



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS**  
**Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia**

DOCTORADO EN BIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**“Estudio del rol modulador de TNFRp55 en  
células dendríticas: impacto en artritis reactiva  
inducida por *Yersinia enterocolitica*”**

Autora: Andrea Constanza Mayordomo

Directora: Dra. María Silvia Di Genaro

Co-Director: Dr. Walter Berón

**San Luis, 2018**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS**  
**Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia**

DOCTORADO EN BIOLOGÍA

TRABAJO FINAL  
TESIS DOCTORAL

**“Estudio del rol modulador de TNFRp55 en células  
dendríticas: impacto en artritis reactiva inducida por  
*Yersinia enterocolitica*”**

Autora  
Andrea Constanza  
Mayordomo

Directora  
Dra. María Silvia Di  
Genaro

Co-Director  
Dr. Walter Berón

**San Luis, 2018**

# *Agradecimientos*

*Es difícil para mí agradecer a cada uno de aquellos que han contribuido al objetivo logrado desde diferentes niveles, ya sea académico, emocional, mental y físico, durante estos cinco años. Seguramente no voy a poder expresar en este apartado ni la milésima parte de este tiempo.*

*Primero, quiero agradecer a la Universidad Nacional de San Luis no sólo por la posibilidad de formarme académicamente, sino por brindar un lugar donde uno puede cuestionar, reflexionar y defender ideas, posturas, causas ya sean propias o colectivas. Agradezco, inmensamente que existan espacios dentro de la universidad donde uno pueda problematizar su trabajo, la manera de hacerlo, la ciencia, la educación, las conexiones con la sociedad, luchar por nuestros derechos o por los de los otros. De alguna manera me siento una privilegiada en este aspecto ya que si estuviera en otro lugar o situación, no tendría estas libertades o no me replantaría las cosas.*

*A Silvia, no sólo por brindarme un lugar en tu laboratorio el cual me permitió formarme, sino también por darme las posibilidades de crecer académicamente y tener autonomía. Tengo que señalar que no soy una persona fácil y a pesar de tener algunas diferencias con vos, voy a extrañar la relación que hemos logrado entablar. ¡Gracias por todo!*

*A Walter, se que nos hemos conocido poco pero agradezco la confianza que me has brindado, el apoyo incondicional y perdón por hacerte trabajar tanto en tan poco tiempo. De verdad ¡muchas gracias!*

*Al grupo de Inmuno, lugar donde encontré amigos, con quienes compartí muchas experiencias, como todo lugar tiene sus altibajos, pero me llevo sólo las risas y los momentos felizmente compartidos. Todos somos distintos, armonizar el conjunto es el quid de la cuestión y desde esa base se aprende muchísimo. La verdad ¡gracias por todo!*

*A los amigos de la vida, los cuales incluyo a TODOS, la verdad no tengo palabras que describan todo lo que me han brindado. Pero gracias a ustedes mis días han sido siempre diferentes y he aprendido muchísimo de cada uno. Desde el compartir unos mates, un deporte, una charla, un asado, una cervecita, un viaje, ir a acampar, etc. Esos momentos han sido los mejores de mi vida. ¡Muchas Gracias!*

*A mi familia, quienes son la fortaleza y los pilares de mi vida, se han bancado todo, cambios de humor, las rebeldías, las locuras, pero bueno... uno cuando es el del medio tiene que hacer la diferencia jajaja. Gracias a ustedes he aprendido a nunca bajar los brazos y proponerme objetivos que se que con perseverancia y paciencia se logran. ¡Gracias por estar siempre!*

*Sólo podemos dar lo que ya hemos dado. Sólo podemos dar lo que ya es del otro... ¡Qué misterio es una dedicatoria, una entrega de símbolos!"*

**Jorge Luis Borges**

# *Índice*

<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<i>Resumen .....</i>	2
<i>Abstract .....</i>	4
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>6</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>10</b>
1) <i>Artritis Reactiva .....</i>	11
1.1) <i>Definición .....</i>	11
1.2) <i>Agentes patogénicos de la enfermedad .....</i>	11
1.3) <i>Epidemiología.....</i>	12
1.4) <i>Sintomatología.....</i>	12
1.5) <i>Tratamiento .....</i>	13
1.6) <i>Fisiopatología.....</i>	14
2) <i>Yersinia .....</i>	15
2.1) <i>Generalidades.....</i>	15
2.2) <i>Yersinia enterocolítica .....</i>	16
2.3) <i>Sintomatología.....</i>	17
2.4) <i>Infección y patogenicidad .....</i>	18
2.5) <i>Factores de Virulencia.....</i>	20
3) <i>Factor de Necrosis Tumoral .....</i>	23
3.1) <i>Generalidades.....</i>	23
3.2) <i>Receptores y vías de señalización.....</i>	23
3.3) <i>Rol de TNF .....</i>	26
4) <i>Interleuquina 12/23p40 .....</i>	27
4.1) <i>Rol de IL-12/23p40 .....</i>	28
5) <i>Células Dendríticas.....</i>	30
5.1) <i>Generalidades.....</i>	30
5.2) <i>Rol de CDs.....</i>	31
6) <i>Perfil de linfocitos T CD4+ .....</i>	32
7) <i>Modelo de ARe. Antecedentes.....</i>	34
<b>Objetivos .....</b>	<b>35</b>
<i>Hipótesis .....</i>	36
<i>Objetivo general.....</i>	36
<i>Objetivos específicos .....</i>	36

**Materiales y métodos ..... 37**

1) Ratones .....	38
1.1) Corroboración del genotipo de los ratones .....	38
1.2) Modelo de expansión celular [138] .....	39
2) Bacteria.....	39
2.1) Infección in vivo.....	40
2.2) Infección in vitro.....	40
3) Obtención de órganos.....	41
3.1) Obtención de esplenocitos.....	41
3.2) Obtención de células peritoneales.....	41
3.2.1) Estudio cinético.....	42
3.3) Obtención de médula ósea .....	42
3.3.1) Diferenciación a CDs .....	43
4) Citometría.....	43
4.1) Determinación de antígenos de superficie.....	43
4.1.1) Anticuerpos de superficie.....	44
4.1.2) Fijación:.....	44
4.2) Determinación intracelular de citoquinas .....	45
4.2.1) Marcación IL-12p40/70.....	45
4.2.2) Marcación IFN- $\gamma$ y IL-17 A.....	45
4.3) Purificación de CDs.....	46
4.4) Purificación de Linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	46
4.5) Marcación con CFSE (diacetato de carboxifluoresceína ester succinimidil)..	47
4.6) Viabilidad celular .....	47
5) Cultivo de células JAWS II .....	47
5.1) Control de micoplasmas mediante tinción con DAPI.....	48
6) Estimulación In Vitro .....	48
6.1) Estimulación de esplenocitos.....	48
6.2) Estimulación de CD .....	49
6.2.1) Ensayo de inhibidores.....	49
6.2.2) Ensayo con TNFh .....	49



6.2.3) Ensayo de Proliferación.....	50
6.3) CD obtenidas del modelo de expansión celular.....	50
6.3.1) Ensayo de inhibidores.....	50
6.3.2) Ensayo con TNFh e inhibidores de TNF.....	51
6.3.3) Ensayo de co-cultivo.....	51
6.4) Estimulación de las células JAWS II.....	52
7) Determinación de citoquinas por ELISA.....	53
8) Análisis estadístico.....	53
<b>Resultados.....</b>	<b>54</b>
Objetivo 1.....	55
Cinética de producción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en esplenocitos...	56
Estudio del número absoluto de células del sistema inmune en bazo.....	57
CPA: candidatas de desregulación en la producción de IL-12/23p40.....	58
Vías de señalización JNK y p38 cumplirían una función clave en la sobrepducción de IL-12/23p40.....	61
Inhibición de vías de señalización, relación IL-12/23p40 con IL-10.....	63
Ratones IL-10 <sup>-/-</sup> permiten explicar la relación IL-12/23p40 con IL-10.....	65
Resumen. Modelo.....	68
Objetivo 2.....	70
Obtención de CDs a partir de peritonitis aséptica.....	71
Diferenciación de CDs a partir de médula ósea.....	73
Estandarización de la concentración de TNFh y protocolo de co-cultivo.....	75
Obtención de CDs a partir de un modelo de expansión celular.....	77
Análisis de las vías MAPKs en la producción de IL-12/23p40 e IL-10.....	80
Efecto regulador de TNF en la vía TNFRp55: TNF humano.....	83
Implicancia de los receptores de TNF en IL-12/23p40.....	85
Grado de activación de CDs frente a una infección in vitro con Ye.....	87
Efecto de CDs TNFRp55 <sup>-/-</sup> infectadas con Ye en la proliferación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	89
Efectos de las CDs TNFRp55 <sup>-/-</sup> sobre el perfil de citoquinas secretadas por linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	91
Resumen. Modelo.....	94
Objetivo 3.....	96

<i>Determinación de IL-12/23p40 en JAWS II</i> .....	97
<i>Expresión de marcadores moleculares</i> .....	98
<i>Participación de las vías MAPKs en la producción de IL-12/23p40</i> .....	99
<i>Estandarización y optimización de ensayos en células JAWS II</i> .....	100
<i>Modificación de medio de cultivo</i> .....	101
<i>Análisis de marcadores moleculares</i> .....	102
<i>Comparación de los efectos de los factores de crecimiento sobre la expresión de marcadores de superficie de células JAWS II</i> .....	104
<i>Comparación de los efectos de los factores de crecimiento sobre la producción de IL-12/23p40 por las vías de MAPKs por células JAWS II</i> .....	105
<i>Comparación de los efectos de los factores de crecimiento sobre el rol regulador de TNF<math>\alpha</math> sobre la producción de IL-12/23p40 por células JAWS II</i> .....	106
<b><i>Discusión</i></b> .....	<b>108</b>
<i>IL-12/23p40 blanco de desregulación</i> .....	109
<i>Células dendríticas: rol central en la inmunopatogenia de ARe</i> .....	110
<i>Vías MAPKs involucradas en la producción de IL-12/23p40</i> .....	112
<i>Inhibidores específicos de TNF</i> .....	113
<i>Subtipos de CDs</i> .....	114
<i>JAWS II como modelo experimental</i> .....	117
<b><i>Conclusiones</i></b> .....	<b>120</b>
<b><i>Referencias Bibliográficas</i></b> .....	<b>123</b>

*Resumen*

## Resumen

Las células dendríticas (CDs) juegan una función crítica en el inicio de la respuesta inmune. Entender su rol en la Artritis reactiva (ARe) podría ayudar a delinear la patogénesis de esta artropatía. En estudios previos, hemos detectado una desregulación de la Interleuquina (IL)-12/23p40 en ARe inducida por la bacteria *Yersinia enterocolitica* (Ye) en ratones deficientes en TNFRp55 (*TNFRp55<sup>-/-</sup>*).

En el presente estudio, ensayamos la contribución de CDs en la sobreproducción de dicha citoquina. Primero, confirmamos en sobrenadantes de esplenocitos de ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* obtenidos el día del inicio de ARe (14 días post-infección) y estimulados con lipopolisacárido (LPS), niveles elevados de IL-12/23p40, IFN- $\gamma$  e IL-17A. Luego, identificamos en esplenocitos totales un aumento en la frecuencia de CDs IL-12/23p40<sup>+</sup> en ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* infectados con Ye, evidenciando a las CDs como una fuente principal de IL-12/23p40. Posteriormente, aplicamos un modelo de expansión *in vivo* de CDs mediante inyección de células de melanoma B16 transfectadas con FLT3L (de sus siglas del inglés fms-like tyrosine kinase 3 ligand). Demostramos que CDs *TNFRp55<sup>-/-</sup>* purificadas y aisladas de bazo secretaron una mayor cantidad de IL-12/23p40, y en ensayos de co-cultivo, favorecieron la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> wild-type (WT) hacia los fenotipos Th1 y Th17.

Un análisis realizado sobre las vías de quinasas MAPKs (de su sigla en inglés Mitogen-Activated Protein Kinases), utilizando inhibidores específicos de las vías JNK y p38 MAPK, demostró que estas vías están involucradas en la sobreproducción de IL-12/23p40 en CDs *TNFRp55<sup>-/-</sup>* purificadas, como así también en la línea celular de dendríticas JAWS II. Esta desregulación fue nuevamente atribuida a la deficiencia de TNFRp55 utilizando un inhibidor específico de la vía (CAY10500), el cual comprometió el control de IL-12/23p40 mediada por TNF (factor de necrosis tumoral) en CDs WT

estimuladas con LPS. Simultáneamente, este inhibidor redujo la producción de IL-10, sugiriendo su rol regulador en la producción de IL-12/23p40 mediado por la señalización por TNFRp55.

Estos resultados proveen datos experimentales sobre la existencia de un circuito anti-inflamatorio mediado por TNFRp55 en CDs. Por lo tanto, Estas células pueden considerarse un nuevo blanco en el tratamiento de ARe.

---

**Abstract**

Dendritic cells (DCs) play critical functions in the initiation of immune responses. Understanding their role in reactive arthritis (ReA) will help delineate the pathogenesis of this arthropathy. In early studies we detected IL-12/23p40 deregulation in *Yersinia enterocolitica* (Ye)-induced ReA in TNFRp55-deficient (*TNFRp55<sup>-/-</sup>*) mice. In the present study, we investigated the contribution of DCs in this overproduction. First, greater levels of IL-12/23p40, IFN- $\gamma$  and IL-17A were confirmed in supernatants of lipopolysaccharide (LPS)-stimulated *TNFRp55<sup>-/-</sup>* splenocytes obtained on arthritis onset (day 14 after Ye infection). Later, DCs were identified as a precise source of IL-12/23p40 since increased frequency of splenic IL-12/23p40<sup>+</sup> DCs was detected in *TNFRp55<sup>-/-</sup>* mice.

After robust *in vivo* amplification of DCs by injection of Fms-like tyrosine kinase 3- Ligand (Flt3L)-transfected BL16 melanoma, DCs were purified. These cells recapitulated the higher production of IL-12/23p40 under TNFRp55 deficiency. In agreement with these results, *TNFRp55<sup>-/-</sup>* DCs promoted Th1 and Th17 programs by co-culture with WT CD4<sup>+</sup> lymphocytes.

A mechanistic study demonstrated that JNK and p38 MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) pathways are involved in IL-12/23p40 overproduction in purified *TNFRp55<sup>-/-</sup>* DCs as well as in the JAWS II cell line. This deregulation was once again attributed to TNFRp55 deficiency since CAY10500, a specific inhibitor of this pathway, compromised TNF-mediated IL-12/23p40 control in LPS-stimulated WT DCs. Simultaneously, this inhibition reduced IL-10 production, suggesting its role mediating IL-12/23p40 regulation by TNFRp55 pathway.

These results provide experimental data on the existence of a TNFRp55-mediated anti-inflammatory circuit in DCs. Moreover, these cells may be considered as a novel target in the treatment of ReA.

# *Abreviaturas*



<b>ADN:</b> Ácido Desoxirribonucleico	<b>CSF1-R:</b> receptor 1 del factor estimulador de colonias
<b>Ail:</b> locus adhesión-invasión (del inglés <i>attachment-invasion locus</i> )	<b>CTL:</b> linfocitos T citotóxicos
<b>AINE:</b> drogas antiinflamatorias no esteroides	<b>DC-SIGN:</b> No integrina aglutinante de ICAM-3 específica de CD
<b>AMH:</b> agar Mueller-Hinton	<b>DMARD:</b> drogas antireumáticas modificadoras de la enfermedad (del inglés <i>disease-modifying antirheumatic drugs</i> )
<b>ANOVA:</b> Analisis de varianza	<b>DMSO:</b> dimetilsulfóxido
<b>APC:</b> Alofocianina	<b>ELISA:</b> ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>ARe:</b> Artritis Reactiva	<b>ERK:</b> enzima quinasa regulada por señales extracelulares
<b>ARN:</b> Ácido Ribonucleico	<b>EspA:</b> Espondiloartropatías
<b>ATCC:</b> del inglés <i>American Type Culture Collection</i>	<b>FITC:</b> Isotiocianato de Fluoresceína
<b>BDCA-1:</b> Antígeno-1 de células dendríticas de sangre	<b>FMO:</b> fluorescencia menos uno
<b>CAY:</b> CAY10500	<b>GLM:</b> ganglios linfáticos mesentéricos
<b>CDc:</b> CDs convencionales	<b>GM-CSF:</b> factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
<b>CDP:</b> precursores comunes de CDs	<b>hFlt3L:</b> de sus siglas en inglés “human fms-like tirosine kinasa 3 ligand”
<b>CDs:</b> células dendríticas	<b>HKY:</b> Ye muerta por calor
<b>CFSE:</b> diacetato de carboxifluoresceína ester succinimidil	
<b>CICUA:</b> Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales	
<b>CL:</b> caldo Luria	
<b>CPA:</b> células presentadoras del antígeno	

<b>HLA:</b> antígeno leucocitario humano (de las siglas en inglés <i>human leukocyte antigen</i> )	<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b> factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>HPI:</b> isla de alta patogenicidad	<b>NK:</b> asesina natural (del inglés <i>Natural Killer</i> )
<b>Hsp60:</b> proteínas de shock térmico	<b>p38:</b> proteinquinasa de la familia MAPK
<b>i.p:</b> intraperitoneal	<b>PBS:</b> buffer fosfato salino
<b>IFN:</b> Interferón	<b>pCDs:</b> CDs plasmotoides
<b>IL:</b> interleuquina	<b>PE:</b> ficoeritrina
<b>IL-10<sup>-/-</sup>:</b> ratón deficiente en IL-10	<b>PerCp:</b> Proteína Clorofila Peridinina
<b>IL-12R:</b> receptor de IL-12	<b>PFA:</b> Paraformaldehido
<b>IP:</b> ioduro de propidio	<b>PP:</b> Placas de Peyer
<b>JAWS II:</b> línea celular de CDs de ratón	<b>pYV:</b> plásmido de virulencia de <i>Yersinia</i> (del inglés <i>plasmid of Yersinia virulence</i> )
<b>JNK:</b> enzima quinasa c-Jun-N	<b>RAK1:</b> proteína serina/treonina quinasa 1
<b>LPS:</b> Lipopolisacarido	<b>RIPK3:</b> proteína serina/treonina quinasa 3
<b>LUBAC:</b> del inglés <i>linear ubiquitin chain assembly complex</i>	<b>SF:</b> solución fisiológica
<b>MAPK:</b> proteínas quinasas activadas por mitógenos	<b>SFB:</b> suero fetal bovino
<b>MFI:</b> Intensidad de fluorescencia media	<b>T3SS:</b> sistema de secreción tipo 3
<b>MHC II:</b> complejo mayor de histocompatibilidad clase II.	<b>Th:</b> células T colaboradora
<b>MOI:</b> multiplicidad de infección	<b>TNF:</b> factor de necrosis tumoral
<b>mTOR:</b> diana de rapamicina en células de mamíferos	<b>TNFh:</b> TNF humano recombinante
<b>MyM:</b> materiales y métodos	

**TNFRp55<sup>-/-</sup>**: ratones deficientes en TNFRp55

**TNFRp55**: Receptor tipo I de TNF (sinónimos del mismo receptor TNFR1, CD120a)

**TNFRp75**: Receptor tipo II de TNF (sinónimos del mismo receptor TNFR2, CD120b)

**TRADD**: motivos de dominio de muerte conservados

**TRF2**: factor 2 asociado a TNFR

**UFC**: unidades formadoras de colonia

**WT**: Wild-Type

**YadA**: adhesina A de *Yersinia*

**Ye**: *Yersinia enterocolitica*

**Yops**: proteínas externas de Ye (del inglés “*Yersinia outer proteins*”)

# *Introducción*

## 1) Artritis Reactiva

### 1.1) Definición

La ARe es una sinovitis aséptica que se desarrolla como consecuencia de una infección distante, usualmente en el tracto genitourinario o gastrointestinal. La misma pertenece al grupo de artritis seronegativas conocidas como espondiloartropatías (EspA) [1].

