J.M., Buil A., et al., *Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels*. Immunogenetics 2004 May; 56(2):77-82.
29. Chen M., Forrester J.V., Xu H., *Synthesis of complement factor H by retinal pigment epithelial cells is down-regulated by oxidized photoreceptor outer segments*. Exp Eye Res 2007 Apr; 84(4):635-45.
30. Friese M.A., Hellwage J., Jokiranta T.S., et al., *FHL-1/reconectin and factor H: two human complement regulators which are encoded by the same gene are differently expressed and regulated*. Mol Immunol 1999 Sep-Oct; 36(13-14).
31. Hageman G.S., Anderson D.H., Johnson L.V., et al., *A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci USA. 2005 May 17;102(20):7227-32.
32. Kaplan M.H., Volanakis J.E., *Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin*. J Immunol 1974 Jun; 112(6):2135-47.
33. Mold C., Kingzette M., Gewurz H., *C-reactive protein inhibits pneumococcal activation of the alternative pathway by increasing the interaction between factor H and C3b*. J Immunol 1984 Aug; 133(2):882-5.
34. Giannakis E., Jokiranta T.S., Male D.A., et al., *A common site within factor H SCR 7 responsible for binding heparin, C-reactive protein and streptococcal M protein*. Eur. J Immunol 2003 Apr; 33(4):962-9.
35. Kuhn S., Skerka C., Zipfel P.F., *Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1*. J Immunol 1995 Dec 15; 155(12):5663-70.
36. Misasi R., Huemer H.P., Schwaeble W., Sölder E., Larcher C., Dierich M.P. *Human complement factor H: an additional gene product of 43 kDa isolated from human plasma shows cofactor activity for the cleavage of the third component of complement*. Eur J Immunol 1989 Sep; 19(9):1765-8.
37. Zipfel P.F., Skerka C., *FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function*. Immunol Today 1999 Mar; 20(3):135-40.
38. McRae J.L., Cowan P.J., Power D.A., Mitchelhill K.I., Kemp B.E., Morgan B.P., Murphy B.F., *Human factor H-related protein 5 (FHR-5). A new complement-associated protein*. J Biol Chem 2001 Mar 2; 276(9):6747-54.
39. Skerka C., Hellwage J., Weber W., Tilkorn A., Buck F., Marti T., Kampen E., Beisiegel U., Zipfel P.F., *The human factor H-related protein 4 (FHR-4). A novel short consensus repeat-*

## Bibliografia

*containing protein is associated with human triglyceride-rich lipoproteins.* J Biol Chem 1997 Feb 28; 272(9):5627-34.

40. Zipfel P.F., Jokiranta T.S., Hellwage J., Koistinen V., Meri S., *The factor H protein family.* Immunopharmacology 1999 May; 42(1-3):53-60.

41. Zipfel P.F., Skerka C., *Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins?* Immunol Today 1994 Mar; 15(3):121-6.

42. Díaz-Guillén M.A., Rodríguez de Córdoba S., Heine-Suñer D., *A radiation hybrid map of complement factor H and factor H-related genes.* Immunogenetics 1999 Jun; 49(6):549-52.

43. McRae J.L., Murphy B.E., Eyre H.J., Sutherland G.R., Crawford J., Cowan P.J., *Location and structure of the human FHR-5 gene.* Genetica 2002 Mar; 114(2):157-61.

44. Perez-Caballero D., Gonzalez-Rubio C., Gallardo M.E., et al., *Clustering of missense mutations in the C-terminal region of factor H in atypical hemolytic uremic syndrome.* Am J Hum Genet 2001 Feb; 68(2):478-84.

45. Pangburn M.K., Schreiber R.D., Müller-Eberhard H.J., *Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution.* J Exp Med 1977 Jul 1; 146(1):257-70.

46. Weiler J.M., Daha M.R., Austen K.F., Fearon D.T., *Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H.* Proc Natl Acad Sci. USA. 1976 Sep; 73(9):3268-72.

47. Whaley K., Ruddy S., *Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin.* J Exp Med 1976 Nov 2; 144(5):1147-63.

48. Fearon D.T., *Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway.* Proc Natl Acad Sci USA. 1978 Apr; 75(4):1971-5.

49. Kazatchkine M.D., Fearon D.T., Austen K.F., *Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta1 H for cell-bound C3b.* J Immunol 1979 Jan; 122(1):75-81.

50. Pangburn M.K., Schreiber R.D., Muller-Eberhard H.J., *C3b deposition during activation of the alternative complement pathway and the effect of deposition on the activating surface.* J Immunol 1983 Oct; 131(4):1930-5.

51. Lahera V., Navarro-Cid J., Cachofeiro V., García-Estañ J., Ruilope L.M., *Nitric oxide, the kidney, and hypertension.* Am J Hypertens 1997 Jan; 10(1):129-40.

52. Iwasaki A, Medzhitov R., *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nature Immunology, 2004 Oct; 5(10):987-95.
53. Heidemann J., Domschke W., Kucharzik T., Maaser C., *Intestinal microvascular endothelium and innate immunity in inflammatory bowel disease: a second line of defense?* Infect Immun, 2006 Oct; 74(10):5425-32.
54. Marelli-Berg F.M., Jarmin S.J., *Antigen presentation by the endothelium: a green light for antigen-specific T cell trafficking?* Immunol Lett, 2004 May 15; 93(2-3):109-13.
55. Dahlbäck B., Villoutreix B.O., *Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005 Jul; 25(7):1311-20.
56. Carmeliet P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000 Apr; 6(4):389-95.
57. Carmeliet P., *Angiogenesis in health and disease*. Nat. Med., 2003; Jun;9(6):653-60.
58. Frantz S., Vincent K.A., Feron O., Kelly R.A., *Innate immunity and angiogenesis*. Circ Res, 2005 Jan; 7; 96(1):15-26.
59. Tedder, T.F., Steeber, D.A., Chen, A., and Engel, P., *The selectins: vascular adhesion molecules*. Faseb J, 1995 Jul; 9(10):866-73.
60. Strauch, U.G., Lifka, A., Gossler, U., Kilshaw, P.J., Clements, J., and Holzmann, B., *Distinct binding specificities of integrins alpha 4 beta 7 (LPAM-1), alpha 4 beta 1 (VLA-4), and alpha IEL beta 7*. Int Immunol, 1994 Feb; 6(2):263-75.
61. von Andrian, U.H. and Engelhardt, B., *Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease*. N Engl J Med, 2003 Jan; 348(1):68-72.
62. Cordell, J.L., Pulford, K., Turley, H., Jones, M., Micklem, K., Doussis, I.A., Tyler, X., Mayne, K., Gatter, K.C., and Mason, D.Y., *Cellular distribution of human leucocyte adhesion molecule ICAM-3*. J Clin Pathol, 1994 Feb; 47(2):143-7.
63. Staunton, D.E., Dustin, M.L., and Springer, T.A., *Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1*. Nature, 1989 May; 339(6219):61-4.
64. Elices, M.J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., Hemler, M.E., and Lobb, R.R., *VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site*. Cell, 1990 Feb; 60(4):577-84.
65. Wakelin, M.W., Sanz, M.J., Dewar, A., Albelda, S.M., Larkin, S.W., Boughton-Smith, N., Williams, T.J., and Nourshargh, S., *An anti-platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane*. J Exp Med, 1996 Jul; 184(1):229-39.