El criterio diagnóstico válido para ARe, es observar en pacientes las manifestaciones que implican una artritis asimétrica, la cual puede ser mono u oligoartritis y que involucra las extremidades bajas. La misma debe presentarse después de un periodo de días o semanas de la confirmación microbiológica de una infección entérica o genitourinaria, la cual ha sido corroborada por medio de evidencia clínica o de laboratorio [2].

Hoy en día no hay un criterio bien definido para el diagnóstico de ARe, por lo cual es necesario profundizar en la identificación de factores, tanto microbianos como del hospedador que llevan a la cronicidad de la enfermedad, los cuales permitirían identificar, definir y diagnosticar ARe [3].

### 1.2) Agentes patogénicos de la enfermedad

*Chlamydia trachomatis* se encuentra fuertemente asociada con ARe, la misma es la más frecuente luego de una infección genitourinaria. Dentro de los patógenos gastrointestinales podemos nombrar *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Salmonella* (varias especies), *Shigella* (especialmente *S. flexneri*), y *Yersinia* (especialmente *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*). Patógenos respiratorios tales como *Chlamydia pneumoniae* o *Mycoplasma pneumoniae* también están implicados en ARe. [4]

### 1.3) Epidemiología

ARe afecta a adultos jóvenes en el rango de 20-40 años de edad, es más frecuente en individuos caucásicos, posiblemente debido a la alta frecuencia del antígeno HLA-B27 en este grupo étnico. Este antígeno pertenece a las moléculas HLA (de las siglas en inglés *human leukocyte antigen*) clase I. Este tipo de artritis es rara en niños, y es usualmente producida por infecciones gastrointestinales [5].

Ambos sexos son afectados de igual manera luego de una infección gastrointestinal, mientras que la enfermedad producida por *C. trachomatis* es más frecuente en hombres en una relación 5:1 o 10:1 con mujeres [1].

La prevalencia estimada es de 30-40 casos por 100.000 adultos y la incidencia anual de esta enfermedad es de 4,6 casos/100.000 para *Chlamydia*, y 5/100.000 para enterobacterias. Sin embargo el número real puede ser significativamente mayor. Tomando en cuenta los números sobre el desarrollo de artritis posterior a brotes de infecciones por enterobacterias (ej. *Salmonella*, *Campylobacter* y *Yersinia*) la incidencia en estos casos es de 1 por cada 1.000 de la población [6].

Como se mencionó anteriormente, el factor genético fuertemente asociado a ARe es la familia de HLA-B27, que abarca 25 glicoproteínas (HLA-B\*2701 a HLA-B\*2725) [7]. Se han reportado pacientes positivos para este antígeno los cuales presentan ARe en un 50-80% [8]. A su vez algunos autores destacan que la presencia de este antígeno aumenta el riesgo de contraer la enfermedad en un 50% [9].

### 1.4) Sintomatología

El inicio de la ARe suele ir precedido de los síntomas de la infección desencadenante. Estos incluyen diarrea en el caso de infección gastrointestinal, que en algunos casos puede ser tan severa, que lleva a la sospecha de una enfermedad inflamatoria intestinal, como la enfermedad de Crohn [10]. En el caso de la infección urogenital, los síntomas urinarios incluyen disuria o poliuria, especialmente en hombres.

Otros problemas urogenitales que pueden surgir son prostatitis en hombres y cervicitis, salpingitis y/o vulvo-vaginitis en mujeres. Los síntomas clínicos de ARe pueden desarrollarse 1-3 semanas (pero también hasta 6 semanas) después de la infección. Sin embargo, algunas excepciones están representadas por la infección con *C. trachomatis*, en la cual el período de latencia hasta el desarrollo de la ARe puede ser mayor alcanzando hasta 4 semanas en sólo un tercio de los casos, y además, puede causar infecciones silenciosas en las mujeres [5].

El principal síntoma de presentación de ARe es la oligoartritis asimétrica, localizada en las articulaciones grandes de las extremidades inferiores (rodillas, tobillos y pies). La duración media de la artritis es de 4-5 meses, pero dos tercios de los pacientes pueden experimentar síntomas osteomusculares leves que pueden persistir más de 1 año. Es frecuente el desarrollo de síntomas extra-articulares como la presencia de bursitis (inflamación de las bolsas sinoviales de las articulaciones) y entesitis (inflamación de la zona de inserción en el hueso de tendones, músculos o ligamentos). Otros síntomas extra-articulares que pueden aparecer son: dolor lumbar, enfermedad ocular (conjuntivitis, uveítis anterior aguda) y manifestaciones dérmicas (queratoderma blenorrágico, eritema nudoso, úlceras orales, uñas hiperqueratósicas) [11].

## 1.5) Tratamiento

Para el tratamiento contra la infección bacteriana se utilizan terapias antimicrobianas basadas en el uso de azitromicina, tetraciclinas o una combinación de ambas. Una enteritis no complicada no requiere de antibióticos, los cuales no han demostrado un beneficio para prevenir el desarrollo o mejorar el pronóstico de la artritis crónica [5].

Tradicionalmente, el tratamiento de ARe ha implicado un ensayo inicial de las drogas antiinflamatorias no esteroideas (AINE) y las inyecciones locales de corticosteroides con la adición de un DMARD (del inglés *disease-modifying antirheumatic drugs*) si el paciente persiste con la sintomatología. Existe poca evidencia

sobre la eficiencia de los DMARDs, en parte debido a la relativa infrecuencia de su uso, ya que aproximadamente 50% de los pacientes se recuperan de ARe en los primeros 6 meses, y sólo el 4-19% de los pacientes continúan desarrollando ARe crónica, la cual puede durar más de un año [12].

Debido a la clara relación entre la infección por enterobacterias o *C. trachomatis* y el desarrollo de artritis, la utilización de antibióticos ha sido propuesta como tratamiento. En un trabajo publicado recientemente se comparó el uso de diferentes antibióticos realizando un meta-análisis y se concluyó que la eficiencia de los antibióticos para el tratamiento de ARe es muy heterogénea, por lo cual no se puede concluir respecto a su utilidad. Uno de los principales problemas hallado en este estudio fueron los diferentes diseños de los ensayos clínicos realizados [13].

A diferencia de los otros tipos clínicos de EspA, no existen directrices para ARe con respecto a un tratamiento más agresivo si falla la terapia inicial. Existe escasa experiencia sobre el uso de drogas denominadas agentes biológicos tales como infliximab y etanercept, los cuales son agentes bloqueantes de TNF (factor de necrosis tumoral). Limitados datos clínicos sugieren un posible efecto beneficioso de la utilización de estos agentes biológicos para el tratamiento de ARe. En un estudio abierto en el cual se ensayó etanercept en sólo 16 pacientes con ARe o EspA indiferenciada, se informó una respuesta favorable en 9 pacientes de 10 que completaron el tratamiento de 6 meses [12]. También existen informes de casos aislados en los cuales se utilizó infliximab como tratamiento [14]. Sin embargo, se requiere mayor cantidad de ensayos que avalen la seguridad y eficacia de los agentes bloqueantes del TNF para esta patología.

## 1.6) Fisiopatología

ARe también puede ser definida como una artritis inflamatoria estéril, ya que los agentes causales de la enfermedad no pueden aislarse del líquido sinovial por técnicas clásicas. Sin embargo, desde el comienzo de los noventa el concepto de ARe ha cambiado por la influencia del progreso tecnológico en Microbiología y Biología Molecular, los que ha conducido a la detección de ADN o ARN bacteriano en tejido



sinovial, lo cual ha sido más convincente en ARE por *C. trachomatis* que en las ARE por enterobacterias, aunque se han informado aislamientos de material genético de *Yersinia*, *Salmonella* y *Campylobacter*. De los mismos hay pocos estudios reportados, los cuales han utilizado escaso número de pacientes y en algunos no se han podido reproducir, que ha llevado a la sospecha de resultados falsos positivos [15].

También, se han detectado en las muestras sinoviales proteínas o productos bacterianos como Hsp60 (proteínas de shock térmico), ADN primasa, lipopolisacárido (LPS), etc. Los cuales son capaces de estimular la liberación de quimiocinas e inducir la secreción de proteínas pro-inflamatorias. Estas propiedades pueden ser las responsables de mantener a macrófagos activados en la sinovia, lo que llevaría a la cronicidad de la inflamación. Sin embargo, no se han esclarecido los factores que evitan la eliminación completa de estos componentes microbianos ni los mecanismos que favorecen la inflamación persistente [11].

## 2) *Yersinia*

### 2.1) Generalidades

El género *Yersinia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos, no esporulados que en general son más pequeños (0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1 a 3  $\mu\text{m}$  en longitud) que otros miembros de la familia y crecen lentamente [16]. Las mismas son anaerobias facultativas, oxidasa y lactosa negativas, y catalasa positivas. El crecimiento de estas bacterias ocurre en un rango de temperatura entre 4 y 43°C [17].

Actualmente el género *Yersinia* abarca 18 especies, de las cuales tres son patógenas para el hombre: *Ye* y *Y. pseudotuberculosis*, causantes de enfermedades entéricas; y *Y. pestis*, responsable de la peste bubónica [18]. Las 15 especies restantes son consideradas avirulentas o su presunta patogenicidad no ha sido estudiada o confirmada hasta el momento (aunque algunos son patógenos en otros hospedadores, como *Y. ruckeri* que causa enteritis de la boca roja en salmónidos [19], y *Y. entomophaga* que posee actividad insecticida [20]).

En la actualidad, los estudios genómicos poblacionales se han convertido en una herramienta importante en Microbiología mejorando considerablemente el nivel de resolución con el que se pueden investigar distintos eventos evolutivos [21]. En este sentido, el estudio del género *Yersinia* ha llegado a ser fundamental para la comprensión de la evolución patogénica en mamíferos. Al combinar un enfoque genómico con un análisis de rendimiento metabólico, mediante microarrays de fenotipo, ha sido posible trazar los orígenes de cada especie, comparando las especies patógenas con las no patógenas, permitiendo revelar los caminos evolutivos que dieron origen a la virulencia en humanos [22]. Así, han sido identificados genes asociados a la virulencia que podrían emplearse como marcadores para el diagnóstico. Finalmente, nuevos análisis de datos genómicos proporcionarán mayor comprensión de los mecanismos implicados en la evolución de la patogenicidad y por lo tanto brindarán herramientas para los tratamientos en caso de aparición de nuevas cepas patógenas [23].

## 2.2) *Yersinia enterocolítica*

La especie *Ye* constituye un grupo altamente heterogéneo de cepas no patógenas y patógenas. Basándose en la diferencia metabólica, tradicionalmente se agrupan en seis biotipos diferentes (biotipo 1A, 1B, 2, 3, 4 o 5) [16], que se clasifican además en numerosos serotipos en base a la composición del antígeno O del lipopolisacárido (LPS) [24]. Las cepas del biotipo 1A se consideran frecuentemente avirulentas. Sin embargo, hay algunas pruebas de que al menos algunas cepas de este biotipo pueden causar síntomas gastrointestinales. Se han notificado infecciones extraintestinales esporádicas, lo que justificaría un análisis más detallado de su potencial patogénico y de su patogenicidad [25, 26]. Las cepas del biotipo 1B se describen como altamente patógenas en el modelo de infección en ratón debido a la presencia de una isla de alta patogenicidad (HPI) que codifica para el sistema sideróforo de *Yersiniabactina* [27, 28], mientras que los biotipos 2-5 poseen baja a moderada patogenicidad [29].

En total, sólo 11 de los 70 serotipos son perjudiciales para los seres humanos y se han asociado con diferentes manifestaciones clínicas [30]. Entre las cepas patógenas más frecuentemente aisladas en Europa se encuentran en el biotipo 1B, los serotipos O:8, 2 / O:5, 27, 2 / O:9, 3 / O:3 y 4 / O:3 (en orden creciente de frecuencia) [31].

Mientras que en Estados Unidos, el serogrupo O:8 es el más importante [32, 33]. La mayoría de los estudios sobre la patogénesis de Ye se han realizado con cepas del bioserotipo 1B, serogrupo O:8 (Ye O:8) en el modelo de infección en ratón. Sin embargo, los casos de yersiniosis humana más frecuentemente notificados y los brotes reportados en todo el mundo son causados por cepas del bioserotipo 4, serotipo O:3 (Ye O:3), que tienen un bajo potencial patógeno en ratones [34].

Respecto a hallazgos clínicos en Argentina, se ha aislado Ye 1A / O:5 (biotipo/serotipo) de un paciente asintomático y otra cepa 4 / O:3 de las heces diarreicas de un niño [35]. Más recientemente, se informó el aislamiento de Ye 1A / O:5 de un paciente con diarrea [36] y también el aislamiento de seis cepas de Ye de las heces diarreicas de seis de 181 pacientes [37]. Aunque las cepas de Ye 4 / O:3 no han sido aislados de los alimentos en nuestra región, Ye 2 / O:9 y otros bio-serotipos se han recuperado de diferentes tipos de alimentos en San Luis, Argentina [38-40].

### **2.3) Síntomatología**

La yersiniosis es una enfermedad transmitida por alimentos. El principal reservorio es el cerdo [41], aunque también se ha aislado de vacas, ovejas, cabras y animales domésticos como perros y gatos. Asimismo se ha aislado de leche y sus derivados [42], de huevo, carnes crudas, aves de corral, verduras y diversos preparados alimenticios [43]. Ye es una preocupación particular para la seguridad de los consumidores, porque es capaz de crecer significativamente en los alimentos almacenados a temperaturas de refrigeración sin signos aparentes de deterioro [44].

Ye es principalmente un patógeno gastrointestinal, sin embargo, condiciones de inmunodeficiencia del hospedador podrían favorecer la propagación extraintestinal de esta bacteria. La infección intestinal presenta mayor incidencia en niños pequeños, presentándose con diarreas autolimitadas que, en ocasiones, pueden ser sanguinolentas [45]. En niños mayores y adultos puede cursar con fiebre, dolor abdominal, diarrea y/o vómitos. Los pacientes sienten dolor en la fosa ilíaca derecha debido a la inflamación del íleon terminal y ciego con linfadenitis mesentérica. Este cuadro suele confundirse

con apendicitis [46]. Entre las manifestaciones extraintestinales se destacan la linfadenitis, eritema nodoso, uveítis, septicemia y ARe [47].

## 2.4) Infección y patogenicidad

Considerando que la ruta habitual de infección con Ye es a través de alimentos contaminados, inicialmente debe apreciarse que este microorganismo debe primero adaptar sus antígenos de superficie a un aumento de temperatura (37°C) [48, 49]. Esto se logra en parte mediante la presencia de un plásmido de 70 Kb, ausente en cepas avirulentas, denominado plásmido de virulencia de *Yersinia* (pYV, por sus siglas en inglés *plasmid of Yersinia virulence*) [16]. El establecimiento de la enfermedad ocurre tras las 24 a 48 horas de la ingestión [41].

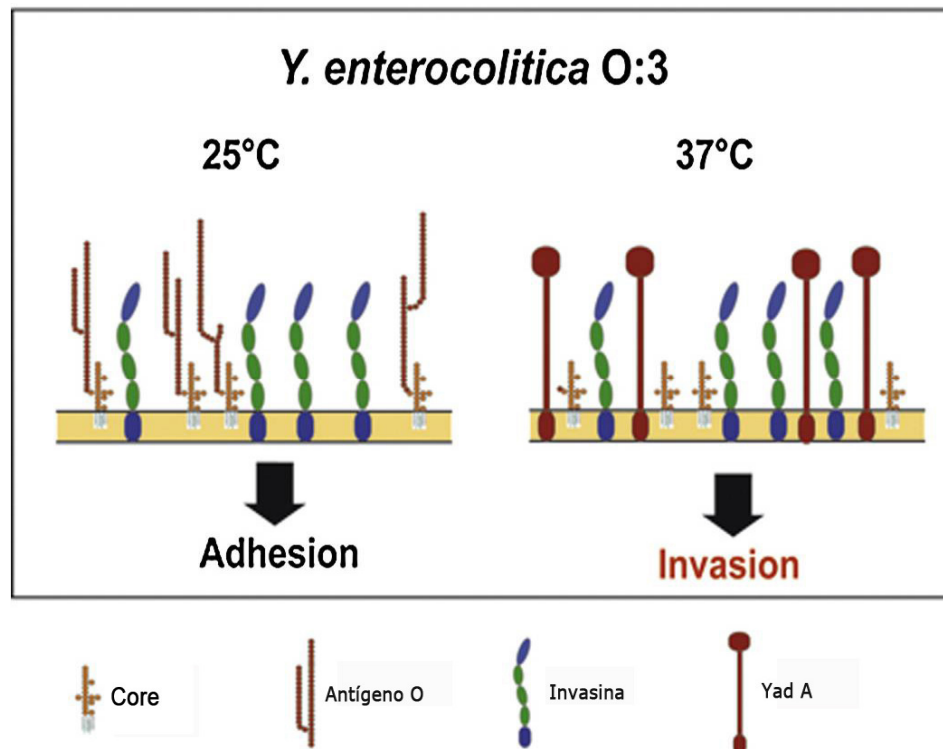
Una vez que Ye ha sido ingerida, debe poner en funcionamiento sus factores de virulencia para contrarrestar las barreras de defensa del hospedador. En una primera instancia, supera la acidez del estómago por acción de la ureasa [50]. Al llegar al intestino, Ye tiene especial afinidad por el íleon terminal y el colon proximal [16, 51]. El aumento gradual de la temperatura dentro del hospedador, induce la expresión de factores de virulencia necesarios para la colonización e infección dentro de los tejidos linfáticos y evadir el sistema inmunológico (Fig. 1) [52].

Ye establece contacto con la célula hospedadora a través de dos proteínas codificadas en el cromosoma, invasina y Ail (por sus siglas en inglés *attachment-invasion locus*), y la proteína YadA (adhesina A de *Yersinia*) codificada en el plásmido de virulencia [53]. La invasina promueve la internalización de Ye por las células del epitelio del intestino delgado mediante la unión a los receptores diana conocidas como  $\beta$ 1-integrinas que se presentan en la superficie de la célula del hospedador [54]. Las integrinas se agrupan por la unión de la invasina, y el resultado es el reordenamiento del citoesqueleto de la célula hospedadora. Esto promueve la fagocitosis y finalmente la internalización de las bacterias por las células epiteliales [55-57]. Se pensaba que YadA se limitaba a interactuar sólo con las grandes proteínas de la matriz extracelular: colágeno, fibronectina y laminina, pero recientemente se descubrió que la adhesión mediada por YadA puede ser facilitada por una amplia gama de receptores de las células hospedadoras, inclusive en ausencia de  $\beta$ 1-integrinas. A su vez, YadA se une al mucus

intestinal, y además, juega un papel importante en conferir resistencia al suero [58]. La adhesina Ail media la unión a diversas líneas celulares epiteliales y proteínas de la matriz extracelular, incluyendo laminina, fibronectina, vitronectina, y proteoglicanos de heparán sulfato [59, 60]. De esta manera, se establece una fuerte adhesión e invasión a la célula hospedadora.

Una vez que las bacterias han sido internalizadas, son transportadas a través de la barrera epitelial hasta la región basal de las células M. En la región del domo subepitelial, se encuentran CDs, macrófagos y linfocitos, constituyendo la primera línea de defensa en la placa de Peyer (PP) [61]. En el interior de la PP, Ye comienza a proliferar extracelularmente e induce respuesta inflamatoria [62]. Desde las PP la bacteria disemina a los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y otros tejidos como bazo, hígado y/o pulmón [63]. En estos tejidos, la bacteria forma microabscesos debido a la replicación extracelular. Hay evidencia de tropismo de la bacteria hacia las zonas enriquecidas en células B y T de los ganglios linfáticos, en los cuales Ye evita la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos [64].

Ye utiliza diferentes estrategias para evitar las respuestas inmunes innata y adaptativa del hospedador. Sin embargo, en un individuo normal, una adecuada respuesta de células T colaboradora tipo 1 (Th1) permite la eficiente eliminación del patógeno [65].



**Fig.1 Expresión de factores de superficie dependientes de temperatura en Ye.** Diferentes expresión y estructura de la molécula LPS según la temperatura, y la expresión constitutiva de factores de internalización llevan a una correcta adhesión de Ye O:3 en la célula del hospedador. Adaptado de Valentin-Weigand y col [66]

## 2.5) Factores de Virulencia

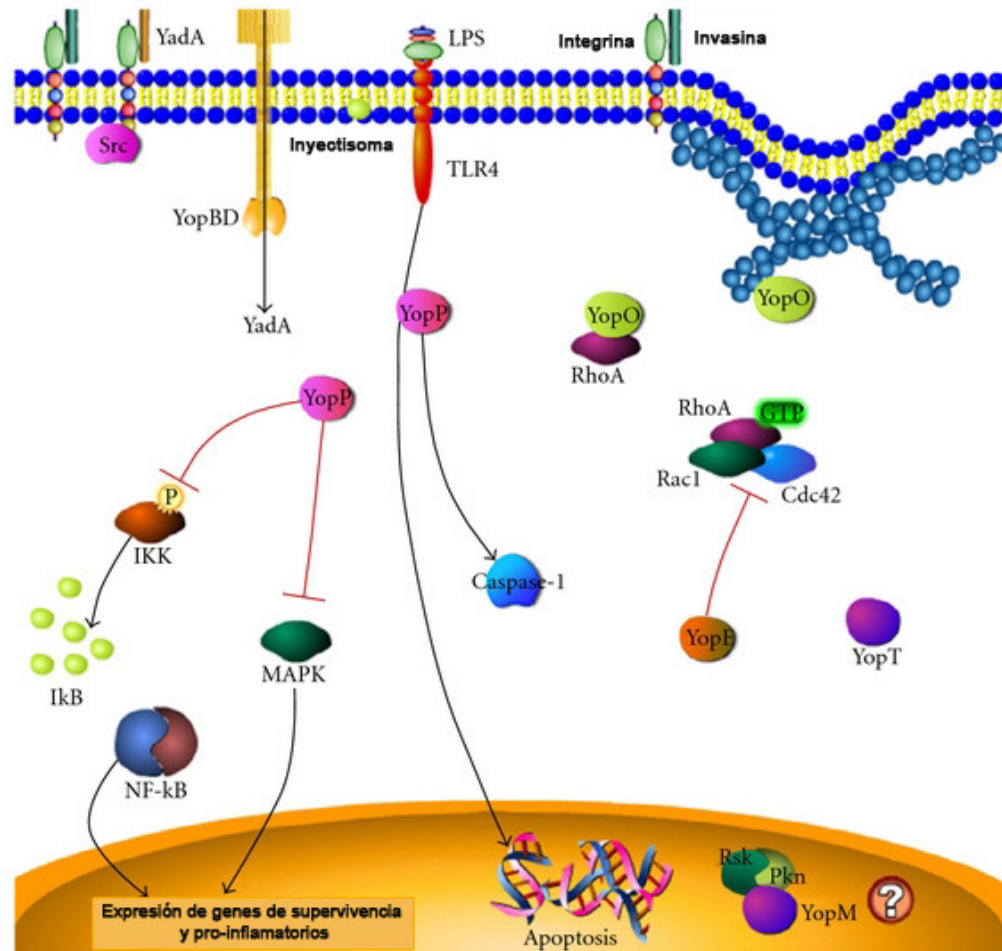
Además de las proteínas de adhesión necesarias para la internalización, pYV codifica para una serie de proteínas efectoras llamadas Yops (proteínas externas de Ye, por sus siglas “*Yersinia outer proteins*”) [67]. Estas proteínas perturban la dinámica del citoesqueleto, inhiben la fagocitosis y bloquean la producción de citoquinas pro-inflamatorias, favoreciendo de este modo la invasión y supervivencia de Ye en los tejidos del hospedador [66].

Las Yops son traslocadas a través de la membrana plasmática hacia el citoplasma de las células blanco utilizando un sistema de secreción tipo 3 (T3SS). Este complejo sistema, está formado por el inyectisoma y el translocón, el cual forma un poro a través de la membrana de la célula hospedador. El inyectisoma está compuesto por una serie de proteínas que adoptan una estructura cilíndrica. El inyectisoma incorpora dos anillos de membrana denominados MS (membrana y supramembrana) y

OM (membrana externa, por sus siglas en inglés). Estos anillos están conectados a cinco proteínas integrales de membrana que participan en la exportación de proteínas. El propio aparato de exportación está flanqueado por YscQ, que facilita la unión de la ATPasa YscN y la secreción de complejos sustrato-chaperona. YscN proporciona la fuerza protón motriz necesaria para impulsar la secreción de los efectores Yops [68-70]. El translocón consiste en un poro proteico tripartito compuesto de dos proteínas transmembranas YopB y YopD y el complejo de inyección LcrV. Esta estructura macromolecular forma un canal en la membrana de la célula hospedadora por donde ingresan las proteínas efectoras Yops (Fig. 2) [60].

Cuatro de los factores de virulencia (YopE, YopT, YopO y YopH) están involucrados en la interrupción de las actividades normales del citoesqueleto [71]. Además, YopH también dirige un importante grupo de componentes de señalización de células eucarióticas, la familia RhoA (pequeñas GTPasas) que participan en el reordenamiento del citoesqueleto necesario para la fagocitosis [72]. YopE es un imitador funcional de proteínas eucarióticas activadoras de la actividad GTPasa (GAP) que altera el citoesqueleto de actina, dando como resultado la inhibición de la fagocitosis por los macrófagos [73]. YopT suprime la señalización mediada por RhoA mediante la escisión de la modificación post-traduccional de Rho GTPasa, que en última instancia impide la formación del fagosoma inhibiendo la internalización de la bacteriana e inhibe el ensamblaje de complejos de adhesión focal requeridos para el desarrollo de pseudópodos y la migración de macrófagos [74]. YopO se asocia con proteínas de la familia RhoA e inhibe la fagocitosis por unión a la actina [75]. YopH es multifuncional e interrumpe vías implicadas en la inmunidad innata y adaptativa, inhibe la autofagia y, como ya se mencionó, bloquea la fagocitosis en macrófagos [76]. Los restantes dos efectores (YopP y YopM) regulan el sistema inmune, controlando la inflamación y el reclutamiento de leucocitos. YopP es una serina/treonina/lisina acetiltransferasa que cataliza la acetilación de quinasas, inhibiendo su capacidad para activar la liberación de NF- $\kappa$ B, que de otro modo induciría la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Recientemente, YopP también ha mostrado un papel importante en la inhibición de caspasa-1 en macrófagos activados [77]. YopM es translocada en macrófagos, pero no se conoce si presenta una actividad enzimática específica y/o una verdadera función. Dentro de la célula eucariota, YopM puede interactuar y estimular quinasas celulares y se cree que se localiza en el núcleo, donde puede influir en la

expresión de una variedad de genes, regulando numerosas citoquinas pro-inflamatorias, y contrarrestando la respuesta inmune innata, promoviendo la reducción de células NK (*Natural Killer*) en hígado, bazo y sangre [78], como así también, previniendo la piroptosis al unirse a caspasa-1 e inhibiendo la activación del inflamasoma [79, 80].



**Fig. 2: Mecanismos de acción de Yops en la señalización y supervivencia del género *Yersinia* en la célula del hospedador.** Las proteínas de adhesión (Invasina y YadA) se asocian a la célula del hospedador mediante la unión a  $\beta 1$  integrinas, produciendo una estrecha proximidad entre las bacterias y la célula hospedadora, que facilita la inserción de la estructura inyectable de tipo aguja T3SS en la célula hospedadora. Por el inyectisoma se translocan las proteínas Yops a través de la membrana plasmática hacia el citoplasma de la célula hospedadora, donde interactúan con el citoesqueleto y las moléculas de señalización. YopO interactúa directamente con el citoesqueleto, así como con las pequeñas moléculas de señalización GTPasa (RhoA, Rac1 y Cdc42). YopE inhibe las actividades de RhoA, Rac1 y Cdc42. YopP promueve la apoptosis de la célula hospedadora inducida por LPS, favorece directamente la escisión de caspasa-1. YopP también inhibe a MAPK y la activación de NF- $\kappa$ B mediada por IKK, que impide la expresión de proteínas pro-inflamatorias y de genes de supervivencia celular. YopM forma un complejo con Rsk y Pkn en el núcleo de la célula hospedadora, y contribuye a la patogenia de la bacteria empleando múltiples mecanismos. Adaptado de Galindo y col [47]



### **3) Factor de Necrosis Tumoral**

#### **3.1) Generalidades**

Los primeros trabajos reportaron el rol del TNF en la apoptosis [81]. Actualmente, esta molécula está implicada en la regulación de numerosos procesos celulares importantes como proliferación, diferenciación, crecimiento y respuesta inmune [82]. TNF es producido por varios tipos de células incluyendo macrófagos, monocitos, neutrófilos, células T, células NK y CD8 [83-85].

El gen que codifica TNF está localizado en la región clase III del complejo mayor de histocompatibilidad en el cromosoma 6 humano entre los genes HLA-B y HLA-DR [86].

TNF se une a dos tipos de receptores para favorecer la supervivencia celular y la activación pro-inflamatoria de NF- $\kappa$ B y MAP quinasas [87]. A su vez, TNF activa a los fagocitos para engullir y limpiar los agentes infecciosos y restos celulares [88]. También, aumenta la expresión de las moléculas de adhesión en el endotelio vascular, permitiendo que células inmunes, como neutrófilos y macrófagos, puedan trasladarse a los sitios de daño tisular [89].

Sin embargo, en algunas enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoidea y espondilitis anquilosante, se han encontrado altos niveles de TNF. Algunos reportes han asociado la sobreproducción de TNF con polimorfismos genéticos encontrados tanto dentro de los genes que regulan su efecto y producción [88], como así también, en su propio locus [90].

#### **3.2) Receptores y vías de señalización**

El TNF ejerce sus efectos biológicos a través de la unión a sus dos receptores: TNFR1 (TNFRp55, CD120a) y TNFR2 (TNFRp75, CD120b) [91].

TNFR1 se expresa en forma ubicua, lleva motivos de dominio de muerte conservados (TRADD), y se activa tanto por TNF soluble como por TNF asociado a membrana [91].

En cambio, la expresión de TNFR2 está restringida a tipos celulares específicos, tales como neuronas, células inmunes y células endoteliales. El mismo carece de un dominio de muerte y por lo tanto es incapaz de inducir la muerte celular programada directamente. Es activado preferentemente por TNF asociado a membrana [92].

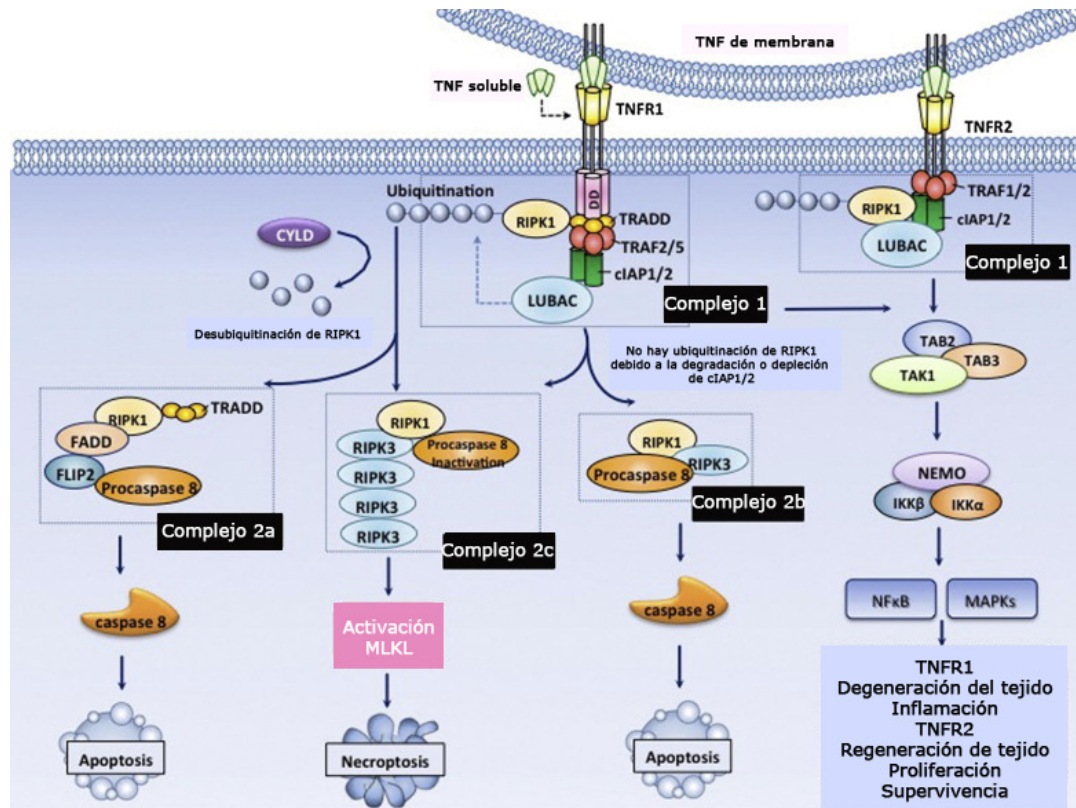
Ambos receptores del TNF son proteínas transmembrana, poseen una porción extracelular con tres dominios ricos en cisteína, los cuales interactúan con los trímeros de TNF [87]. El modelo de señalización del TNFR1 actual postula la activación y formación de varios complejos denominados 1, 2a, 2b y 2c, de acuerdo al estado de ubiquitinación de RIPK1 (proteína serina/treonina quinasa 1); en cambio TNFR2 sólo induce la formación del complejo 1.