## Bibliografia

66. Abbas, A.B., Lichtman A.H.. «Ch.4 Antigen recognition in the adaptive immune system». *Basic Immunology. Functions and disorders of the immune system* (3rd edición). Saunders (Elsevier).
67. Foti M., Granucci F., Ricciardi-Catagnoli P., *A central role for tissue-resident dendritic cells in innate responses*. *TRENDS in Immunology*, 2004 Dec; 25(12):650-654.
68. Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B., Palucka K., *Immunobiology of dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
69. Jung S., Unutmaz D., Wong P., Sano G., De los Santos K., Sparwasser T., Wu S., Vuthoori S., Ko K., Zavala F., Pamer E.G., Littman D.R., Lang R.A. *In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens*. *Immunity*. 2002 Aug;17(2):211-20.
70. Banchereau J., Steinman R.M. *Dendritic cells and the control of immunity*. *Nature*. 1998 Mar 19; 392(6673):245-52.
71. Shortman K., Liu Y.J. *Mouse and human dendritic cell subtypes*. *Nat Rev Immunol*. 2002 Mar; 2(3):151-61.
72. Lanzavecchia A., Sallusto F. *Regulation of T cell immunity by dendritic cells*. *Cell* 2001 Aug 10;106(3):263-6.
73. Sallusto F., Lanzavecchia A. *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. *J Exp Med*. 1994 Apr 1; 179(4):1109-18.
74. Salio M., Shepherd D., Dunbar P.R., Palmowski M., Murphy K., Wu L., Cerundolo V. *Mature dendritic cells prime functionally superior melan-A-specific CD8+ lymphocytes as compared with nonprofessional APC*. *J Immunol*. 2001 Aug 1; 167(3):1188-97.
75. Hackstein H., Morelli A.E., Thomson A.W. *Designer dendritic cells for tolerance induction: guided not misguided missiles*. *Trends Immunol*. 2001 Aug; 22(8):437-42.
76. Jonuleit H., Schmitt E., Steinbrink K., Enk A.H. *Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells*. *Trends Immunol*. 2001 Jul; 22(7):394-400.
77. Steinman R.M., Cohn Z.A. *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. *J Exp Med* 1973; 137 (5): 1142–62.
78. Dallal R.M., Lotze M.T. *The dendritic cell and human cancer vaccines*. *Curr Opin Immunol* 2000 Oct; 12(5):583-8.

79. Banchereau J., Schuler-Thurner B., Palucka A. K., Schuler G.. *Dendritic cells as vectors for therapy*. Cell 2001; 106. 271-274.
80. van de Laar L., Buitenhuis M., Wensveen F.M., Janssen H.L., Coffey P.J., Woltman A.M. *Human CD34-derived myeloid dendritic cell development requires intact phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B-mammalian target of rapamycin signaling*. J Immunol 2010 Jun 15; 184(12):6600-11
81. Błach-Olszewska Z. *Innate immunity: cells, receptors, and signaling pathways*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2005 May-Jun; 53(3):245-53.
82. Brière F., Bendriss-Vermare N., Delale T., Burg S., Corbet C., Risoan M.C., Chaperot L., Plumas J., Jacob M.C., Trinchieri G., Bates E.E. *Origin and filiation of human plasmacytoid dendritic cells*. Hum Immunol 2002 Dec;63(12):1081-93.
83. Shortman K., Naik S.H. *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. Nat Rev Immunol 2007 Jan; 7(1):19-30.
84. Wallet M.A., Sen P., Tisch R. *Immunoregulation of dendritic cells*. Clin Med Res 2005 Aug; 3(3):166-75.
85. Adams S., O'Neill D.W., Bhardwaj N. *Recent advances in dendritic cell biology*. J Clin Immunol 2005 May;25(3):177-88.
86. Albert M.L., Jegathesan M. Darnell R. *Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells*. Nature Immunol 2001 Nov; 2:1010-1017.
87. Kohrgruber N., Halanek N., Groger N.M., Winter D., Rappersberger K., Schmitt-Egenhof M. *Survival and maturation, and function of CD11- and CD11+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines*. J Immunol 1999 Sep; 163:3250-3259.
88. Van Krinks C.H., Matyszak M.K., Gaston J.S. *Characterization of plasmacytoid dendritic cells in inflammatory arthritis synovial fluid*. Rheumatology 2004 Apr; 43(4):453-60.
89. Ardavin C., Amigorena S., Reis e Sousa C. *Dendritic cells: immunobiology and cancer immunotherapy*. Immunity 2004 Jan; 20(1):17-23.
90. Grouard G., Clark E.A. *Role of dendritic and follicular dendritic cells in HIV infection and pathogenesis*. Curr Opin Immunol 1997 Aug; 9(4):563-7.
91. Olweus J., BitMansour A., Warnke R., Thompson P.A., Carballido J., Picker L.J., Lund-Johansen F. *Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Nov 11; 94(23):12551-6.
92. Risoan M.C., Soumelis V., Kadowaki N., Grouard G., Briere F., de Waal Malefyt R., Liu Y.J. *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. Science 1999 Feb 19; 283(5405):1183-6.



## Bibliografia

93. Kadowaki N., Antonenko S., Lau J.Y., Liu Y.J. *Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity.* J Exp Med 2000 Jul 17; 192(2):219-26.
94. Lipscomb M.F., Masten B.J. *Dendritic cells: immune regulators in health and disease.* Physiol Rev 2002 Jan; 82(1):97-130.
95. Bendriss-Vermare N., Barthélémy C., Durand I., Bruand C., Dezutter-Dambuyant C., Moulian N., Berrih-Aknin S., Caux C., Trinchieri G., Brière F. *Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells.* J Clin Invest 2001 Apr; 107(7):835-44.
96. Kapsenberg M.L. *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization.* Nat Rev Immunol 2003 Dec; 3(12):984-93.
97. Wu L., Antica M., Johnson G.R., Scollay R., Shortman K. *Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus.* J Exp Med. 1991 Dec 1; 174(6):1617-27.
98. Ardavin C., Wu L., Li C.L., Shortman K. *Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population.* Nature 1993 Apr 22; 362(6422):761-3.
99. Galy A., Travis M., Cen D., Chen B. *Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset.* Immunity 1995 Oct; 3(4):459-73.
100. Manz M.G., Traver D., Akashi K., Merad M., Miyamoto T., Engleman E.G., Weissman IL. *Dendritic cell development from common myeloid progenitors.* Ann N Y Acad Sci 2001 Jun; 938:167-73.
101. Hao Q.L., Zhu J. Price M.A., Payne K.J., Barsky L.W., Crooks G.M. *Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood.* Blood 2001 Jun 5; 97(12):3683-90.
102. Penna G., Vulcano M., Sozzani S., Adorini L. *Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells.* Hum Immunol 2002 Dec; 63(12):1164-71.
103. Sallusto F., Lanzavecchia A. *Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation.* J Exp Med 1999 Feb 15; 189(4):611-4.
104. Geissmann F., Dieu-Nosjean M.C., Dezutter C., Valladeau J., Kayal S., Leborgne M., Brousse N., Saeland S., Davoust J. *Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin.* J Exp Med 2002 Aug 19; 196(4):417-30.
105. Wilson N.S., El-Sukkari D., Belz G.T., Smith C.M., Steptoe R.J., Heath W.R., Shortman K., Villadangos J.A. *Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature.* Blood 2003 Sep 15; 102(6):2187-94.

106. O'Doherty U., Peng M., Gezelter S., Swiggard W.J., Betjes M., Bhardwaj N., Steinman R.M. *Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature.* Immunology 1994 Jul; 82(3):487-93.
107. Kadowaki N. *Dendritic cells: a conductor of T cell differentiation.* Allergol Int 2007 Sep; 56(3):193-9.
108. Malanga D., Barba P., Harris P.E., Maffei A., Del Pozzo G. *The active translation of MHCII mRNA during dendritic cells maturation supplies new molecules to the cell surface pool.* Cell Immunol 2007 Apr; 246(2):75-80.
109. Cella M., Jarrossay D., Facchetti F., Alebardi O., Nakajima H., Lanzavecchia A., Colonna M. *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon.* Nat Med 1999 Aug; 5(8):919-23.
110. Krug A., Towarowski A., Britsch S., Rothenfusser S., Hornung V., Bals R., Giese T., Engelmann H., Endres S., Krieg A.M., Hartmann G. *Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12.* Eur J Immunol 2001 Oct; 31(10):3026-37.
111. Cella M., Facchetti F., Lanzavecchia A., Colonna M. *Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization.* Nat Immunol 2000 Oct; 1(4):305-10.
112. Yao V., Platell C., Hall J.C. *Dendritic cells.* ANZ J Surg 2002 Jul; 72(7):501-6.
113. Wilson N.S., El-Sukkari D., Villadangos J.A. *Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis.* Blood 2004 Mar 15; 103(6):2187-95.
114. Steinman R.M. *Some interfaces of dendritic cell biology.* APMIS 2003 Jul-Aug; 111(7-8):675-97.
115. Mahnke K., Guo M., Lee S., Sepulveda H., Swain S.L., Nussenzweig M., Steinman R.M. *The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments.* J Cell Biol 2000 Oct 30; 151(3):673-84.
116. Jiang W., Swiggard W.J., Heufler C., Peng M., Mirza A., Steinman R.M., Nussenzweig M.C. *The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing.* Nature 1995 May 11; 375(6527):151-5.
117. Sallusto F., Cella M., Danieli C., Lanzavecchia A. *Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility*

## Bibliografia

*complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products see comments. J Exp Med* 1995 Aug 1; 182(2):389-400.