Cuando TNF se une a TNFR1 y RIPK1 se encuentra ubiquitinada se forma el complejo 1. El mismo se encuentra constituido por complejos citoplasmáticos, comprendiendo a TRADD, RIPK1, TRF2 (factor 2 asociado a TNFR), cIAP1 o cIAP2 (proteína inhibidora de apoptosis 1 o 2) y el complejo LUBAC (por su sigla en inglés *linear ubiquitin chain assembly complex*) [93]. Para estabilizar y activar el complejo 1 se requiere de incorporación de ubiquitinas, proceso mediado por LUBAC [94, 95]. A su vez, este complejo permite el reclutamiento de otros complejos intermedios que conducen a la activación de MAPKs (quinasas activada por mitógeno) [93], tales como la quinasa c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal (JNK) y p38 MAPK. Esta cascada termina con la activación de factores de transcripción como AP1 y NF-κB. Los que llevan a la expresión de genes necesarios en la inflamación, defensa del hospedador, proliferación y supervivencia celular [96].

En la señalización de TNFR1 a través de los complejos 2a, 2b e 2c, en contraste con el complejo 1, los complejos 2a, 2b y 2c se ensamblan en el citoplasma y presentan distinta señalización y función [93, 97, 98]. Los complejos 2a y 2b conducen a la activación de una cascada de caspasas que resulta en muerte celular inducida por TNF mediante apoptosis. Las células apoptóticas son rápidamente fagocitadas por los

macrófagos, por lo cual este proceso de muerte celular tiene efectos supresores y lleva a una disminución de la producción de citoquinas inflamatorias [93].

El Complejo 2c activa la proteína de tipo quinasa de linaje mixto, efector de necroptosis (MLKL) mediante un mecanismo dependiente de RIPK3 (proteína serina/treonina quinasa 3). En contraste con la apoptosis, la necroptosis resulta en ruptura de la membrana plasmática, liberación de contenidos intracelulares y desencadenamiento de inflamación local. Las implicaciones de la necroptosis inducida por TNF en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias son el foco de varias investigaciones y, en particular, del estudio de las quinasas RIPK1 y RIPK3 que controlan estos procesos y que se las considera potenciales dianas terapéuticas. En la actualidad no se conocen los factores que determinan si el compromiso de TNFR1 induce al complejo 1, que conduce a respuestas inflamatorias, o a los complejos 2a, 2b y 2c, que conducen a la muerte celular, [99, 100].



**Fig. 3. Diferentes vías de señalización de TNF.** El complejo TNF-TNFR1 se activa tanto por TNF soluble como por TNF de membrana, a diferencia de TNFR2 que se activa preferentemente por TNF de membrana. La unión de TNF a TNFR1 promueve el reclutamiento de TRADD y RIPK 1. De acuerdo con el estado de ubiquitinación de RIPK1, se generan los complejos 1, 2a, 2b y 2c. La vía de señalización del complejo 1 de TNFR1 induce degeneración tisular, inflamación, defensa del hospedador, proliferación celular y supervivencia mediante la activación de NF- $\kappa$ B y MAPKs. Alternativamente, la formación del complejos 2a y 2b causa apoptosis y la del complejo 2c resulta en necroptosis e inflamación. TNFR2 carece de TRADD y se une directamente a TRAF1/2, llevando a la formación del complejo 1 y la posterior activación NF- $\kappa$ B y MAPKs. La vía de señalización de TNFR2 media principalmente un efecto homeostático, incluyendo la proliferación celular, supervivencia y regeneración de tejidos. Adaptado de Tseng y col [101]

### 3.3) Rol de TNF

El TNF es necesario para la defensa óptima contra patógenos, la adecuada organización de los órganos linfoides, la formación de centros germinales, el desarrollo de granulomas, la resolución de la inflamación y la inducción de la reparación tisular. Las funciones homeostáticas del TNF también están apoyadas por estudios en ratones que carecen de TNFRs y por ensayos funcionales [102, 103]. Un estudio demostró que TNF desensibiliza los macrófagos a los efectos deletéreos de los desafíos inflamatorios

secundarios (tolerabilidad) [104]. Otros autores han descrito los efectos homeostáticos de TNF en la regeneración de los tejidos, como la re-mielinización neuronal, la remodelación cardíaca y la regeneración del cartílago. Asimismo, TNF tiene efectos supresores sobre los procesos inmunes adaptativos en modelos de autoinmunidad como la encefalitis autoinmune [105].

Además, TNF induce inflamación, activa el endotelio vascular y orquesta el reclutamiento de células inmunes [106]. La producción o función no controlada del TNF se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades inflamatorias tales como artritis reumatoidea, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, etc. En contraste con el papel bien definido de TNF en estas enfermedades, su papel en la patogénesis de la esclerosis múltiple no ha sido dilucidado [105]. Aunque los estudios iniciales sugirieron una función patogénica para el TNF en la esclerosis múltiple, los ensayos clínicos de un inhibidor global del TNF se interrumpieron debido al agravamiento inesperado de la enfermedad [107].

Este hallazgo destaca la complejidad de los sistemas biológicos y cómo la mayoría de las moléculas tienen acciones opuestas que dependen del tiempo, el nivel y la ubicación de la exposición. Se ha demostrado que TNF puede tener efectos pro-inflamatorios y actividades anti-inflamatorias [108]. Varias líneas de investigación evidencian que la terapia con anti-TNF promueve la activación de las células T autoreactivas. El tratamiento con inhibidores de TNF es eficaz para muchos tipos de artritis, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal y, probablemente, otras condiciones inmuno mediadas. Sin embargo, estos mismos medicamentos también se han asociado con la inducción de varios fenómenos autoinmunes [109].

#### **4) Interleuquina 12/23p40**

La IL-12 es una de las citoquinas más importante del sistema inmune [110]. La molécula pro-inflamatoria de 70 kDa de IL-12 funciona como una respuesta potente a microorganismos patógenos. Células B, CD4 y macrófagos son los principales productores de dicha citoquina. Estructuralmente, IL-12 se compone de dos subunidades:  $\alpha$  (IL-12p35) y  $\beta$  (IL-12p40) con un peso de 35 kDa y 40 kDa,

respectivamente. Cada subunidad está codificada en cromosomas separados, y una vez expresadas, las mismas se unen mediante un enlace covalente [111].

La subunidad p35 de IL-12 se expresa constitutivamente en bajos niveles en la mayoría de las células, pero incrementa su expresión durante la activación celular estimulada por una infección. En contraste, el gen IL-12p40 está bajo control transcripcional y se expresa sólo en células presentadoras del antígeno (CPA) activadas por productos microbianos. Por lo tanto, para formar IL-12 activa existe la necesidad de una co-expresión simultánea de IL-12p35 e IL-12p40 dentro de una misma célula. A su vez, el nivel de IL-12p40 es de hasta 1000 veces superior a la de IL-12p35 [112], por lo tanto, siempre hay una gran cantidad de moléculas libres de IL-12p40 dentro de las células [113].

La subunidad p40 es común a dos citoquinas IL-12 e IL-23 (miembro de la familia IL-12), que también tienen sus subunidades específicas p35 y p19, respectivamente. Mientras IL-12 promueve el fenotipo efector de linfocitos Th 1, productor de IFN- $\gamma$ , IL-23 estabiliza e induce proliferación de células Th17 productoras de IL-17 [111]. En conjunto, estos mecanismos reguladores representan una importante conexión entre el sistema inmune innato y adaptativo, ya que promueven la diferenciación de células T. Sin embargo, este "punto de control" también ofrece un riesgo potencial significativo para la desregulación en caso de enfermedad [114].

#### **4.1) Rol de IL-12/23p40**

Las principales células blanco de IL-12 son células T y NK, las cuales, a través de la producción de IFN- $\gamma$ , activan macrófagos para producir NO sintetasa y posteriormente liberar especies reactivas de oxígeno. Como resultado de estos efectos de IFN- $\gamma$  sobre macrófagos, se logra una mejor función fagocítica e inflamación local [115]. Por otra parte, IL-12 impulsa el desarrollo de células T vírgenes a células Th1 e impide la diferenciación de Th2. Sin embargo, IL-12 no es suficiente para guiar este proceso, ya que células T vírgenes no expresan la cadena  $\beta 2$  del receptor de IL-12 (IL-12R). En cambio, se ha observado que IL-27 (otro miembro de la familia IL-12), secretada por las CD en respuesta a la estimulación antigénica, inicia el desarrollo de

Th1 uniéndose a IL-27R en células T vírgenes, seguido de la activación de STAT3 y STAT1. Los mismos participan en la proliferación de células T y en la inducción de T-bet, el factor de transcripción clave del linaje Th1, así como induce la represión de GATA3, la contraparte de T-bet en Th2. Después de la expresión de T-bet, las células T son capaces de producir IL-12R $\beta$ 2, de esta manera pueden detectar la IL-12 liberada por fagocitos e inducir la secreción de Interferón (IFN)- $\gamma$  [112, 116, 117].

Además, IL-12 induce en las células NK y en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTL) su proliferación y el aumento de su potencial citotóxico, por ejemplo mediante una mayor producción de granzimas y perforinas. Al mismo tiempo, en las células B favorece la secreción de isotipos de anticuerpos particulares asociados con la respuesta Th1[112].

Consistente con su participación en respuestas inmunes principalmente celulares, se ha observado que ratones con deficiencia en los genes IL-12p35 o IL-12p40 muestran una mayor susceptibilidad a las infecciones con patógenos intracelulares tales como *Toxoplasma gondii* o *Listeria monocytogenes* que los ratones de tipo salvaje. Curiosamente, hay pruebas que demuestran que el defecto inmunológico en animales deficientes en p40 es más pronunciada que en los homólogos deficientes en p35, lo cual podría estar asociado con el hecho que p40 es el constituyente de IL-12 e IL-23 [115].

Por otro lado, ha sido ampliamente estudiado el papel de IL-12 en varios modelos animales de enfermedades humanas, ya que se cree que es la causa de autoinmunidad y de una respuesta excesiva de células Th1. En la psoriasis se conoce muy bien el papel que cumple IL-12 a tal punto que se ha diseñado en la práctica clínica, una terapia dirigida a bloquear esta citoquina que actualmente se está aplicando con éxito en pacientes con esta enfermedad. Asimismo, hay varios hallazgos y conceptos actuales sobre el rol de IL-12 en el contexto de colitis, diabetes autoinmune, esclerosis, artritis reumatoidea y cáncer [114].

IL-12 e IL-23 representan dos citoquinas principales que controlan la inflamación, a través del perfil de células T para cumplir funciones patogénicas. Es cada vez más evidente que los niveles desregulados de IL-23 afectan principalmente la función barrera de epitelios, y se manifiesta en patologías de la piel, el intestino y los pulmones. IL-12 por otro lado, parece controlar la inmunidad sistémica contra patógenos. En enfermedades tales como: enfermedad inflamatoria intestinal, trastornos

artríticos y psoriasis se han realizado estudios clínicos dirigidos a neutralizar tanto IL-12 como IL-23, obteniéndose diferentes grados de éxito [118, 119].

## **5) Células Dendríticas**

### **5.1) Generalidades**

Las CDs fueron originalmente identificadas en bazo del ratón. En base a su morfología pudieron ser distinguidas de los macrófagos [120]. Posteriormente se las describió como los estimuladores más potentes en la reacción de los cultivos mixtos de linfocitos [121]. Estos experimentos sentaron las bases de décadas de investigaciones que demostraron la importancia de las CDs en iniciar la respuesta inmune adaptativa. Dichas células expresan altos niveles de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y de la integrina CD11c [122, 123]. Se distinguen por su capacidad de migrar de un órgano no linfoide a uno linfoide y por estimular a los linfocitos T.

Uno de los problemas que se ha presentado en su estudio es la falta de marcadores fenotípicos que permitan una distinción inequívoca entre CDs, monocitos y macrófagos. Esto ha llevado a algunos investigadores a cuestionar la existencia de CDs como una célula independiente con propiedades funcionales únicas [124]. Para evitar estos inconvenientes, recientemente se han realizado estudios que permiten caracterizar precursores de CDs en ratón y en humanos, simultáneamente con estudios de la ontogenia de macrófagos y monocitos, los que sugirieron que las CDs pueden agruparse en una descendencia común de un grupo progenitor hematopoyético. Esta perspectiva ontogenética permite definir a CDs como un linaje hematopoyético discreto independiente de su fenotipo y función, permitiendo la exploración sin restricciones del rol de las mismas en la inmunidad y homeostasis [125].

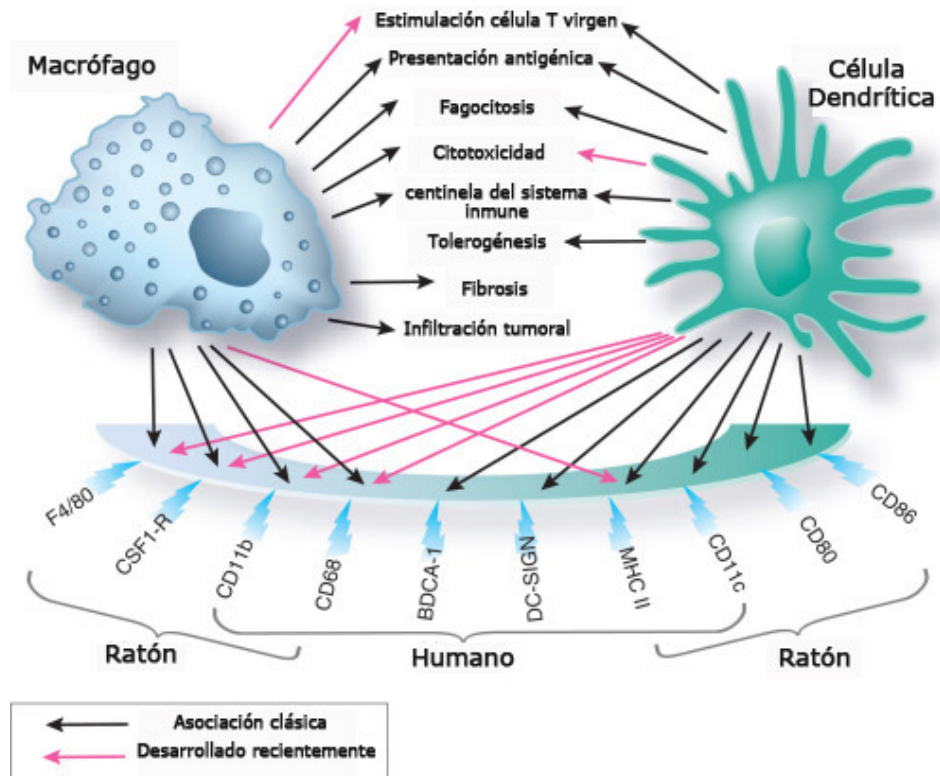


## 5.2) Rol de CDs

Las CDs son consideradas como centinelas, ya que las mismas tienen una distribución *in situ* para optimizar la captura del antígeno y una migración a los órganos linfoides, lo que lleva a optimizar la selección clonal. A su vez son las células iniciadoras de las respuestas inmunitarias adaptativas, permitiendo la estimulación de linfocitos T y B quiescentes, vírgenes y de memoria. Al mismo tiempo, tienen la capacidad de inducir tolerancia mediante la eliminación de timocitos auto-reactivos e inducir anergia de células T maduras [126].

Numerosas enfermedades que afectan al sistema inmunológico a menudo interfieren con la función de las CDs, como ocurre en patologías causadas por microorganismos y durante el desarrollo de tumores. Alternativamente, otras enfermedades promueven la sobre-activación de CDs como ocurre en las alergias, autoinmunidad y trasplante. También se ha estudiado el papel en la infección por HIV-1 en cultivos de tejidos, donde se encontró que las CDs transportan el virus a su sitio principal (centros germinales del tejido linfoide) para la replicación del mismo en células T. Por lo tanto, el estudio profundo de la participación de las CDs proporcionaría los medios para prevenir y combatir este tipo de enfermedades [127].

A pesar de dichos avances en el estudio de CDs, a medida que se ha profundizado en el estudio de marcadores de la superficie celular, se ha tornado más difícil distinguir CDs de macrófagos, ya que ambas células comparten estos marcadores, así como también ciertas funciones [128], las cuales se encuentran resumidas en la Fig. 4.



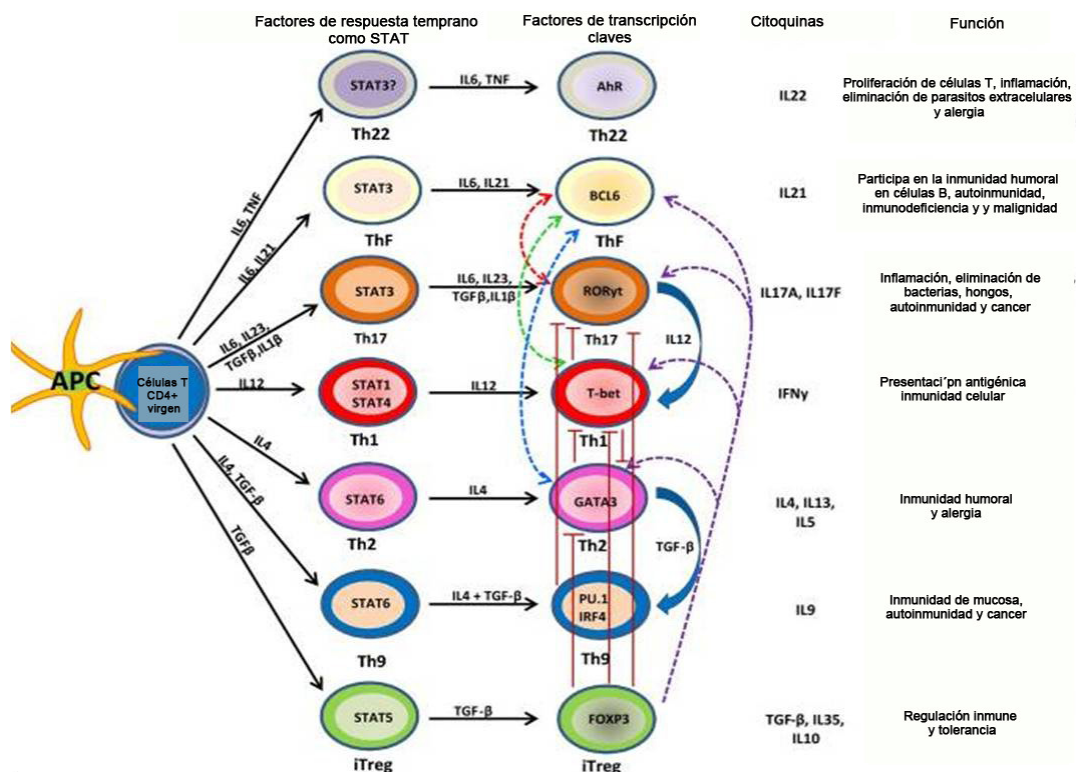
**Fig. 4. Diferencias y similitudes entre macrófagos y CDs.** Avances recientes en el estudio tanto de las características funcionales, como de los marcadores de las células han llevado a un aumento de la superposición entre las células consideradas "macrófagos" o "célula dendríticas". Abreviaturas: CSF1-R receptor 1 del factor estimulador de colonias; BDCA-1, Antígeno-1 de células dendríticas de sangre; DC-SIGN, No integrina aglutinante de ICAM-3 específica de CD; MHC II, complejo mayor de histocompatibilidad clase II. Adaptado de Ferenbach y col [128]

## 6) Perfil de linfocitos T CD4<sup>+</sup>

Las células T CD4<sup>+</sup> desempeñan un papel central en la respuesta inmune humoral colaborando con las células B en la producción de anticuerpos, en la inmunidad celular mediante la activación de células T CD8<sup>+</sup> y exaltando la función microbicida de macrófagos frente una amplia variedad de microorganismos. Las células T colaboradoras (Th) se pueden subdividir en diferentes linajes en base a sus propiedades inmunológicas, que se apoyan en la expresión de perfiles bien definidos de factores de transcripción, citoquinas y receptores (Fig. 5) [129].

Las células T CD4<sup>+</sup> pueden diferenciarse en los perfiles Th1, Th2, Th9, ThF, Th17 o Treg en respuesta a señales de la inmunidad innata, interacciones co-estimuladoras con CDs, citoquinas paracrinas y a través de cambios en el metabolismo

energético mediados por mTOR (diana de rapamicina en células de mamíferos). Las células T CD4<sup>+</sup> resultantes son altamente plásticas, pero con estimulación continua, las mismas desarrollan patrones estables de expresión de citoquinas, promoviendo la estabilización del perfil. Sin embargo, la remodelación de la cromatina, alterada por diferentes programas de citoquinas, permite transcribir factores específicos de linaje en respuesta a las variaciones ambientales, llevando a una modificación del perfil [130]. mTOR fue recientemente identificado como un posible regulador maestro de la diferenciación celular de células T CD4<sup>+</sup> [131].



**Fig. 5. Subconjuntos de células Th y su plasticidad.** Según la naturaleza del antígeno y la estimulación por células presentadoras del antígeno, tales como CD8, y mediante citoquinas que actúan sobre las células T vírgenes, estas células se diferencian en distintos subconjuntos de linfocitos Th efectores y T reguladores, que se caracterizan por la expresión de reguladores transcripcionales, marcadores de superficie celular y por la secreción de citoquinas específicas de linaje. Debido a la plasticidad, las células Th efectoras diferenciadas, pueden modificar su fenotipo. La regulación descontrolada de la especificación y compromiso del linaje puede resultar en el desarrollo de enfermedades inflamatorias y alérgicas. En la figura se muestran los factores de transcripción, citoquinas inductoras y características de cada fenotipo Th, y la función de cada linaje. Las líneas punteadas muestran los perfiles a los que pueden convertirse cada linaje, y las líneas de bloqueo indican los linajes que inhiben otros fenotipos Th. Adaptado de Tripathi y col [132]

## 7) Modelo de ARe. Antecedentes

En trabajos previos hemos demostrado el desarrollo de ARe severa y crónica en ratones deficientes en TNFRp55 infectados con Ye del serotipo O:3 [133]. Los mecanismos que participan en el desarrollo de artritis en este modelo no son completamente conocidos. En contraste, observamos que ratones deficientes en la subunidad p40 de IL-12/23 desarrollaron ARe aguda y más leve [134].

A su vez, hemos demostrado un incremento significativo en los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-17 en articulaciones de ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* comparado con ratones "wild-type" (WT), con incremento de p40, IL-12p70 e IL-23p19, sugiriendo que p40 podría ser el blanco de la desregulación en condiciones de deficiencia de TNFRp55[135]. Recientemente hemos demostrado que este microambiente inflamatorio modula, además, la respuesta de células T regulatorias [136].

Por otro lado, se observó que en el día 14 post-infección comienza la manifestación de la artritis inducida por Ye, detectando en este tiempo, un pico en la producción de IL-10 en los ganglios linfáticos drenantes a la articulación de ratones WT. Esto indicaría que la producción de IL-10 sería necesaria para modular la respuesta inmune frente a Ye a nivel articular y, de esa manera, resolver el proceso inflamatorio, como ocurre en el caso de los ratones WT, los cuales mostraron menores índices de inflamación articular [136].

# *Objetivos*

## Hipótesis

“En células dendríticas, el TNF, a través de su receptor TNFRp55, regula la secreción de IL-12/23p40 lo que estimula la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> a células Th1 y Th17 en nuestro modelo de artritis”.

### Objetivo general

Investigar el rol de células dendríticas en la inmunopatogenia de la artritis reactiva en nuestro modelo experimental

### Objetivos específicos

- ❖ Investigar en esplenocitos de ratones C57BL/6 *wild-type* y *TNFRp55<sup>-/-</sup>*, obtenidos el día 14 post-infección con *Yersinia enterocolitica*, los tipos celulares y vías de señalización involucradas en la producción de IL-12/23p40 frente al estímulo *in vitro* con LPS.
- ❖ Optimizar la obtención de células dendríticas con el fin de estudiar la desregulación de la respuesta inmune en ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>*, analizando su fenotipo, grado de activación y producción de citoquinas luego del estímulo *in vitro* con LPS o de la infección *in vitro* con Ye.
- ❖ Caracterizar un nuevo modelo de estudio molecular en una línea de células dendríticas que permita dilucidar los mecanismos del rol modulador de TNF y TNFRp55 en nuestro modelo de artritis reactiva.

*Materiales y métodos*

## 1) Ratones

Para los experimentos se emplearon ratones machos de 6 a 8 semanas de edad de la cepa C57BL/6. Los ratones WT fueron adquiridos del bioterio de la Universidad Nacional de la Plata. Los ratones C57BL/6 *TNFRp55<sup>-/-</sup>* fueron gentilmente donados por Max von Pettenkofer Institute (Munich, Alemania). Colonias de ambos grupos de ratones fueron desarrolladas y mantenidas bajo condiciones libres de patógenos específicos en una cabina de aire filtrado (EHRET, Emmendingen, Alemania) en el Bioterio del laboratorio de Inmunopatología de la Universidad Nacional de San Luis. Los ratones C57BL/6 *IL-10<sup>-/-</sup>* fueron amablemente donados por la Dra. Eva Acosta (Universidad Nacional de Córdoba).

Para el modelo de expansión celular utilizamos ratones hembras de 6-8 semanas de la cepa C57BL/6 WT y *TNFRp55<sup>-/-</sup>*. Todos los ratones fueron alimentados con alimento y agua estéril *ad libitum*.

Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad Nacional de San Luis.

### 1.1) Corroboración del genotipo de los ratones

A las colonias de las cepas C57BL/6 WT y *TNFRp55<sup>-/-</sup>* desarrolladas en nuestro bioterio de la Universidad Nacional de San Luis, se les realizaron dos controles anuales de sus genotipos. utilizándose el protocolo optimizado en nuestro laboratorio para la obtención rápida de ADN, mediante el método HotShot [137], seguida por la amplificación del mismo utilizando los cebadores descritos en la página web del Laboratorio Jackson ([www.jax.org](http://www.jax.org)).



## **1.2) Modelo de expansión celular [138]**

Se utilizaron los siguientes dos tipos de líneas celulares:

**Células B16 (melanoma):** estas células fueron cultivadas en medio DMEM (Life Technologies, CA, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Natocor S.A, Córdoba, Argentina), 2mM de glutamina, 1mM piruvato, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina en incubadora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

**Células B16 transfectadas con FLT3L:** esta línea celular derivada de melanoma murino (B16) y transfectada con el gen hFlt-3L fue gentilmente provista por el Dr. Gabriel Morón (CIBICI, Universidad Nacional de Córdoba). Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Life Technologies, CA, USA), suplementado con 10% SFB, 2mM glutamina, 1mM piruvato, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina en incubadora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

**Expansión de CD *in vivo*:** las células fueron cosechadas, lavadas 2 veces con solución fisiológica (SF) y centrifugadas a 400xg durante 5 min, para eliminar completamente el SFB. Se utilizaron ratones hembras WT y *TNFRp55<sup>-/-</sup>* de 6 – 8 semanas de edad. Cada ratón fue inyectado subcutáneamente en el dorso (parte posterior del cuello) con 5-10 x 10<sup>6</sup> células B16 sin transfección o transfectadas con FLT3L en 200 µl de SF. Luego se evaluó el desarrollo de los tumores, cuando los mismos alcanzaron el tamaño apropiado y similar entre los diferentes grupos, se obtuvieron los órganos.

## **2) Bacteria**

La inducción de ARe en nuestro modelo animal fue realizada utilizando la cepa MCH700 de Ye del serotipo O:3, la cual fue gentilmente provista por el Dr. Kapperud (Departamento de Bacteriología, Oslo, Noruega).

Suspensiones de Ye O:3 fueron preparadas cultivando la bacteria en caldo Luria (CL) a 27°C durante 24 hs. Luego el cultivo fue colectado por centrifugación, suspendido en CL conteniendo 20% glicerol y congelado inmediatamente a -80°C en alícuotas de 1 ml. El recuento bacteriano de estas alícuotas fue determinado utilizando diluciones seriadas en buffer fosfato salino (PBS) estéril, pH 7,4, que fueron sembradas en agar Mueller-Hinton (AMH). Luego de la incubación a 25° C durante 48 h, se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC). Antes de cada experimento de infección, una alícuota fue descongelada, lavada y suspendida en PBS estéril, pH 7,4.

### **2.1) Infección *in vivo***

Los ratones fueron mantenidos 3 hs sin agua ni alimento antes y después de realizar la infección. La administración de la bacteria fue realizada a través de la vía oral, utilizando una sonda orogástrica.

La dosis de infección usada fue de  $1-5 \times 10^8$  UFC Ye en 200  $\mu$ l PBS estéril, pH 7,4. El número real de bacterias administradas fue controlado en cada experimento cultivando diluciones de la suspensión a emplear en la infección en AMH como se mencionó anteriormente.

### **2.2) Infección *in vitro***

La alícuota de la bacteria fue cultivada en medio MOX (caldo AMH suplementado con 20 mM MgCl<sub>2</sub> y 20 mM Oxalato de sodio), en agitación a 25 °C durante toda la noche. El cultivo fue diluido (1/20) en medio MOX e incubado durante 3 hs a 37°C. El cambio de temperatura permite la expresión de los genes del plásmido de virulencia de la bacteria. La multiplicidad de infección (MOI) utilizado fue 10:1.

### **3) Obtención de órganos**

#### **3.1) Obtención de esplenocitos**

Los bazo fueron removidos asépticamente, empleando material de cirugía y condiciones estériles, y recolectados en 5 ml de SF. Posteriormente, fueron disgregados mecánicamente utilizando mallas metálicas y émbolos estériles. El homogenato obtenido fue centrifugado a 800xg durante 10 minutos a 4°C. El pellet obtenido fue resuspendido con 3 ml de buffer ACK (0,15M NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM KHCO<sub>3</sub>; 0,1mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 7,4) e incubado a 4 °C durante 5 minutos para lisar los eritrocitos. Luego de diluir con SF, la muestra fue centrifugada a la misma velocidad y tiempo. Finalmente, el pellet que contiene los esplenocitos totales fue resuspendido en 1 o 2 ml de PBS o buffer MACS (0,5% SFB suplementado con 2 mM EDTA en PBS) y filtrado con filtros de 70 µm.

Las células fueron diluidas 1/100 y contadas con Azul Tripan, para ser ajustadas a la concentración necesaria en cada experimento.

#### **3.2) Obtención de células peritoneales**

Para obtener un lavado peritoneal en condiciones óptimas, se recomienda el uso de cámara de CO<sub>2</sub> o agentes anestésicos en alta concentración, para sacrificar a los ratones. En este trabajo fue utilizado el anestésico isoflurano al 50% diluido en polietilenglicol.

En primer lugar, la piel del abdomen del ratón fue cortada y retraída para dejar visible la membrana del peritoneo intacta. Luego, 5 ml de SF fría fue inyectada en forma intraperitoneal (i.p.) con aguja 25-G en condiciones de esterilidad. Fueron realizados masajes en la región abdominal para mezclar el líquido inyectado con el contenido de la cavidad. El líquido del lavado fue extraído con la misma jeringa utilizada para la inyección, y transferido a un tubo de 15 ml en baño de hielo. La operación fue repetida hasta recolectar 14 ml de lavado peritoneal. Posteriormente, las células fueron

centrifugadas a 800 xg durante 10 minutos a 4°C. Las células sedimentadas fueron resuspendidas en 1 ml de SF y filtradas con un filtro de 70 µm de poro. Las células fueron contadas con azul tripan, para ser ajustadas a la concentración necesaria de cada experimento.

En la mayoría de los casos esta metodología permitió obtener un 85-90% del líquido inyectado.

### **3.2.1) Estudio cinético**

Tres días previos al experimento, 1 mL de caldo estéril de tioglicolato de Brewer fresco al 4% fue inyectado i.p. por ratón con aguja 21G. Las poblaciones celulares de peritoneo fueron obtenidas (como se explica en el párrafo anterior) a las 12, 24, 48 y 72 hs y analizadas usando como control ratones sin estímulo (tiempo 0).

### **3.3) Obtención de médula ósea**

Los fémures y tibias de los ratones fueron obtenidos mediante cirugía, e inmersos en 5 ml de medio RPMI (Invitrogen). Los extremos correspondientes a las articulaciones fueron cortados, y la médula ósea fue obtenida haciendo pasar 2-3 veces 1,5 ml por la cavidad medular de los huesos hasta que no quedaran restos visibles de médula. La suspensión celular obtenida fue recogida en un tubo de 15 ml, centrifugada por 10 minutos a 300xg y, el pellet obtenido fue resuspendido adecuadamente para realizar el recuento celular con Azul Tripan.

Para el análisis de las células por citometría, las muestras fueron tratadas por 3 min con 1 ml del buffer ACK para lisar los eritrocitos. El resto de las células fue recuperado por centrifugación como se explicó anteriormente.

### **3.3.1) Diferenciación a CDs**

Las células medulares obtenidas como se describe en el párrafo anterior, fueron distribuidas en placas de Petri bacteriológicas en una concentración  $1-2 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI (Life Technologies, CA, USA) suplementado con 10% SFB (Gibco), 2mM glutamina, 1mM piruvato, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin y 20 ng/ml factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Penprotech, Rocky Hill, NJ; US). La diferenciación se llevó a cabo en 9 días de cultivo en los que el medio GM-CSF fresco se fue agregando los días 3, 5 y 7. Al finalizar el cultivo, las células, previamente analizadas por citometría de flujo, fueron cosechadas para su posterior empleo en los diferentes experimentos.