118. Thoma-Uszynski S., Stenger S., Takeuchi O., Ochoa M.T., Engele M. Sieling P.A., Barnes P.F., Rollinghoff M., Bolcskei P.L., Wagner M., Akira S., Norgard M.V., Belisle J.T., Godowski P.J., Bloom B.R., Modlin R.L. *Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. Science* 2001 Feb 23; 291(5508):1544-7.

119. Weis W.I., Taylor M.E., Drickamer K. *The C-type lectin superfamily in the immune system. Immunol Rev.* 1998 Jun; 163:19-34.

120. Rivas-Caicedo A., Soldevila G., Fortoul T.I., Castell-Rodríguez A., Flores-Romo L., García-Zepeda E.A. *Jak3 is involved in dendritic cell maturation and CCR7-dependent migration. PLoS One* 2009 Sep 17; 4(9):e7066.

121. Erdei A., Füst G., Gergely J. *The role of C3 in the immune response. Immunol Today* 1991 Sep; 12(9):332-7.

122. Gordon S. *Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. Cell.* 2002 Dec 27; 111(7):927-30.

123. Bajtay Z., Speth C., Erdei A., Dierich M.P. *Cutting edge: productive HIV-1 infection of dendritic cells via complement receptor type 3 (CR3, CD11b/CD18). J Immunol* 2004 Oct 15; 173(8):4775-8.

124. Figdor C.G., Van Kooyk Y., Adema G.J. *C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. Nat Rev Immunol* 2002 Feb; 2(2):77-84.

125. Drickamer K. *C-type lectin-like domains. Curr Opin Struct Biol.* 1999 Oct; 9(5):585-90.

126. Villadangos J.A., Schnorrer P., Wilson N.S. *Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces. Immunol Rev* 2005 Oct; 207:191-205.

127. Reis E.S., Barbuto J.A., Isaac L. *Human monocyte-derived dendritic cells are a source of several complement proteins. Inflamm Res* 2006 May; 55(5):179-84.

128. Morelli A.E., Thomson A.W. *Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. Immunol Rev* 2003 Dec; 196:125-46.

129. Corinti S., Fanales-Belasio E., Albanesi C., Cavani A., Angelisova P., Girolomoni G. *Cross-linking of membrane CD43 mediates dendritic cell maturation. J Immunol* 1999 Jun 1; 162(11):6331-6.

130. Reis e Sousa C., Stahl P.D., Austyn J.M. *Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. J Exp Med* 1993; 178: 509-19

131. Nagl M., Kacani L., Müllauer B., Lemberger E.M., Stoiber H., Sprinzl G.M., Schennach H., Dierich M.P. *Phagocytosis and killing of bacteria by professional phagocytes and dendritic cells*. Clin Diagn Lab Immunol 2002 Nov; 9(6):1165-8.
132. Steinbrink K., Paragnik L., Jonuleit H., Tüting T., Knop J., Enk A.H. *Induction of dendritic cell maturation and modulation of dendritic cell-induced immune responses by prostaglandins*. Arch Dermatol Res 2000 Sep; 292(9):437-45.
133. O'Sullivan B.J., Thomas R. *CD40 ligation conditions dendritic cell antigen-presenting function through sustained activation of NF-kappaB*. J Immunol 2002 Jun 1; 168(11):5491-8.
134. Morel Y., Truneh A., Sweet R.W., Olive D., Costello R.T. *The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD40 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity*. J Immunol 2001 Sep 1; 167(5):2479-86.
135. Warncke M., Dodero A., Dierbach H., Follo M., Veelken H. *Murine dendritic cells generated under serum-free conditions have a mature phenotype and efficiently induce primary immune responses*. J Immunol Methods 2006 Mar 20; 310(1-2):1-11.
136. Todryk S., Melcher A.A., Hardwick N., Linardakis E., Bateman A., Colombo M.P., Stoppacciaro A., Vile R.G. *Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake*. J Immunol 1999 Aug 1; 163(3):1398-408.
137. Singh-Jasuja H., Scherer H.U., Hilf N., Arnold-Schild D., Rammensee H.G., Toes R.E., Schild H. *The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor*. Eur J Immunol 2000 Aug; 30(8):2211-5.
138. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature 2000 Dec 7; 408(6813):740-5.
139. Kaliński P., Vieira P.L., Schuitemaker J.H., de Jong E.C., Kapsenberg M.L. *Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer*. Blood 2001 Jun 1; 97(11):3466-9.
140. Scandella E., Men Y., Gillessen S., Förster R., Groettrup M. *Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells*. Blood 2002 Aug 15; 100(4):1354-61.
141. Geissmann F., Dieu-Nosjean M.C., Dezutter C., Valladeau J., Kayal S., Leborgne M., Brousse N., Saeland S., Davoust J. *Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin*. J Exp Med 2002 Aug 19; 196(4):417-30.

## Bibliografía

142. Guermonprez P., Valladeau J., Zitvogel L., Théry C., Amigorena S. *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. Annu Rev Immunol 2002; 20:621-67.
143. Jonuleit H., Kühn U., Müller G., Steinbrink K., Paragnik L., Schmitt E., Knop J., Enk A.H. *Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions*. Eur J Immunol 1997 Dec; 27(12):3135-42.
144. Wan Y., Lu L., Bramson J.L., Baral S., Zhu Q., Pilon A., Dayball K. *Dendritic cell-derived IL-12 is not required for the generation of cytotoxic, IFN-gamma-secreting, CD8(+) CTL in vivo*. J Immunol 2001 Nov 1; 167(9):5027-33.
145. Lapointe R., Toso J.F., Butts C., Young H.A., Hwu P. *Human dendritic cells require multiple activation signals for the efficient generation of tumor antigen-specific T lymphocytes*. Eur J Immunol 2000 Nov; 30(11):3291-8.
146. Wilcox R.A., Chapoval A.I., Gorski K.S., Otsuji M., Shin T., Flies D.B., Tamada K., Mittler R.S., Tsuchiya H., Pardoll D.M., Chen L. *Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells*. J Immunol 2002 May 1; 168(9):4262-7.
147. Quah B.J., O'Neill H.C. *Maturation of function in dendritic cells for tolerance and immunity*. J Cell Mol Med 2005 Jul-Sep; 9(3):643-54.
148. Lutz M.B., Schuler G. *Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?* Trends Immunol 2002 Sep; 23(9):445-9.
149. Yanagihara S., Komura E., Nagafune J., Watarai H., Yamaguchi Y. *EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation*. J Immunol 1998 Sep 15; 161(6):3096-102.
150. Riol-Blanco L., Sánchez-Sánchez N., Torres A., Tejedor A., Narumiya S. Corbí A.L., Sánchez-Mateos P., Rodríguez-Fernández J.L. *The Chemokine Receptor CCR7 Activates in Dendritic Cells Two Signaling Modules That Independently Regulate Chemotaxis and Migratory Speed*. J Immunol 2005 Apr 1; 174(7):4070-80.
151. Sánchez-Sánchez N., Riol-Blanco L., Rodríguez-Fernández J.L. *The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells*. J Immunol 2006 May 1; 176(9):5153-9.
152. Iijima N., Yanagawa Y., Clingan J.M., Onoé K. *CCR7-mediated c-Jun N-terminal kinase activation regulates cell migration in mature dendritic cells*. Int Immunol 2005 Sep; 17(9):1201-12.

153. van Gisbergen K.P., Paessens L.C., Geijtenbeek T.B., van Kooyk Y. *Molecular mechanisms that set the stage for DC-T cell engagement*. Immunol Lett 2005 Mar 15; 97(2):199-208.
154. Huppa J.B., Davis M.M. *T-cell-antigen recognition and the immunological synapse*. Nat Rev Immunol 2003 Dec; 3(12):973-83.
155. Friedl P., den Boer A.T., Gunzer M. *Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse*. Nat Rev Immunol 2005 Jul; 5(7):532-45.
156. Roncarolo M.G., Battaglia M., Gregori S. *The role of interleukin 10 in the control of autoimmunity*. J Autoimmun 2003 Jun; 20(4):269-72.
157. Rutella S., Lemoli R. *Regulatory T cells and totelogenic dendritic cells: from basis biology to clinical applications*. Immunology Lett 2004; 94:11-26.
158. Shin-ichiro F., Liu K., Smith C., Bonito A., and Steinman R.M. *The Linkage to Adaptative Dendritic Cell In Vivo Requires CD40 Ligation In Adition To Antigen Presentation and CD80/86 Coestimulation*. J Exp Med. 2004 June 21; 199(12): 1607–1618.
159. Mahnke K., Schmitt E., Bonifaz L., Enk A.H., Jonuleit H. *Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells*. Immunol Cell Biol 2002 Oct; 80(5):477-83.
160. Bonifaz L., Bonnyay D., Mahnke K., Rivera M., Nussenzweig M.C., Steinman R.M. *Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance*. J Exp Med 2002 Dec 16; 196(12):1627-38.
161. Steinbrink K., Wölfl M., Jonuleit H., Knop J., Enk A.H. *Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells*. J Immunol 1997 Nov 15; 159(10):4772-80.
162. Nolan K.F., Strong V., Soler D., Fairchild P.J., Cobbold S.P., Croxton R., Gonzalo J.A., Rubio A., Wells M., Waldmann H. *IL-10 Conditioned Dendritic Cells, Decomissioned for Recruitment of adaptative Immunity, Elicit Innate Inlammtory genes Products in Response to Danger Signal*. J Immunol 2004 Feb 15; 172(4):2201-9.
163. Banchereau J., Palucka A.K. *Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer*. Nat Rev Immunol 2005 Apr; 5(4):296-306.
164. Jiga L.P., Jiga J. *Dendritic Cells - A Potential Tool for Tolerance Induction in Organ Transplantation*. TMJ 2004; 54(4) 331-5.
165. Sayegh M.H. *Finally, CTLA4Ig graduates to the clinic*. J Clin Invest 1999; 103(9): 1223-1225.
166. Cho C.S., Hamawy M.M., Knechtle S.J. *CD40/CD154 interactions and allograft rejection*. Curr Opinion Org Trans 2000 Mar, 5(1): 10-15.

## Bibliografia

167. Yellin M.J., D'Agati V., Parkinson G., Han A.S., Szema A., Baum D., Estes D., Szabolcs M., Chess L. *Immunohistologic analysis of renal CD40 and CD40L expression in lupus nephritis and other glomerulonephritides*. Arthritis Rheum 1997 Jan; 40(1):124-34.
168. Stamenkovic I., Clark E.A., Seed B. *A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas*. EMBO J 1989 May; 8(5):1403-10.
169. Clark E.A., Ledbetter J.A. *Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50*. Proc Natl Acad Sci U S A 1986 Jun; 83(12):4494-8.
170. Schönbeck U., Libby P. *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*. Cell Mol Life Sci 2001 Jan; 58(1):4-43.
171. Denton M.D., Reul R.M., Dharnidharka V.R., Fang J.C., Ganz P., Briscoe D.M., *Central role for CD40/CD40 ligand (CD154) interactions in transplant rejection*. Pediatr Transplant 1998 Feb; 2(1):6-15.
172. Stojakovic M., *Role of the CD40 receptor/CD154 ligand dyad in the control of smooth muscle cells phenotype*. Tesi doctoral Göttingen 2003.
173. Wykes M., Poudrier J., Lindstedt R., Gray D. *Regulation of cytoplasmic, surface and soluble forms of CD40 ligand in mouse B cells*. Eur J Immunol 1998 Feb; 28(2):548-59.
174. Pietravalle F., Lecoanet-Henchoz S., Blasey H., Aubry J.P., Elson G., Edgerton M.D., Bonnefoy J.Y., Gauchat J.F. *Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes*. J Biol Chem 1996 Mar 15; 271(11):5965-7.
175. van Kooten C., Banchereau J. *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol 2000 Jan; 67(1):2-17.
176. Schonbeck U., Libby P. *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*. Cell Mol Life Sci 2001 Jan; 58(1):4-43.
177. Mach F., Schönbeck U., Sukhova G.K., Bourcier T., Bonnefoy J.Y., Pober J.S., Libby P. *Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A 1997 Mar 4; 94(5):1931-6.
178. Pinchuk L.M., Klaus S.J., Magaletti D.M., Pinchuk G.V., Norsen J.P., Clark E.A. *Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation*. J Immunol 1996 Nov 15; 157(10):4363-70.
179. Becker T., Hartl F.U., Wieland F. *CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes*. J Cell Biol 2002 Sep 30; 158(7):1277-85.

180. Brodeur S.R., Angelini F., Bacharier L.B., Blom A.M., Mizoguchi E., Fujiwara H., Plebani A., Notarangelo L.D., Dahlback B., Tsitsikov E., Geha R.S. *C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor*. *Immunity* 2003 Jun; 18(6):837-48.
181. Williams K.T., Young S.P., Negus A., Young L.S., Adams D.H., Afford S.C. *C4b Binding Protein Binds to CD154 Preventing CD40 Mediated Cholangiocyte Apoptosis: A Novel Link between Complement and Epithelial Cell Survival*. *PLoS One* 2007 Jan 17; 2(1):e159.
182. Chan F.K., Chun H.J., Zheng L., Siegel R.M., Bui K.L., Lenardo M.J. *A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling*. *Science* 2000 Jun 30; 288(5475):2351-4.
183. Francis D.A., Karras J.G., Ke X.Y., Sen R., Rothstein T.L. *Induction of the transcription factors NF-kappa B, AP-1 and NF-AT during B cell stimulation through the CD40 receptor*. *Int Immunol* 1995 Feb; 7(2):151-61.
184. Foy T.M., Aruffo A., Bajorath J., Buhmann J.E., Noelle R.J. *Immune Regulation by CD40 and its Ligand GP39*. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:591-617.
185. Grewal I.S., Flavell R.A. *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:111-135.
186. Mackey, M.F., Barth, R.J., Jr., and Noelle, R.J., *The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells*. *J Leukoc Biol* 1998; 63(4): 418-28.
187. Mackey M.F., Barth R.J. Jr, Noelle R.J. *The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cell*. *J Leukoc Biol* 1998 Apr; 63(4):418-28.
188. Phipps R.P., *CD40: Lord of the endothelial cell*. *Blood* 2008 Nov 1; 112(9):3531-2.
189. De Smedt T., Pajak B., Klaus G.G., Noelle R.J., Urbain J., Leo O., Moser M. *Antigen-Specific T Lymphocytes Regulate Lipopolysaccharide-Induced Apoptosis of Dendritic Cells In Vivo*. *J Immunol* 1998 Nov 1; 161(9):4476-9.
190. Quezada S.A, Jarvinen L.Z., Lind E.F., Noelle R.J. *CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity*. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22:307-28.
191. Fries K.M., Sempowski G.D., Gaspari A.A., Blieden T., Looney R.J., Phipps R.P. *CD40 expression by human fibroblasts*. *Clin Immunol Immunopathol* 1995 Oct; 77(1):42-51.
192. Schönbeck U., Libby P., *CD40 signaling and plaque instability*. *Circ Res*. 2001 Dec 7; 89(12):1092-103.