## **4) Citometría**

### **4.1) Determinación de antígenos de superficie**

Las suspensiones celulares fueron lavadas con buffer FACS (2,5% SFB; 1% EDTA; 1% azida sódica en PBS), centrifugadas a 800xg durante 5 minutos a 4°C. Luego, las células fueron incubadas durante 15 min en hielo con anti-CD16/32 (Fc block, BD Phermingen), para disminuir la unión inespecífica de inmunoglobulinas. A continuación, las células fueron lavadas con buffer FACS e incubadas con los correspondientes anticuerpos conjugados con fluorocromos durante 30 min en hielo. Finalmente, las células fueron lavadas y resuspendidas en buffer FACS. También fueron analizados los correspondientes controles de isotipo. La adquisición de los datos fue realizada con un citómetro de 4 colores, FACScalibur (BD Bioscience). Los datos fueron analizados con el programa FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

#### 4.1.1) Anticuerpos de superficie.

Fueron empleados los siguientes anticuerpos:

**Tabla 1:** Anticuerpos empleados para citometría de flujo:

Especificidad	Clon	Fluocromo asociado	Empresa
CD11c	HL3	APC	Biolegend
MHC II	2G9	FITC	BD
MHC II	2G9	PE	BD
F4/80	CI:A3-1	FITC	BD
F4/80	BM8	PE	eBioscience
CD3	145-2C11	APC	BD
CD4	RM 4-5	FITC	BD
CD8a	53-6.7	PerCp	Biolegend
Ly6G	1A8	PE	Biolegend
CD11b	M1/70	PE	BD
CD11b	M1/70	PerCp	BD
CD19	6D5	PerCp	Biolegend
CD80	16-10A1	PE	BD
CD86	GL1	PE	BD
CD120a	55R-286	Sin marca	BD
CD120b	TR75-89	Sin marca	BD
Anti-hamster secundario	policlonal	PE	BD

#### 4.1.2) Fijación:

Las células fueron fijadas con 4% paraformaldehído (PFA). Luego de la marcación extracelular, las células fueron lavadas dos veces con buffer FACS, a continuación fueron centrifugadas a 800 xg durante 5 minutos a 4°C, se agregó a cada tubo 100 µl de PFA y se incubó por 20 minutos en baño de hielo. Posteriormente, las células fueron lavadas nuevamente con buffer FACS y centrifugadas a la misma velocidad y tiempo. Finalmente, las células fueron resuspendidas en buffer FACS y mantenidas a 4°C hasta su análisis.

## 4.2) Determinación intracelular de citoquinas

### 4.2.1) Marcación IL-12p40/70

Esplenocitos de ratones WT y *TNFRp55*<sup>-/-</sup> infectados con Ye y los correspondientes grupos control fueron distribuidos en placas de 24 pocillos en una concentración de  $2 \times 10^6$  células por pocillo. Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Life Technologies, CA, USA), 10% SFB (Natocor), 2mM glutamina, 1mM piruvato, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina. Las células se incubaron bajo tres condiciones:

- ❖ Sin estímulo
- ❖ Estimulo con PMA-ionomicina (50/750 ng/ml, eBioscience) durante 5 hs
- ❖ Estímulo con LPS *E.coli* 0111:B4 (Sigma) durante 12 hs

en presencia de brefeldina A (1µg/ml (BD, GolgiPlug™, Biosciences), para bloquear la secreción de la citoquina. Brefeldina A fue agregada simultáneamente con el medio ó con el estímulo PMA/ionomicina durante 5 hs, o 5 hs antes de terminar el estímulo de LPS.

Luego, las células fueron levantadas y marcadas con los anticuerpos anti-MHC-II, anti-CD11c (marcadores que las CDs expresa en altos niveles [139]), anti-F4/80 y anti-CD11b (marcadores de macrófagos [140]). A continuación de la marca extracelular, las células fueron tratadas con el kit de fijación-permeabilización (BD Cytotfix/Cytoperm™) siguiendo las indicaciones del fabricante, usando anti-IL-12p40/70 (Clon: C15.6) (BD) para marcar IL-12 intracelular. Como control negativo se empleó “fluorescencia menos uno” (FMO).

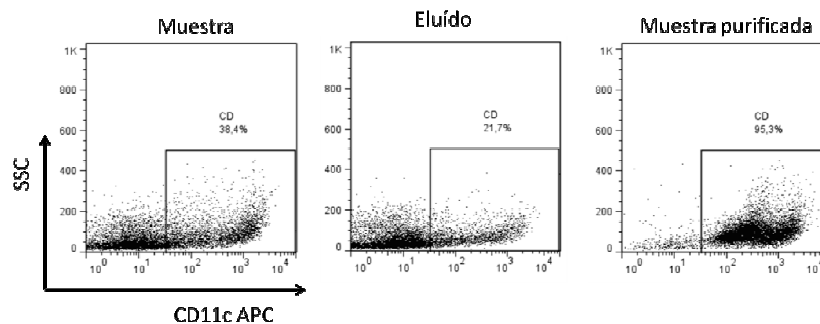
### 4.2.2) Marcación IFN-γ y IL-17 A

CDs y linfocitos T CD4<sup>+</sup> mantenidos en co-cultivo (apartado 6) fueron incubados 5 hs previas a finalizar el co-cultivo con monensina (2 µM) (BD, GolgiStop™, Biosciences), para bloquear la secreción de las citoquinas. Luego, las células fueron transferidas a tubos de citometria y marcadas con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4

(marcadores de linfocitos T CD4<sup>+</sup> [141]). A continuación de la marcación extracelular, IFN- $\gamma$  y IL-17A intracelulares fueron detectadas usando los anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  (Clon: XMG1.2) (BD) o anti-IL-17A (Clon: eBio17B7) (eBioscience) y como control se empleó “fluorescencia menos uno” (FMO).

### 4.3) Purificación de CDs

Los bazos fueron obtenidos a partir del modelo de expansión celular utilizando ratones hembras WT y *TNFRp55*<sup>-/-</sup>, y siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.1. Las células obtenidas fueron incubadas con perlas magnéticas sensibilizadas con el anticuerpo anti-CD11c para, posteriormente purificar CDs de acuerdo a las especificaciones del fabricante (MACS Miltenyi Biotec Inc. CA, USA). El grado de pureza fue corroborado mediante análisis por citometría de flujo, obteniendo un 95% de enriquecimiento de CDs (Figura 1).



**Fig.1. Evaluación de pureza de CDs enriquecida por la metodología de perlas magnéticas:** Células obtenidas de bazo fueron marcadas con perlas cubiertas con el anticuerpo anti-CD11c, siguiendo las instrucciones del fabricante. La muestra previa a la purificación, el eluido y la muestra purificada fueron incubadas con el anticuerpo anti-CD11c y posteriormente analizadas por citometría de flujo. Los porcentajes indican las células seleccionadas CD11c<sup>high</sup> correspondientes a CDs.

### 4.4) Purificación de Linfocitos T CD4<sup>+</sup>

Los bazos fueron sumergidos en 5 ml de PBS frío, y disgregados mecánicamente. Luego de la lisis de eritrocitos, la suspensión de esplenocitos fue lavada dos veces con buffer MACS. Finalmente, células T CD4<sup>+</sup> fueron enriquecidas utilizando perlas magnéticas sensibilizadas con el anticuerpo anti-CD4 de ratón (BD IMag),



siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Biosciences San Jose, CA). La pureza obtenida por este método fue del 97%.

#### **4.5) Marcación con CFSE (diacetato de carboxifluoresceína ester succinimidil)**

Linfocitos T CD4<sup>+</sup> fueron obtenidos de bazo y purificados como se explicó previamente. Los linfocitos fueron suspendidos en 1 ml de medio de cultivo con 5% de SFB e incubados 20 min a 37°C en estufa de cultivo en presencia de 100 µl de CFSE. Después de repetidos lavados con abundante volumen de medio, las células fueron centrifugadas a 400xg durante 5 min. Luego de una adecuada resuspensión del pellet, las células fueron transferidas a los pocillos que contenían CDs para realizar el ensayo de proliferación.

#### **4.6) Viabilidad celular**

Las células fueron lavadas 2 veces con PBS frío y suspendidas en buffer de unión 1X (incluido en el kit comercial Miltenyi) suplementado con 10 µl de Anexina V-FITC en 100 µl de buffer de unión. Luego de incubar 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, las células fueron lavadas por centrifugación a 300xg durante 10 minutos a 4°C. Las células fueron resuspendidas en 500 µl de buffer de unión al cual se adicionó 5 µl de yoduro de propidio (IP). Finalmente, las células fueron analizadas inmediatamente en el citómetro FACScalibur.

### **5) Cultivo de células JAWS II**

La línea de CDs inmaduras JAWSII (ATCC CRL11904), gentilmente provista por el Dr. Ignacio Cebrián (IHEM-CONICET, Universidad Nacional de Cuyo) fue cultivada en diferentes medios de cultivo:

- A. medio IMEM (Invitrogen) suplementado con 10% SFB (Natocor), 2 mM glutamina (Invitrogen) 100 IU/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina (Invitrogen) y 0,5 mg/ml GM-CSF.
- B. medio RPMI (Invitrogen) suplementado con 10% SFB (Gibco), 2 mM glutamina (Invitrogen), 100 IU/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina (Invitrogen) y 0,5 mg/ml GM-CSF.
- C. medio RPMI (Invitrogen) suplementado con 10% SFB (Gibco), 2 mM glutamina (Invitrogen) 100 IU/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina (Invitrogen) y 5% de sobrenadante de cultivo de células productoras de Flt3L.

### **5.1) Control de micoplasmas mediante tinción con DAPI**

Las células fueron distribuidas sobre cubreobjetos colocados previamente en placas de 6 pocillos. Se cultivaron las células en medio apropiado hasta llegar a 50-70% de confluencia. Posteriormente, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y fijadas con 4% PFA por 20 min. Luego de lavar dos veces, las células fueron permeabilizadas con 1% Tritónx100 por 5 minutos, lavadas 3 veces con PBS e incubadas con DAPI (1/8000) por 1 a 5 minutos. A continuación las células fueron lavadas con PBS y los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos, utilizando el medio de montaje del kit para inmunofluorescencia (IFIFLUOR Parasitest-multitest, Laboratorio IFI, Villa Martelli, Bs As). Los preparados fueron analizados en microscopio de fluorescencia (Axiovertx40, Carl Zeiss) bajo iluminación con una longitud de onda en el rango del UV. Todas las líneas celulares utilizadas fueron negativas para micoplasmas.

## **6) Estimulación *In Vitro***

### **6.1) Estimulación de esplenocitos**

Ratones machos WT y *TNFRp55<sup>-/-</sup>* de 6-8 semanas fueron infectados con Ye o con el vehículo PBS (ratones control). Ratones machos *IL-10<sup>-/-</sup>* fueron utilizados con fines comparativos.

Esplenocitos obtenidos el día 14 luego de la infección con Ye como se explicó en 3.1, fueron cultivados en medio DMEM (Life Technologies, CA, USA), 10% SFB (Natocor), 2 mM glutamina, 1 mM piruvato, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina. A continuación, fueron pre-incubados con inhibidores (10 µM) que selectivamente bloquean las proteínas MAPKs JNK (SP600125) (Invivogen), quinasa regulada por señal extracelular (ERK) (PD98059) (Invivogen) o p38 (SB203580) (Invivogen) ó DMSO (dimetilsulfósido) (usado como control) (Biopack) durante 1 h antes de la estimulación con LPS (1µg/ml).

Los sobrenadantes del cultivo fueron obtenidos a 3, 12 y 24 hs después de la estimulación para determinar citoquinas mediante ELISA.

## **6.2) Estimulación de CD**

### **6.2.1) Ensayo de inhibidores**

Las CDs diferenciadas de médula ósea luego de 9 días de cultivo como se describió en 3.3, fueron distribuidas en placas de 24 o 96 pocillos, usando el medio RPMI suplementado con 5% SFB (Natocor), 2mM glutamina, 1mM piruvato, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina. A continuación fueron pre-incubadas con 10 µM de los inhibidores MAPKs: SP600125 para JNK, PD98059 para ERK o SB203580 para p38 o con DMSO (control) durante 1 h antes de la estimulación con LPS (1 µg/ml). Luego de 24 y 48 hs post-estímulo los sobrenadantes fueron recolectados para determinar citoquinas mediante ELISA.

### **6.2.2) Ensayo con TNFh**

Las células fueron cultivadas en presencia de TNF humano (TNFh) (60 ng/ml), que fue agregado simultáneamente con el estímulo de LPS (1 µg/ml). Luego de 24 hs post-estímulo, los sobrenadantes fueron recolectados para determinar citoquinas mediante ELISA

### 6.2.3) Ensayo de Proliferación.

Luego de la diferenciación desde médula ósea, las CDs fueron cultivadas en medio libre de antibióticos en placas de 96 pocillos. A continuación fueron infectadas como se explicó en el apartado 2.2. Para optimizar el contacto con Ye, las células fueron centrifugadas realizando una centrifugación corta (*spindown*). Luego de 1 h de infección, las células fueron incubadas con gentamicina (0,1mg/ml) para eliminar las bacterias extracelulares durante 24 hs a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en estufa de cultivo.

Por otra parte, linfocitos T CD4<sup>+</sup> fueron obtenidos de bazos de ratones WT control y, posteriormente fueron purificados como se explicó en el apartado 4.4, y marcados con CFSE (sección 4.5).

Una vez cumplido el tiempo de cultivo de las CDs, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> CFSE<sup>+</sup> fueron transferidos a la placa. En este ensayo los linfocitos T WT o *TNFRp55<sup>-/-</sup>* fueron cultivados con CDs WT o CDs *TNFRp55<sup>-/-</sup>*. El control correspondiente fue realizado con linfocitos T CD4<sup>+</sup> CFSE<sup>+</sup> en medio de cultivo sin CDs. Luego de 5 días de co-cultivo, las células fueron removidas de la placa y analizadas mediante citometría de flujo.

## 6.3) CD obtenidas del modelo de expansión celular

### 6.3.1) Ensayo de inhibidores

Las CDs de ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* o WT luego de ser purificadas mediante perlas magnéticas, fueron plaqueadas usando medio RPMI suplementado con 5% SFB (Natocor), 2 mM glutamina, 1 mM piruvato, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina. Posteriormente, fueron pre-incubadas con 10 µM de inhibidores que selectivamente bloquean las MAPKs JNK (SP600125), ERK (PD98059) o p38 (SB203580) o con DMSO (usado como control) durante 1 h antes de la estimulación con LPS (1µg/ml). Luego de 24 hs post-estímulo, los sobrenadantes fueron recolectados para determinar citoquinas mediante ELISA.

### 6.3.2) Ensayo con TNFh e inhibidores de TNF

Las CDs obtenidas luego de su expansión in vivo y purificación fueron cultivadas en presencia de TNFh (factor de necrosis tumoral humano recombinante) (60 ng/ml), en presencia o ausencia del inhibidor de la señalización TNFRp55, CAY10500 (1ng/ml) (Sigma), o del inhibidor de TNF, Etanercept (Enbrel, Lab. Pfizer) (1ng/ml), simultáneamente con el estímulo con LPS (1µg/ml). Luego de 24 hs post-estímulo, los sobrenadantes fueron recolectados para determinar citoquinas mediante ELISA.

### 6.3.3) Ensayo de co-cultivo

Luego de su diferenciación desde médula ósea, las CDs fueron cultivadas en medio libre de antibióticos en placas de 96 pocillos. A continuación, fueron infectadas como se explicó en el apartado 2.2. El contacto de Ye con las células fue optimizado por centrifugación. CDs sin infectar fueron utilizadas como control. Luego de 1 h de infección, las células fueron incubadas con gentamicina (0,1mg/ml) para eliminar las bacterias extracelulares durante 24 hs a 37°C en atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> en estufa de cultivo.

Por otra parte, linfocitos T CD4<sup>+</sup> fueron obtenidos de bazo de ratones WT y *TNFRp55*<sup>-/-</sup> luego de 5 días de infección con Ye y purificados como fue explicado en el apartado 4.4. Un porcentaje de los linfocitos fue marcado con CFSE (apartado 4.5).

Una vez cumplido el tiempo de cultivo de las CDs, éstas fueron incubadas con los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. En este ensayo los linfocitos T WT o *TNFRp55*<sup>-/-</sup>, fueron incubados con CD WT o CD *TNFRp55*<sup>-/-</sup>.

Luego de 5 días de co-cultivo, se analizaron la proliferación celular (sección 6.2.3), y la producción de las citoquinas intracelulares IL-17A e IFN-γ (sección 4.2.2) mediante citometría de flujo. En experimentos similares, sin el agregado de los inhibidores de secreción de citoquinas (brefeldina o momensina) se recolectaron los sobrenadante para la posterior determinación de citoquinas mediante ELISA (sección 7). Se emplearon controles respectivos para cada ensayo.

## **6.4) Estimulación de las células JAWS II**

Utilizando el medio de cultivo **A**, las células JAWS II fueron tratadas con dos concentraciones de LPS (0,1 ó 1 µg/ml). Luego de 24 hs, los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados para determinar los niveles de IL-12/23p40 mediante ELISA.

También, se estudiaron las expresiones de marcadores de superficie. Para ello, las células fueron estimuladas o no (control basal) con 1µg/ml de LPS durante 24 hs. Luego de ser lavadas, las células fueron removidas de las placas y analizadas por citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-CD11b, anti-CD11c, anti-MHC-II, anti-CD86 y anti-F4/80 (Tabla 1).

Para las cascadas de MAPKs en estas células, las mismas fueron pre-incubados por 1 h con 10 µM de los inhibidores específicos para las MAPKs JNK (SP600125), ERK (PD98059), p38 (SB203580) o con DMSO (control), y luego fueron estimulados con LPS (1µg/ml).

Luego de optimizar la concentración de TNFh (60-90 ng/ml), las células fueron incubadas simultáneamente con TNFh y LPS (1µg/ml). Pasadas 24 hs, los sobrenadantes se recolectaron para medir citoquinas mediante ELISA. Por otro lado, diferentes concentraciones de CAY10500 (1, 3 y 5 ng/ml) fueron agregadas al mismo tiempo que LPS. A las 24 hs, las células fueron marcadas para determinar la viabilidad celular (apartado 4.6) y, posteriormente, fueron analizadas por citometría de flujo.

Las células JAWS fueron sometidas a experimentos similares a los mencionados anteriormente pero utilizando los medios de cultivo **B** y **C**. con la finalidad de realizar un estudio comparativo. Las células fueron ensayadas por citometría de flujo para determinar marcadores extracelulares como: F4/80, CD11b, CD11c, MHC-II, CD120a (TNFRp55), CD120b (TNFRp75), CD80 y CD86 (Tabla 1).

Los ensayos de inhibición de las MAPKs como así también el efecto de TNFh y del inhibidor CAY10500, fueron probados en estas células como se explicó en los puntos 6.3.1 y 6.3.2.

## **7) Determinación de citoquinas por ELISA**

Las citoquinas TNF, IFN- $\gamma$  (eBioscience, San Diego, CA), IL-17A e IL-10 (Biolgend (San Diego,CA,USA) y IL-12/23p40 (BD OptEIA set) fueron determinadas en los sobrenadantes de cultivos mediante ELISA de captura, según las instrucciones de los fabricantes. Las DO de las curvas patrón y de las muestras fueron leídas en el espectrofotómetro Epoch<sup>TM</sup>/Take3<sup>TM</sup> –multi-Volume Plate (BioTek Istruments).

## **8) Análisis estadístico**

Las diferencias entre los grupos estudiados fueron analizadas para significancia estadística utilizando la prueba *t* de Student de dos colas, o la prueba ANOVA de una vía o dos vías, seguida de comparación múltiple de Turkey o Bonferroni, respectivamente, según correspondiere. El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA). Un valor de  $p \leq 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

# *Resultados*



## *Objetivo 1*

*Investigar en esplenocitos de ratones C57BL/6 wild-type y TNFRp55<sup>-/-</sup>, obtenidos el día 14 post-infección con Yersinia enterocolítica, los tipos celulares y vías de señalización involucradas en la producción de IL-12/23p40 frente al estímulo in vitro con LPS.*

Como se mencionó anteriormente, el día 14 post-infección es clave para el desarrollo de ARe; no obstante la participación del bazo, por ser el órgano linfoide secundario sistémico, no ha sido estudiado en mayor detalle. Por lo cual, el propósito principal de este apartado fue centrarnos en el estudio sistémico de la infección con *Ye* en ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* y WT.

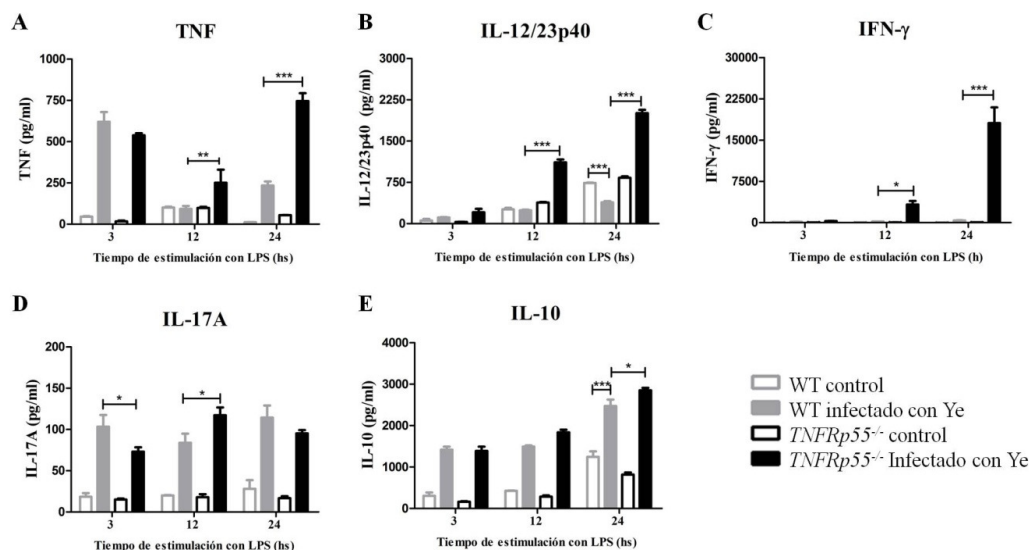
### **Cinética de producción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en esplenocitos**

Para examinar el perfil de citoquinas en bazo, primero infectamos ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* y WT con *Ye*. Luego de 14 días post-infección, procesamos los bazos como se explica en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos (MyM), para aislar los esplenocitos totales, tanto en grupos infectados como grupos controles (PBS). Obtenidas estas células fueron contadas, distribuidas en una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/pocillo en placas de 24 pocillos, y estimuladas con LPS de *E. coli* comercial. Luego de 3, 12 y 24 horas post-estimulación se recolectó el sobrenadante para determinar posteriormente mediante ELISA, las siguientes citoquinas: TNF, IL-12/23p40, IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-17A.

En este ensayo observamos a 12 y 24 hs post-estímulo, un aumento significativo en la producción de TNF, IL-12/23p40 e IFN- $\gamma$  en esplenocitos del grupo de ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* infectados con *Ye*, en comparación con su correspondiente WT (Fig. 1A-1C). En base a estos resultados podemos sugerir una desregulación en la producción de estas citoquinas en un proceso inflamatorio crónico tal como ARe. Por otra parte, la citoquina IL-17 se detectó sólo en los sobrenadantes de esplenocitos de ratones infectados, alcanzando concentraciones significativamente mayores a las 12 h en esplenocitos de ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* (Fig. 1D).

Por otra parte, esplenocitos del grupo de ratones WT infectados con *Ye*, produjo mayor cantidad de IL-10 (Fig. 1E) y menor cantidad de IL-12/23p40 que el correspondiente grupo control (Fig. 1B). Los esplenocitos del grupo *TNFRp55<sup>-/-</sup>* infectado produjo una cantidad significativamente mayor de ambas citoquinas en comparación con aquellos del grupo WT (Fig. 1E). De acuerdo con estos resultados

podemos inferir, un rol regulatorio por IL-10 para atenuar la secreción de IL-12/23p40 en un proceso inflamatorio crónico generado por la infección con Ye, resultando este mecanismo de regulación insuficiente en un contexto de deficiencia en TNFRp55.

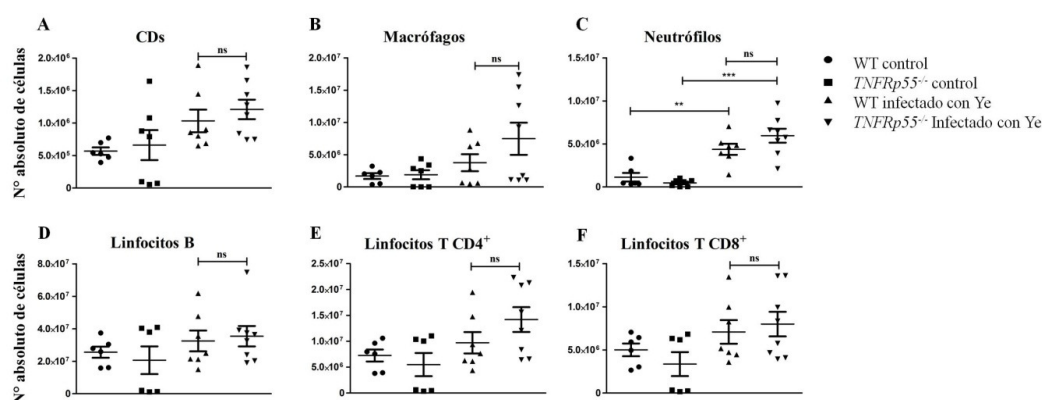


## Estudio del número absoluto de células del sistema inmune en bazo

En base a los resultados que mostraron un aumento significativo de las citoquinas ensayadas en los ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup> infectados con Ye, hipotetizamos que el aumento de citoquinas podría deberse a un aumento en el infiltrado celular en el órgano. Para comprobar la hipótesis, nos propusimos estudiar en primera instancia, las poblaciones celulares de bazo que por referencias bibliográficas expresan las citoquinas estudiadas [142-145] Así, analizamos CDs, macrófagos, linfocitos T y B, y neutrófilos. Para este análisis, empleamos citometría de flujo, e identificamos cada tipo celular empleando marcadores específicos como se detalla a continuación: linfocitos B

(CD19<sup>+</sup>), linfocitos T colaboradores (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), linfocitos T citotóxicos (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), macrófagos (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>), CDs (MHC-II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) y neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>).

En este ensayo observamos que los ratones WT y *TNFRp55*<sup>-/-</sup> a 14 días luego de la infección con *Ye*, no mostraron una diferencia significativa en ninguna de las poblaciones estudiadas. Además, el reclutamiento de CDs (Fig. 2A), macrófagos (Fig. 2B) y los subtipos de linfocitos (Fig. 2D – 2F) no alcanzó a ser significativamente mayor al detectado en ratones control. En contraste, el reclutamiento de neutrófilos (Fig. 2C) mostró un aumento significativo con los respectivos grupos infectados. En base a este resultado podemos concluir que el incremento de citoquinas mostrado en la Fig. 1, no es debido a un mayor reclutamiento celular en condición de deficiencia de TNFRp55.



**Fig.2: Poblaciones celulares del sistema inmune en bazo aislado de ratones.** Células dendríticas (CDs) (MHC-II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) (A), Macrófagos (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) (B), Neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>) (C), Linfocitos B (CD19<sup>+</sup>) (D), Linfocitos T CD4 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) (E), Linfocitos T CD8 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) (F), fueron estudiados por citometría de flujos en esplenocitos de ratones WT o *TNFRp55*<sup>-/-</sup> infectados, o controles (PBS). El análisis estadístico fue llevado a cabo por ANOVA de una vía seguido por el test de comparación múltiple de Tukey. Valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). ns: no significativo.

## CPA: candidatas de desregulación en la producción de IL-12/23p40

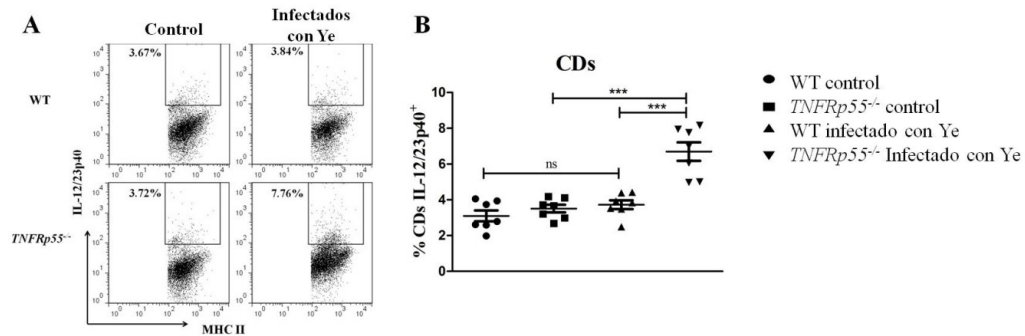
Para estudiar la desregulación encontrada en esplenocitos de ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup> luego de 14 días post-infección con *Ye*, y teniendo en cuenta resultados previos de nuestro laboratorio [135] y reportados en la bibliografía [146, 147], focalizamos nuestro estudio en IL-12/23p40. Ésta subunidad es común a IL-12, que participa en la

diferenciación de linfocitos Th a Th1 productores de  $\text{IFN}\gamma$ , y a IL-23, que participa en el mantenimiento de linfocitos Th17 productores de IL-17A. Asimismo, esta subunidad es regulada por IL-10 y TNF [148, 149]. En base a estos antecedentes, consideramos a IL-12/23p40 como candidata para comprender el mecanismo de desregulación. Dentro de las poblaciones celulares de bazo, CPA como CDs y macrófagos son productoras de dicha citoquina [142].

Con este propósito realizamos una citometría intracelular marcando IL-12/23p40 en la población de CDs ( $\text{CD11c}^+\text{MHC-II}^+$ ) y macrófagos ( $\text{F4/80}^+\text{CD11b}^+$ ). Como punto de partida fue necesario optimizar el ensayo de citometría intracelular, ensayando diferentes tiempos de incubación con brefeldina (inhibidor de proteínas de transporte, que permite la acumulación de la citoquina dentro de la célula) y la necesidad de un re-estímulo *in vitro*.

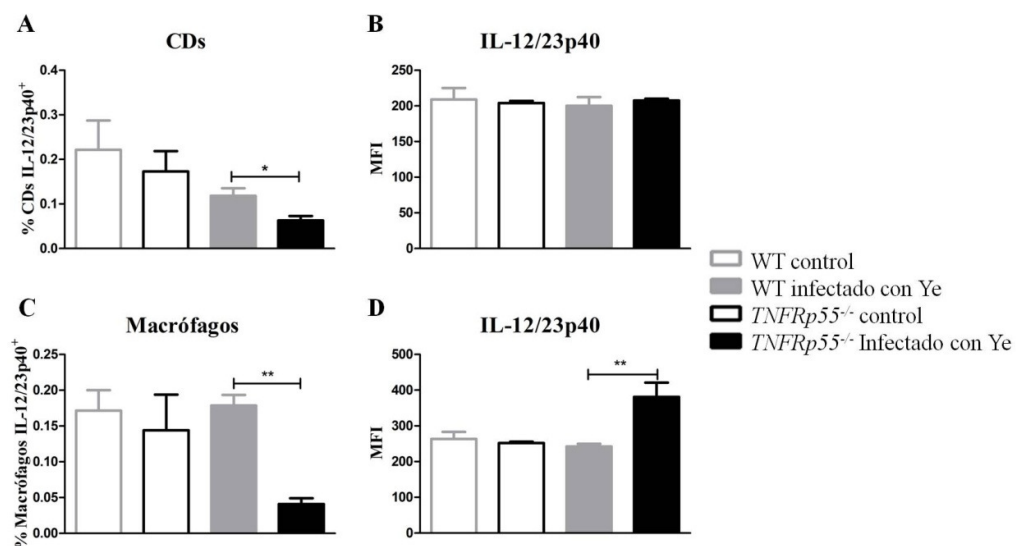
Para la optimización de este ensayo tomamos como referencia el trabajo de *Autenrieth y col* [150], en el cual se adiciona brefeldina durante 5 horas directamente a las células obtenidas de ratones infectados, para conocer el microambiente patogénico desarrollado *in vivo*. En nuestros experimentos, no pudimos detectar intracelularmente IL-12/23p40 en dichas condiciones, por lo que inferimos que se requería un re-estímulo *in vitro* antes del análisis por citometría de flujo (datos no mostrados).

Por consiguiente, probamos dos condiciones bien conocidas, como la utilización de PMA/ionomicina y LPS optimizando el tiempo de re-estímulo [151]. En primer lugar, obtuvimos esplenocitos de los ratones luego de 14 días de infección con Ye, y de sus respectivos controles. Las células ( $2 \times 10^6$  cel/ pocillo) fueron incubadas con PMA/ionomicina más brefeldina por 5 horas y luego realizamos la marcación extracelular específica para CDs ( $\text{MHC-II}^+\text{CD11c}^+$ ) o macrófagos ( $\text{F4/80}^+\text{CD11b}^+$ ), e intracelular para detectar la citoquina IL-12/23p40. Observamos que la frecuencia de CDs  $12/23\text{p40}^+$  de bazo de ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup> infectados resultó significativamente mayor comparada tanto con aquella de los correspondientes ratones WT, como de ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup> control (PBS) (Fig. 3). El mismo ensayo se realizó en macrófagos, no encontrando diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados).



**Fig. 3 Células dendríticas productoras de IL-12/23p40.** Esplenocitos de ratones wild-type (WT) y *TNFRp55*<sup>-/-</sup> fueron estimulados con PMA/ionomicina en presencia de brefeldina durante 5 hs. **A.** Gráficos de puntos de citometría de flujo representativos de cada condición. **B** Gráfico comparativo de la frecuencia de CD8<sup>+</sup> IL-12/23p40<sup>+</sup>. El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una vía seguido por el test de comparación múltiple Tukey. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (, \*\*\* $p < 0.001$ ). ns: no significativo.

Por último, ensayamos el estímulo con LPS, para el cual se tomaron las células luego de 14 días post-infección y de los respectivos grupos controles. Luego se estimularon ( $2 \times 10^6$  cel/ pocillo) con LPS durante 12 h. Brefeldina fue adicionada 5 horas antes de finalizar el cultivo. En este ensayo observamos mayor frecuencia de CD8<sup>+</sup> y macrófagos productores de IL-12/23p40 en el grupo WT infectado comparado con su correspondiente grupo *TNFRp55*<sup>-/-</sup> (Fig. 4A, 4C).