## Bibliografia

193. Phipps R.P., Koumas L., Leung E., Reddy S.Y., Blieden T., Kaufman J. *The CD40-CD40 ligand system: a potential therapeutic target in atherosclerosis*. *Curr Opin Investig Drugs*. 2001 Jun; 2(6):773-7.
194. Henn V., Slupsky J.R., Gräfe M., Anagnostopoulos I., Förster R., Müller-Berghaus G., Kroczeck R.A. *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. *Nature*. 1998 Feb 5; 391(6667):591-4.
195. Yamada, A., Salama, A.D., Sayegh, M.H., *The CD154-CD40 costimulatory pathway in transplantation*. *Transplantation*, 2002, 73:S36-S39.
196. Laderach, D., Compagno, D., Danos, O., Vainchenker, W., Galy, A., *RNA Interference Shows Critical Requirement for NF- $\kappa$ B p50 in the Production of IL-12 by Human Dendritic Cells*. *J Immunol*, 2003, 171: 1750-1757.
197. Pluvinet R., Olivar R., Krupinski J., Herrero-Fresneda I., Luque A., Torras J., Cruzado J.M., Grinyó J.M., Sumoy L., Aran J.M. *CD40: an upstream master switch for endothelial cell activation uncovered by RNAi-coupled transcriptional profiling*. *Blood*. 2008 Nov 1; 112(9):3624-37.
198. Lee D.K., George S.R., O'Dowd B.F. *Unravelling the roles of the apelin system: prospective therapeutic applications in heart failure and obesity*. *Trends Pharmacol Sci*. 2006 Apr; 27(4):190-4.
199. Aird W.C. *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms*. *Circ Res*. 2007 Feb 2; 100(2):158-73.
200. Spriggs M.K., Armitage R.J., Strockbine L., Clifford K.N., Macduff B.M., Sato T.A., Maliszewski C.R., Fanslow W.C. *Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion*. *J Exp Med*. 1992 Dec 1;176(6):1543-50.
201. Hollenbaugh D., Grosmaire L.S., Kullas C.D., Chalupny N.J., Braesch-Andersen S., Noelle R.J., Stamenkovic I., Ledbetter J.A., Aruffo A. *The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity*. *EMBO J*. 1992 Dec;11(12):4313-21.
202. Pluvinet R., Pétriz J., Torras J., Herrero-Fresneda I., Cruzado J.M., Grinyó J.M., Aran J.M. *RNAi-mediated silencing of CD40 prevents leukocyte adhesion on CD154-activated endothelial cells*. *Blood*. 2004 Dec 1;104(12):3642-6.
203. Graf D., Müller S., Korthäuer U., van Kooten C., Weise C., Kroczeck R.A. *A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation*. *Eur J Immunol*. 1995 Jun; 25(6):1749-54.

204. Heeschen C., Dimmeler S., Hamm C.W., van den Brand M.J., Boersma E., Zeiher A.M., Simoons M.L. *Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes*. N Engl J Med. 2003 Mar 20; 348(12):1104-11.
205. Varo N., Vicent D., Libby P., Nuzzo R., Calle-Pascual A.L., Bernal M.R., Fernández-Cruz A., Veves A., Jarolim P., Varo J.J., Goldfine A., Horton E., Schönbeck U. *Elevated plasma levels of the atherogenic mediator soluble CD40 ligand in diabetic patients: a novel target of thiazolidinediones*. Circulation. 2003 Jun 3; 107(21):2664-9.
206. Steinman R.M., Hawiger D., Nussenzweig M.C. *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol. 2003; 21:685-711.
207. Mackey M.F., Gunn J.R., Maliszewsky C., Kikutani H., Noelle R.J., Barth R.J. Jr. *Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity*. J Immunol. 1998 Sep 1; 161(5):2094-8.
208. Morelli A.E., Thomson A.W. *Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance*. Nat Rev Immunol. 2007 Aug; 7(8):610-21.
209. Javorovic, M., *T-cell stimulation by melanoma RNA-pulsed dendritic cells*. Tesi doctoral, Munic 2004.
210. Jin P., Han T.H., Ren J., Saunders S., Wang E., Marincola F.M., Stroncek D.F. *Molecular signatures of maturing dendritic cells: implications for testing the quality of dendritic cell therapies*. J Transl Med. 2010 Jan 15; 8:4.
211. Blom A.M., Kask L., Dahlbäck B. *Structural requirements for the complement regulatory activities of C4BP*. J Biol Chem. 2001 Jul 20; 276(29):27136-44.
212. Hetts S.W. *To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease*. JAMA. 1998 Jan 28; 279(4):300-7.
213. Telford W.G., King L.E., Fraker P.J. *Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry*. Cell Prolif. 1991 Sep; 24(5):447-59.
214. Darzynkiewicz Z., Bruno S., Del Bino G., Gorczyca W., Hotz M.A., Lassota P., Traganos F. *Features of apoptotic cells measured by flow cytometry*. Cytometry. 1992; 13(8):795-808
215. Reed, J.C., *Mechanisms of apoptosis*. Am J Pathol, 2000 Nov 157(5): p.1415-30.
216. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C. *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. J Immunol Methods. 1995; 184(1):39-51.
217. Homburg C.H., de Haas M., von dem Borne A.E., Verhoeven A.J., Reutelingsperger C.P., Roos D. *Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro*. Blood. 1995; 85(2):532-540.

## Bibliografía

218. Janeway, Jr *et al* (2000). *Inmunobiología*. Masson, SA. ISBN 84-458-1176-2.
219. Zapata F. *Modulación del sistema inmune por el ácido docosahexanoico: efecto sobre la célula dendrítica*. Tesis doctoral, 2005.
220. Pfaffl MW. *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1; 29(9):e45.
221. Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1; 30(9):e36.
222. Gentleman R.C., Carey V.J., Bates D.M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S., Ellis B., Gautier L., Ge Y., Gentry J., Hornik K., Hothorn T., Huber W., Iacus S., Irizarry R., Leisch F., Li C., Maechler M., Rossini A.J., Sawitzki G., Smith C., Smyth G., Tierney L., Yang J.Y., Zhang J. *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. *Genome Biol.* 2004; 5(10):R80.
223. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillette M.A., Paulovich A., Pomeroy S.L., Golub T.R., Lander E.S., Mesirov J.P. *Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct 25; 102(43):15545-50.
224. Lönnstedt I., and Speed T.P., *Replicated microarray data*. *Stat Sinica*, 2002. 12:31-46.
225. Wahid R., Cannon M.J., Chow M. *Dendritic cells and macrophages are productively infected by poliovirus*. *J Virol.* 2005 Jan; 79(1):401-9.
226. Dahlback B. *Purification of human C4b-binding protein and formation of its complex with vitamin K-dependent protein S*. *Biochem. J.* 1983; 209:847–856.
227. Blom A.M., Webb J., Villoutreix B.O., Dahlback B. *A cluster of positively charged amino acids in the C4BP alpha-chain is crucial for C4b binding and factor I cofactor function*. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:19237–19245.
228. Steinbrink K., Jonuleit H., Müller G., Schuler G., Knop J., Enk A.H. *Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells*. *Blood.* 1999 Mar 1; 93(5):1634-42.
229. Lee, S. J., Evers, S., Roeder, D., Parlow, A. F., Risteli, J., Risteli, L., Lee, Y. C., Feizi, T., Langen, H., Nussenzweig, M. C. *Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis*. 2002 Mar 8; 295(5561):1898-901.
230. Blom A.M., Zadura A.F., Villoutreix B.O., Dahlbäck B. *Positively charged amino acids at the interface between alpha-chain CCP1 and CCP2 of C4BP are required for regulation of the classical C3-convertase*. *Mol Immunol.* 2000 Jun; 37(8):445-53.

231. Lesimple T., Neidhard E.M., Vignard V., Lefeuvre C., Adamski H., Labarrière N., Carsin A., Monnier D., Collet B., Clapisson G., Birebent B., Philip I., Toujas L., Chokri M., Quillien V. *Immunologic and clinical effects of injecting mature peptide-loaded dendritic cells by intralymphatic and intranodal routes in metastatic melanoma patients*. Clin Cancer Res. 2006 Dec 15; 12(24):7380-8.
232. Celotto A.M., Graveley B.R. *Exon-specific RNAi: a tool for dissecting the functional relevance of alternative splicing*. RNA. 2002 Jun; 8(6):718-24.
233. Kretschmer-Kazemi Far R., Sczakiel G. *The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides*. Nucleic Acids Res. 2003 Aug 1; 31(15):4417-24.
234. Bertrand J.R., Pottier M., Vekris A., Opolon P., Maksimenko A., Malvy C. *Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo*. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Aug 30; 296(4):1000-4.
235. Luft T., Maraskovsky E., Schnurr M., Knebel K., Kirsch M., Görner M., Skoda R., Ho A.D., Nawroth P., Bierhaus A. *Tuning the volume of the immune response: strength and persistence of stimulation determine migration and cytokine secretion of dendritic cells*. Blood. 2004 Aug 15; 104(4):1066-74.
236. Mathur R.K., Awasthi A., Wadhone P., Ramanamurthy B., Saha B. *Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses*. Nat Med. 2004 May; 10(5):540-4.
237. Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R., Silverman R.H., Schreiber R.D. *How cells respond to interferons*. Annu Rev Biochem 1998; 67: 227–64.
238. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol 2002 Aug; 3: 991–8.
239. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D., *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol 2004; 22: 329–60.
240. Blanck G., *Components of the IFN- $\gamma$  signaling pathway in tumorigenesis*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2002; 50: 151–8.
241. Shankaran V., Ikeda H., Bruce A.T., White J.M., Swanson P.E., Old L.J., Schreiber R.D., *IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature. 2001 Apr 26; 410(6832):1107-11.
242. Bach E.A., Aguet M., Schreiber R.D. *The IFN  $\gamma$  receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling*. Annu Rev Immunol 1997; 15: 563–91.

## Bibliografia

243. Romeo G., Fiorucci G., Chiantore M.V., Percario Z.A., Vannucchi S., Affabris E., *IRF-1 as a negative regulator of cell proliferation*. J Interferon Cytokine Res 2002 Jan; 22: 39–47.
244. Taniguchi T., Ogasawara K., Takaoka A., Tanaka N., *IRF family of transcription factors as regulators of host defense*. Annu Rev Immunol 2001; 19: 623–55.
245. Lohoff M., Mak T.W., *Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation*. Nat Rev Immunol 2005 Feb; 5: 125–35.
246. Kroger A., Koster M., Schroeder K., Hauser H., Mueller P.P., *Activities of IRF-1*. J Interferon Cytokine Res 2002 Jan; 22: 5–14.
247. Wang Y., Liu D., Chen P., Koeffler H.P., Tong X., Xie D., *Negative feedback regulation of IFN-gamma pathway by IFN regulatory factor 2 in esophageal cancers*. Cancer Res. 2008 Feb 15; 68(4):1136-43.
248. Byrne G.I., Lehmann L.K., Landry G.J., *Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular Chlamydia psittaci replication in T24 cells*. Infect Immun. 1986 Aug; 53(2):347-51.
249. Shemer Y., Sarov I., *Inhibition of growth of Chlamydia trachomatis by human gamma interferon*. Infect Immun. 1985 May; 48(2):592-6.
250. Summersgill J.T., Sahney N.N., Gaydos C.A., Quinn T.C., Ramirez J.A., *Inhibition of Chlamydia pneumoniae growth in HEp-2 cells pretreated with gamma interferon and tumor necrosis factor alpha*. Infect Immun. 1995 Jul; 63(7):2801-3.
251. Pfefferkorn E.R., *Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Feb; 81(3):908-12.
252. Schmitz J.L., Carlin J.M., Borden E.C., Byrne G.I., *Beta interferon inhibits Toxoplasma gondii growth in human monocyte-derived macrophages*. Infect Immun. 1989 Oct; 57(10):3254-6.
253. Shimizu T., Nomiya S., Hirata F., Hayaishi O., *Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties*. J Biol Chem. 1978 Jul 10; 253(13):4700-6.
254. Currier A.R., Ziegler M.H., Riley M.M., Babcock T.A., Telbis V.P., Carlin J.M., *Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide enhance interferon-induced antichlamydial indoleamine dioxygenase activity independently*. J Interferon Cytokine Res. 2000 Apr; 20(4):369-76.
255. Hu B., Hissong B.D., Carlin J.M., *Interleukin-1 enhances indoleamine 2,3-dioxygenase activity by increasing specific mRNA expression in human mononuclear phagocytes*. J Interferon Cytokine Res. 1995 Jul; 15(7):617-24.

256. Robinson C.M., Shirey K.A., Carlin J.M., *Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha*. J Interferon Cytokine Res. 2003 Aug; 23(8):413-21.
257. Heyes, M. P., Saito, K., Major, E. O., Milstein, S., Markey, S. P., Vickers, J. H. *A mechanism of quinolinic acid formation by brain in inflammatory neurological disease: attenuation of synthesis from L-tryptophan by 6-chlorotryptophan and 4-chloro-3-hydroxyanthranilate*. Brain 116: 1425-1450, 1993.
258. Mudduluru G., George-William J.N., Muppala S., Asangani I.A., Kumarswamy R., Nelson L.D., Allgayer H., *Curcumin regulates miR-21 expression and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer*. Biosci Rep. 2011 Jun; 31(3):185-97.
259. O'Connell R.M., Taganov K.D., Boldin M.P., Cheng G., Baltimore D., *MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jan 30; 104(5):1604-9.
260. Volinia S., Calin G.A., Liu C.G., Ambs S., Cimmino A., Petrocca F., Visone R., Iorio M., Roldo C., Ferracin M., Prueitt R.L., Yanaihara N., Lanza G., Scarpa A., Vecchione A., Negrini M., Harris C.C., Croce C.M., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 14; 103(7):2257-61.
261. Lecellier C.H., Dunoyer P., Arar K., Lehmann-Che J., Eyquem S., Himber C., Saïb A., Voinnet O., *A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells*. Science. 2005 Apr 22; 308(5721):557-60.
262. Ambs S., Prueitt R.L., Yi M., Hudson R.S., Howe T.M., Petrocca F., Wallace T.A., Liu C.G., Volinia S., Calin G.A., Yfantis H.G., Stephens R.M., Croce C.M., *Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer*. Cancer Res. 2008 Aug 1; 68(15):6162-70.
263. Mach F., Schönbeck U., Fabunmi R.P., Murphy C., Atkinson E., Bonnefoy J.Y., Graber P., Libby P., *T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation*. Am J Pathol. 1999 Jan; 154(1):229-38.
264. Chang S., Young B.D., Li S. Qi X., Richardson J.A., Olson E.N., *Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10*. Cell. 2006 Jul 28; 126(2):321-34.
265. Spinale F.G., *Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart*. Circ Res. 2002 Mar 22; 90(5):520-30.

## Bibliografia

266. Quackenbush E., Clabby M., Gottesdiener K.M., Barbosa J., Jones N.H., Strominger J.L., Speck S., Leiden J.M., *Molecular cloning of complementary DNAs encoding the heavy chain of the human 4F2 cell-surface antigen: a type II membrane glycoprotein involved in normal and neoplastic cell growth*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Sep; 84(18):6526-30.
267. Gottesdiener K.M., Karpinski B.A., Lindsten T., Strominger J.L., Jones N.H., Thompson C.B., Leiden J.M., *Isolation and structural characterization of the human 4F2 heavy-chain gene, an inducible gene involved in T-lymphocyte activation*. Mol Cell Biol. 1988 Sep; 8(9):3809-19.
268. Tsurudome M., Ito M., Takebayashi S., Okumura K., Nishio M., Kawano M., Kusagawa S., Komada H., Ito Y. *Cutting edge: primary structure of the light chain of fusion regulatory protein-1/CD98/4F2 predicts a protein with multiple transmembrane domains that is almost identical to the amino acid transporter E16*. J Immunol. 1999 Mar 1; 162(5):2462-6.
269. Michalak M., Quackenbush E.J., Letarte M., *Inhibition of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger activity in cardiac and skeletal muscle sarcolemmal vesicles by monoclonal antibody 44D7*. J Biol Chem. 1986 Jan 5; 261(1):92-5.
270. Sato H., Tamba M., Ishii T., Bannai S., *Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins*. J Biol Chem. 1999 Apr 23; 274(17):11455-8.
271. Feral C.C., Nishiya N., Fenczik C.A., Stuhlmann H., Slepak M., Ginsberg M.H., *CD98hc (SLC3A2) mediates integrin signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jan 11; 102(2):355-60.
272. Kishimoto T., Kikutani H., von dem Born AEGK, *et al.* eds. *Leucocyte Typing VI*. New York: Garland Publishing, Inc., 1997.
273. Kanai Y., Segawa H., Miyamoto K., Uchino H., Takeda E., Endou H., *Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98)*. J Biol Chem. 1998 Sep 11; 273(37):23629-32.
274. Habata Y., Fujii R., Hosoya M., Fukusumi S., Kawamata Y., Hinuma S., Kitada C., Nishizawa N., Murosaki S., Kurokawa T., Onda H., Tatemoto K., Fujino M., *Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum*. Biochim Biophys Acta. 1999 Oct 13; 1452(1):25-35.
275. Bełtowski J. *Apelin and visfatin: unique "beneficial" adipokines upregulated in obesity?* Med Sci Monit. 2006 Jun; 12(6):RA112-9.
276. Földes G., Horkay F., Szokodi I., Vuolteenaho O., Ilves M., Lindstedt K.A., Mäyränpää M., Sárman B., Seres L., Skoumal R., Lakó-Futó Z., deChâtel R., Ruskoaho H., Tóth M.,

- Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure.* Biochem Biophys Res Commun. 2003 Aug 29; 308(3):480-5.
277. Kleinz M.J., Davenport A.P., *Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells.* Regul Pept. 2004 May 15; 118(3):119-25.
278. Sorli S.C., van den Berghe L., Masri B., Knibiehler B., Audigier Y., *Therapeutic potential of interfering with apelin signalling.* Drug Discov Today. 2006 Dec; 11(23-24):1100-6. Epub 2006 Nov 2.
279. Groux H., Fournier N., Cottrez F., *Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells.* Semin Immunol. 2004 Apr; 16(2):99-106.
280. Mohamadzadeh M., Luftig R., *Dendritic cells: In the forefront of immunopathogenesis and vaccine development - A review.* J Immune Based Ther Vaccines. 2004 Jan 13; 2(1):1.
281. Inaba K., Turley S., Iyoda T., Yamaide F., Shimoyama S., Reis e Sousa C., Germain R.N., Mellman I., Steinman R.M., *The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli.* J Exp Med. 2000 Mar 20; 191(6):927-36.
282. Turley S.J., Inaba K., Garrett W.S., Ebersold M., Unternaehrer J., Steinman R.M., Mellman I., *Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells.* Science. 2000 Apr 21; 288(5465):522-7.
283. West M.A., Wallin R.P., Matthews S.P., Svensson H.G., Zaru R., Ljunggren H.G., Prescott A.R., Watts C., *Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling.* Science. 2004 Aug 20; 305(5687):1153-7.
284. Reis e Sousa C. *Dendritic cells in a mature age.* Nat Rev Immunol. 2006 Jun;6(6):476-83.
285. Sharpe A.H., Freeman G.J., *The B7-CD28 superfamily.* Nat Rev Immunol. 2002 Feb; 2(2):116-26.
286. Scholler N., Hayden-Ledbetter M., Dahlin A., Hellström I., Hellström K.E., Ledbetter J.A., *Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity.* J Immunol. 2002 Mar 15; 168(6):2599-602.
287. Ciesek S., Ringe B.P., Strassburg C.P., Klempnauer J., Manns M.P., Wedemeyer H., Becker T., *Effects of cyclosporine on human dendritic cell subsets.* Transplant Proc. 2005 Jan-Feb; 37(1):20-4.
288. Sauma D., Fierro A., Mora J.R., Lennon-Duménil A.M., Bono M.R., Roseblatt M., Morales J., *Cyclosporine preconditions dendritic cells during differentiation and reduces IL-2*



## Bibliografia

- and *IL-12 production following activation: a potential tolerogenic effect*. *Transplant Proc.* 2003 Nov; 35(7):2515-7.
289. Tiefenthaler M., Hofer S., Ebner S., Ivarsson L., Neyer S., Herold M., Mayer G., Fritsch P., Heufler C., *In vitro treatment of dendritic cells with tacrolimus: impaired T-cell activation and IP-10 expression*. *Nephrol Dial Transplant.* 2004 Mar; 19(3):553-60.
290. Szabo G., Gavala C., Mandrekar P., *Tacrolimus and cyclosporine A inhibit allostimulatory capacity and cytokine production of human myeloid dendritic cells*. *J Investig Med.* 2001 Sep; 49(5):442-9.
291. Tan P.H., Yates J.B., Xue S.A., Chan C., Jordan W.J., Harper J.E., Watson M.P., Dong R., Ritter M.A., Lechler R.I., Lombardi G., George A.J., *Creation of tolerogenic human dendritic cells via intracellular CTLA4: a novel strategy with potential in clinical immunosuppression*. *Blood.* 2005 Nov 1; 106(9):2936-43.
292. Potempa M., Potempa J., Okroj M., Popadiak K., Eick S., Nguyen K.A., Riesbeck K., Blom A.M., *Binding of complement inhibitor C4b-binding protein contributes to serum resistance of Porphyromonas gingivalis*. *J Immunol.* 2008 Oct 15; 181(8):5537-44.
293. Kirjavainen V., Jarva H., Biedzka-Sarek M., Blom A.M., Skurnik M., Meri S., *Yersinia enterocolitica serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein*. *PLoS Pathog.* 2008 Aug 29; 4(8):e1000140.
294. Wang Y., Kelly C.G., Karttunen J.T., Whittall T., Lehner P.J., Duncan L., MacAry P., Younson J.S., Singh M., Oehlmann W., Cheng G., Bergmeier L., Lehner T., *CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-chemokines*. *Immunity.* 2001 Dec; 15(6):971-83.
295. Yamada M., Oritani K., Kaisho T., Ishikawa J., Yoshida H., Takahashi I., Kawamoto S., Ishida N., Ujiie H., Masaie H., Botto M., Tomiyama Y., Matsuzawa Y., *Complement C1q regulates LPS-induced cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells*. *Eur J Immunol.* 2004 Jan; 34(1):221-30.
296. Brandt K., Bulfone-Paus S., Jenckel A., Foster D.C., Paus R., Rückert R., *Interleukin-21 inhibits dendritic cell-mediated T cell activation and induction of contact hypersensitivity in vivo*. *J Invest Dermatol.* 2003 Dec; 121(6):1379-82.
297. Chorny A., Gonzalez-Rey E., Fernandez-Martin A., Pozo D., Ganea D., Delgado M., *Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 20; 102(38):13562-7.

298. Canning M.O., Grotenhuis K., de Wit H., Ruwhof C., Drexhage H.A., *1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)(2)D(3)) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes*. Eur J Endocrinol. 2001 Sep; 145(3):351-7.
299. Jiga L.P., Ehser S., Kleist C., Opelz G., Terness P., *Inhibition of heart allograft rejection with mitomycin C-treated donor dendritic cells*. Transplantation. 2007 Feb 15; 83(3):347-50.
300. Segerer S.E., Müller N., Brandt J., Kapp M., Dietl J., Reichardt H.M., Rieger L., Kämmerer U., *The glycoprotein-hormones activin A and inhibin A interfere with dendritic cell maturation*. Reprod Biol Endocrinol. 2008 May 6; 6:17.
301. Wang J., Roderiquez G., Jones T., McPhie P., Norcross M.A., *Control of in vitro immune responses by regulatory oligodeoxynucleotides through inhibition of pIII promoter directed expression of MHC class II transactivator in human primary monocytes*. J Immunol. 2007 Jul 1; 179(1):45-52.
302. Lavery L.W., Goyns M.H., *Decline in the expression of C4 binding protein alpha-chain gene during ageing of the rat liver*. Biogerontology. 2002; 3(4):207-11.
303. Knight S.C., Balfour B.M., O'Brien J., Buttifant L., Summerska T., Clarke J., *Role of veiled cells in lymphocyte activation*. Eur J Immunol. 1982 Dec; 12(12):1057-60.
304. Knight S.C., *Veiled cells--"dendritic cells" of the peripheral lymph*. Immunobiology. 1984 Dec; 168(3-5):349-61.
305. Yokochi T., Holly R.D., Clark E.A., *B lymphoblast antigen (BB-1) expressed on Epstein-Barr virus-activated B cell blasts, B lymphoblastoid cell lines, and Burkitt's lymphomas*. J Immunol. 1982 Feb; 128(2):823-7.
306. Freedman A.S., Freeman G., Horowitz J.C., Daley J., Nadler L.M., *B7, a B-cell-restricted antigen that identifies preactivated B cells*. J Immunol. 1987 Nov 15; 139(10):3260-7.
307. Freeman G.J., Borriello F., Hodes R.J., Reiser H., Hathcock K.S., Laszlo G., McKnight A.J., Kim J., Du L., Lombard D.B., et al. *Uncovering of functional alternative CTLA-4 counter-receptor in B7-deficient mice*. Science. 1993 Nov 5; 262(5135):907-9.
308. Manzotti C.N., Tipping H., Perry L.C., Mead K.I., Blair P.J., Zheng Y., Sansom D.M., *Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25+ regulatory T cells*. Eur J Immunol. 2002 Oct; 32(10):2888-96.
309. Piemonti L., Monti P., Allavena P., Sironi M., Soldini L., Leone B.E., Socci C., Di Carlo V., *Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation*. J Immunol. 1999 Jun 1; 162(11):6473-81.

## Bibliografia

310. Berer A., Stöckl J., Majdic O., Wagner T., Kollars M., Lechner K., Geissler K., Oehler L., *1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro*. Exp Hematol. 2000 May; 28(5):575-83.
311. Lechmann M., Berchtold S., Hauber J., Steinkasserer A., *CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation*. Trends Immunol. 2002 Jun; 23(6):273-5.
312. Fujimoto Y., Tu L., Miller A.S., Bock C., Fujimoto M., Doyle C., Steeber D.A., Tedder T.F., *CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus*. Cell. 2002 Mar 22; 108(6):755-67.
313. Freeman L., Hewison M., Hughes S.V., Evans K.N., Hardie D., Means T.K., Chakraverty R., *Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 permits regulation of glucocorticoid bioavailability by human dendritic cells*. Blood. 2005 Sep 15; 106(6):2042-9.
314. Dustin M.L., Cooper J.A., *The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling*. Nat Immunol. 2000 Jul; 1(1):23-9.
315. Flores-Romo L., *In vivo maturation and migration of dendritic cells*. Immunology. 2001 Mar; 102(3):255-62.
316. Lyakh L.A., Sanford M., Chekol S., Young H., Robert A.B., *TGF- $\beta$  and Vitamin D3 utilize distinct pathways to suppress IL-12 production and modulate rapid differentiation of human monocytes into CD83+ dendritic cells*. J Immunol 2005; 174:2061-70.
317. Amprey J.L., Späth G.F., Porcelli S.A., *Inhibition of CD1 expression in human dendritic cells during intracellular infection with Leishmania donovani*. Infect Immun. 2004 Jan; 72(1):589-92.
318. Mosmann T.R., Coffman R.L.. *Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol. 1989; 7:145-73.
319. Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol. 2005 Jul 1; 175(1):5-14.
320. Kelso A., Trout A.B., Maraskovsky E., Gough N.M., Morris L., Pech M.H., Thomsom J.A., *Heterogeneity in lymphokine profiles of CD4+ and CD8+ T cells and clones activated in vivo and in vitro*. Immunol rev 1991 Oct; 123:85-114.
321. Assenmacher M., Schmitz J., Radbruch A., *Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expresion of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells*. Eur J Immunol 1994 May,24; 1097-1101.
322. Kelso A., *Th1 and Th2 subsets: paradigms lost?* Immunology Today. 1995 Aug; 16; 374-9.

323. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., O'Garra, A., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19: 683–765.
324. Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., Roncarolo, M. G., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. *Nature* 1997 Oct. 389; 737–742.
325. Mathieu Ch., Adorini L., *The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D3 analogs as immunomodulatory agents*. *Trends Mol Med* 2002 Apr; 8(4):174-9.
326. Griffin M., Lutz W., Phan V., Bachman L.A., McKean D.J., Kumar R., *Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Apr; 270:701-8.
327. Pestka, S., Krause, C. D., Sarkar, D., Walter, M. R., Shi, Y., Fisher, P. B., *Interleukin-10 and related cytokines and receptors*. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22: 929–979.
328. Frumento G., Rotondo R., Tonetti M., Damonte G., Benatti U., Ferrara G.B., *Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase*. *J Exp Med.* 2002 Aug 19; 196(4):459-68.
329. Terness P., Bauer T.M., Röse L., Dufter C., Watzlik A., Simon H., Opelz G., *Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites*. *J Exp Med.* 2002 Aug 19; 196(4):447-57.
330. Marshall B., Keskin D.B., Mellor A.L., *Regulation of prostaglandin synthesis and cell adhesion by a tryptophan catabolizing enzyme*. *BMC Biochem.* 2001; 2:5.
331. Lu M., Zhang Q., Deng M., Miao J., Guo Y., Gao W., Cui Q., *An analysis of human microRNA and disease associations*. *PLoS One.* 2008; 3(10):e3420.
332. Thai T.H., Calado D.P., Casola S., Ansel K.M., Xiao C., Xue Y., Murphy A., Frenthewey D, Valenzuela D., Kutok J.L., Schmidt-Supprian M., Rajewsky N., Yancopoulos G., Rao A., Rajewsky K., *Regulation of the germinal center response by microRNA-155*. *Science.* 2007 Apr 27; 316(5824):604-8.
333. O'Connell R.M., Taganov K.D., Boldin M.P., Cheng G., Baltimore D., *MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 30; 104(5):1604-9.
334. Ceppi M., Pereira P.M., Dunand-Sauthier I., Barras E., Reith W., Santos M.A., Pierre P., *MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb 24; 106(8):2735-40.
335. Turner M., Vigorito E., *Regulation of B- and T-cell differentiation by a single microRNA*. *Biochem Soc Trans.* 2008 Jun; 36(Pt 3):531-3.

## Bibliografia

336. Taganov K.D., Boldin M.P., Chang K.J., Baltimore D., *NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Aug 15; 103(33):12481-6.
337. Eis P.S., Tam W., Sun L., Chadburn A., Li Z., Gomez M.F., Lund E., Dahlberg J.E. *Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Mar 8; 102(10):3627-32.
338. Kluiver J., Poppema S., de Jong D., Blokzijl T., Harms G., Jacobs S., Kroesen B.J., van den Berg A., *BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas*. J Pathol. 2005 Oct; 207(2):243-9.
339. Iorio M.V., Ferracin M., Liu C.G., Veronese A., Spizzo R., Sabbioni S., Magri E., Pedriali M., Fabbri M., Campiglio M., Ménard S., Palazzo J.P., Rosenberg A., Musiani P., Volinia S., Nenci I., Calin G.A., Querzoli P., Negrini M., Croce C.M., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer Res. 2005 Aug 15; 65(16):7065-70.
340. Liu X., Chen Z., Yu J., Xia J., Zhou X., *MicroRNA profiling and head and neck cancer*. Comp Funct Genomics. 2009; 837514.
341. Volinia S., Calin G.A., Liu C.G., Ambs S., Cimmino A., Petrocca F., Visone R., Iorio M., Roldo C., Ferracin M., Prueitt R.L., Yanaihara N., Lanza G., Scarpa A., Vecchione A., Negrini M., Harris C.C., Croce C.M., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 14; 103(7):2257-61.
342. Kong W., He L., Coppola M., Guo J., Esposito N.N., Coppola D., Cheng J.Q., *MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer*. J Biol Chem. 2010 Jun 4; 285(23):17869-79.
343. Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J., *Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression*. Free Radic Biol Med. 2002 Aug 1; 33(3):337-49.
344. Turnquist H.R., Thomson A.W., *Taming the lions: manipulating dendritic cells for use as negative cellular vaccines in organ transplantation*. Curr Opin Organ Transplant. 2008 Aug; 13(4):350-7.
345. *Células Dendríticas que Atacan al Cáncer*. National Cancer Institute.
346. Martin E., O'Sullivan B., Low P., Thomas R., *Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10*. Immunity. 2003 Jan; 18(1):155-67.