**Fig. 4 Células dendríticas y macrófagos productoras de IL-12/23p40.** Esplenocitos de ratones wild-type (WT) y *TNFRp55*<sup>-/-</sup> fueron estimulados con LPS (1 $\mu$ g/ml) por 12 horas. Brefeldina fue adicionada 5 hs antes de finalizar el cultivo. **A.** Porcentaje de células dendríticas (CD8<sup>+</sup>) productoras de IL-12/23p40. **B.** Intensidad de Fluorescencia Media (MFI) de CD8<sup>+</sup>. **C.** Porcentaje de Macrófagos productores de IL-12/23p40. **D.** Intensidad de Fluorescencia Media (MFI) de Macrófagos. El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una vía seguido por el test de

comparación múltiple Tukey. Valores de  $p$  value  $\leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

En base a estos resultados podemos inferir que CDs obtenidas de ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup> infectados produce mayor cantidad de IL-12/23p40 frente a un estímulo corto (PMA/ionomicina de 5hs), las cuales se verían reguladas frente a un estímulo más prolongado (LPS 12 horas). Sin embargo, analizando los valores de Intensidad de fluorescencia media (MFI), que indican el promedio de citoquina producido por célula, se pudo destacar la misma MFI indicando una igual producción de IL-12/23p40 que en CDs de ratones WT, aún estando en menor porcentaje. Este análisis indicaría que CDs estarían sobre-estimuladas, llevando a un aumento en la secreción de IL-12/23p40, por lo que serían células candidatas de la desregulación observada en ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup> infectados (Fig. 1).

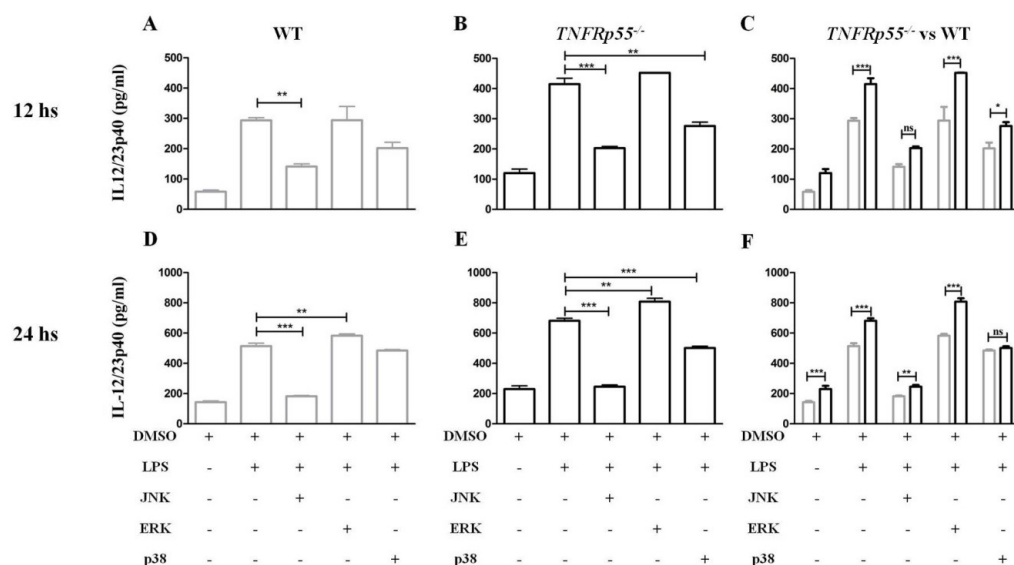
Por otro lado, los resultados obtenidos en macrófagos, indican que estas células, teniendo en cuenta los valores de MFI, sobre-expresan IL-12/23p40. Estos resultados se relacionan con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio en macrófagos peritoneales, en los que se observó una sobre-estimulación de éstas células al producir alta concentración de IL-6 y nitritos frente a un estímulo con Ye muerta por calor (HKY), en condiciones de deficiencia de TNFRp55 [152].

### **Vías de señalización JNK y p38 cumplirían una función clave en la sobreproducción de IL-12/23p40**

A fin de analizar la participación de las vías MAPKs en los mecanismos de sobreproducción de IL-12/23p40 en ausencia de TNFRp55, estudiamos los efectos de inhibidores específicos de ERK, JNK y p38 sobre la producción de IL-12/23p40 sobre esplenocitos totales. En primera instancia se emplearon estas células a fin de estudiar los efectos en un contexto de interacciones entre diferentes poblaciones celulares, asemejando lo que ocurre *in vivo* en nuestro modelo de ARE en ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup>.

Primero realizamos un estudio comparativo de esplenocitos WT vs *TNFRp55*<sup>-/-</sup> controles (PBS) 12 horas (Fig. 5A - 5C) y 24 horas (Fig.5D - 5F) post-estímulo con LPS, a fin de observar los efectos de cada inhibidor en la cascada de señalización de MAPKs, sobre la secreción de IL-12/23p40. Observamos, que tanto en células WT

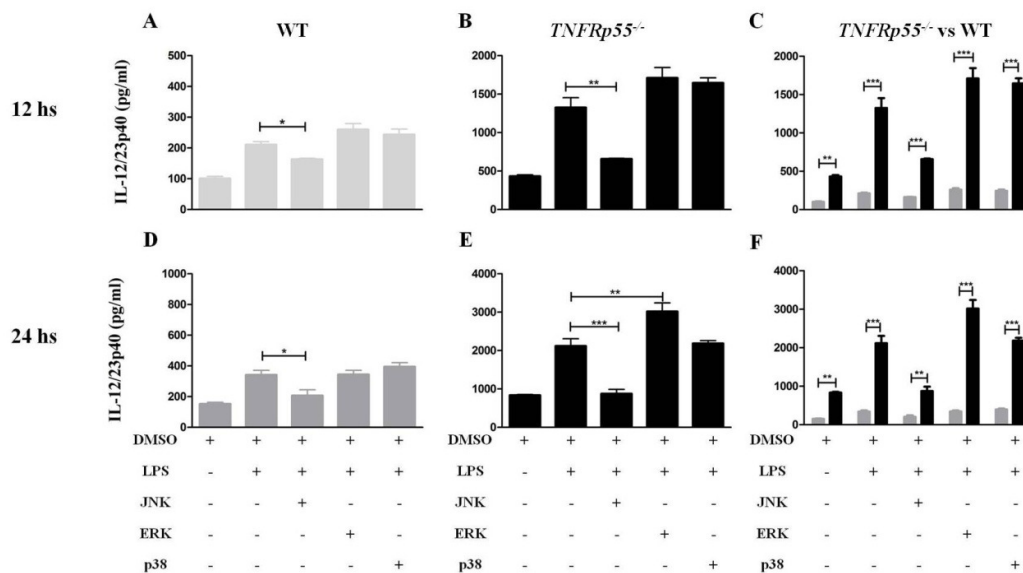
como *TNFRp55<sup>-/-</sup>*, la vía de MAPK JNK y en menor medida la de p38 inhibían la producción de IL-12/23p40. Es de destacar, que la producción de IL-12/23p40 por esplenocitos de ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* se volvía similar a la de esplenocitos WT cuando JNK y p38 fueron inhibidos (Fig. 5C y 5F) apoyando que estas cascadas serían las desreguladas en células *TNFRp55<sup>-/-</sup>*.



**Fig. 5 Niveles de IL-12/23p40 en presencia de inhibidores de MAPKs.** Esplenocitos de ratones control (PBS) de grupos WT o *TNFRp55<sup>-/-</sup>* fueron estimulados con LPS (1µg/ml) en presencia de los inhibidores de MAPKs JNK, ERK o p38. **A-C** 12 horas post-estímulo se midieron los niveles de IL-12/23p40 secretados en el sobrenadante de cultivo **D-F** 24 horas post-estímulo se midieron los niveles de IL-12/23p40. Estudio comparativo en los distintos tiempos ensayados de ratones control (PBS) (**C** y **F**) *TNFRp55<sup>-/-</sup>* versus WT. El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una o dos vías seguido por el test de comparación múltiple Tukey y Bonferroni respectivamente. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). ns: no significativo.

Luego, comparamos esplenocitos provenientes de ratones infectados de ambos grupos (Fig. 6). Esplenocitos del grupo *TNFRp55<sup>-/-</sup>* infectado mostraron una disminución significativa en la producción de IL-12/23p40 cuando se inhibió MAPK JNK (Fig. 6B y 6E), pero no alcanzó los niveles de su respectivo grupo WT (Fig. 6C y 6F). Estos resultados permiten inferir que a 14 días post-infección, el alto grado de estimulación recibido *in vivo* en respuesta a la infección, impediría lograr controlar por inhibición de JNK o p38 la sobreproducción de IL-12/23p40 frente al re-estímulo *in vitro* con LPS.



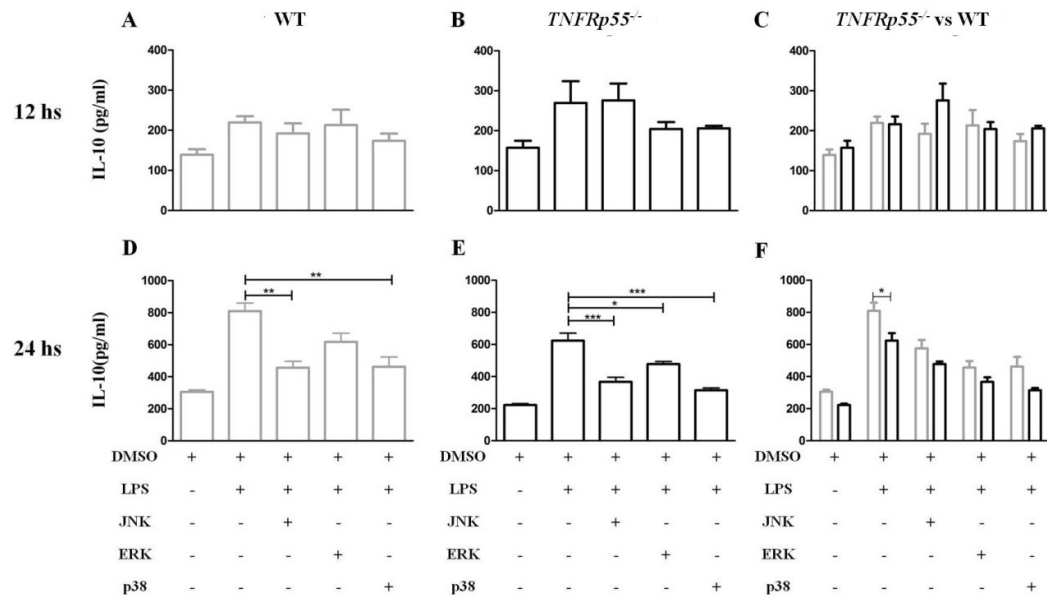


**Fig. 6 Niveles de IL-12/23p40 en presencia de inhibidores de MAPKs.** Esplenocitos de ratones infectados con Ye de grupos WT o *TNFRp55*<sup>-/-</sup> fueron estimulados con LPS en presencia de los inhibidores de MAPKs JNK, ERK o p38. A-C 12 horas post-estimulo se midieron los niveles de IL-12/23p40 secretados en el sobrenadante de cultivo D-F 24 horas post-estimulo se midieron los niveles de IL-12/23p40. Estudio comparativo en los distintos tiempos ensayados de ratones infectados (C y F) *TNFRp55*<sup>-/-</sup> versus WT. El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una o dos vías seguido por el test de comparación múltiple Tukey y Bonferroni respectivamente. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). ns: no significativo.

## Inhibición de vías de señalización, relación IL-12/23p40 con IL-10

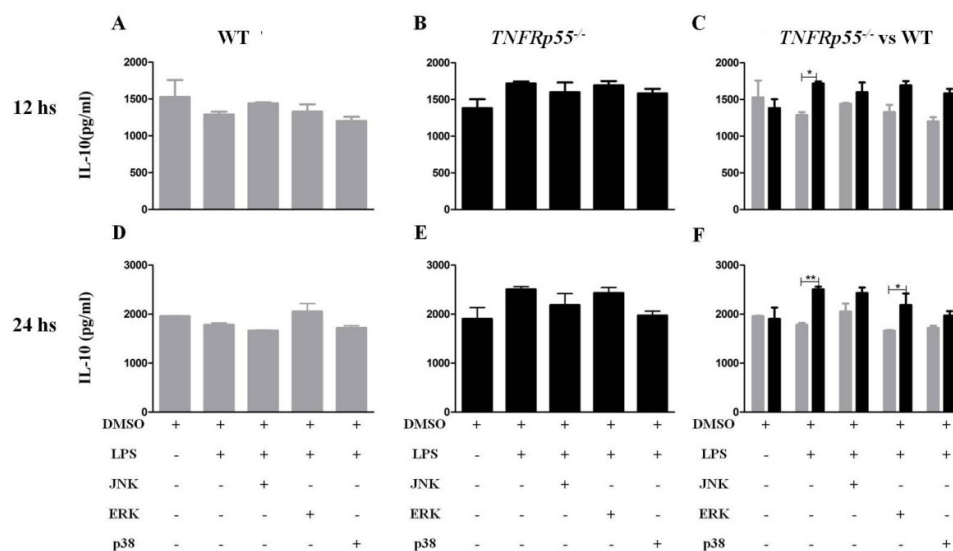
En los mismos sobrenadantes empleados para la determinación de IL-12/23p40 descritos en el apartado anterior, determinamos los niveles de IL-10 mediante ELISA, para evaluar si existía una relación entre ambas citoquinas.

Primero, evaluamos la implicancia de los inhibidores MAPKs en esplenocitos *TNFRp55*<sup>-/-</sup> vs WT controles (PBS) 12 horas y 24 horas post-estimulo con LPS (Fig. 7). No encontramos diferencias significativas a 12 hs post-estimulo (Fig. 7A – 7C). Sin embargo, a las 24 horas post-estimulo, se observó disminución significativa en la secreción de IL-10 por esplenocitos WT cuando utilizamos inhibidores de JNK y p38, y en esplenocitos *TNFRp55*<sup>-/-</sup> en presencia de los inhibidores de JNK, ERK y p38 (Fig. 7D – 7E). Estos resultados sugieren que cascadas MAPKs también participan en la secreción de IL-10. Sin embargo la producción de IL-10 sería un evento más tardío, el cual podría ser gatillado por el aumento más temprano de IL-12/23p40.



**Fig.7 Niveles de IL-10 en presencia de inhibidores de MAPKs.** Esplenocitos de ratones controles (PBS) de grupos WT o *TNFRp55<sup>-/-</sup>* fueron estimulados con LPS en presencia de los inhibidores de MAPKs JNK, ERK o p38. **A-C** 12 horas post-estímulo se midieron los niveles de IL-10 secretados en el sobrenadante de cultivo **D-F** 24 horas post-estímulo se midieron los niveles de IL-10. Estudio comparativo en los distintos tiempos ensayados de ratones control (PBS) *TNFRp55<sup>-/-</sup>* versus WT (**C** y **F**). El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una o dos vías seguido por el test de comparación múltiple Tukey y Bonferroni respectivamente. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

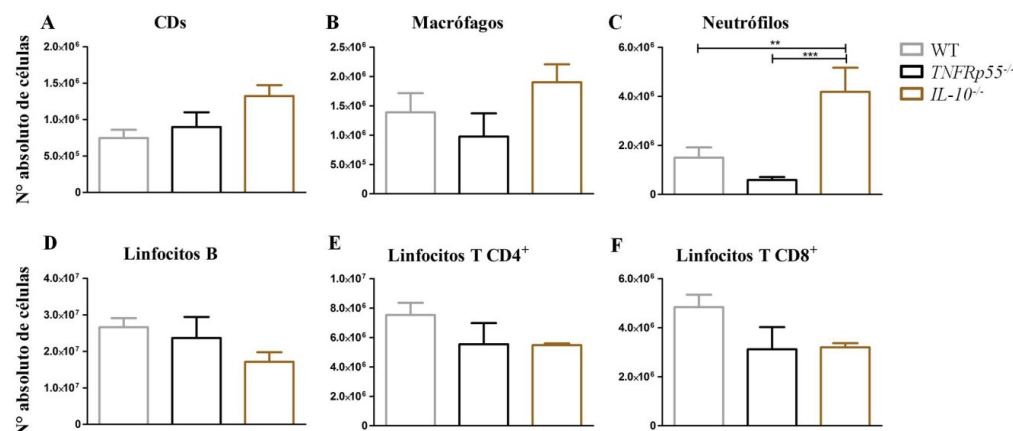
El mismo análisis fue realizado en sobrenadantes de esplenocitos obtenidos de ratones infectados. Observamos que frente a la infección con Ye las vías JNK y p38 están implicadas en la producción de IL-12/23p40 pero no en la de IL-10 (Fig. 8). Destacamos que la producción de IL-10 resultó significativamente mayor en ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* cuando realizamos un estudio comparativo utilizando LPS como re-estímulo (Fig. 8C – 8F). Inferimos de estos resultados que una vía regulatoria por IL-10 podría modular la secreción de IL-12/23p40 en esplenocitos de los grupos estudiados.



**Fig. 8 Niveles de IL-10 en presencia de inhibidores de MAPKs.** . Esplenocitos de ratones infectados con Ye de grupos WT o *TNFRp55*<sup>-/-</sup> fueron estimulados con LPS en presencia de los inhibidores de MAPKs JNK, ERK o p38. **A-C** 12 horas post-estímulo se midieron los niveles de IL-10 secretados en el sobrenadante de cultivo **D-F** 24 horas post-estímulo se midieron los niveles de IL-10. Estudio comparativo en los distintos tiempos ensayados de ratones infectados *TNFRp55*<sup>-/-</sup> versus WT (**C** y **F**). El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una o dos vías seguido por el test de comparación múltiple Tukey y Bonferroni respectivamente. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

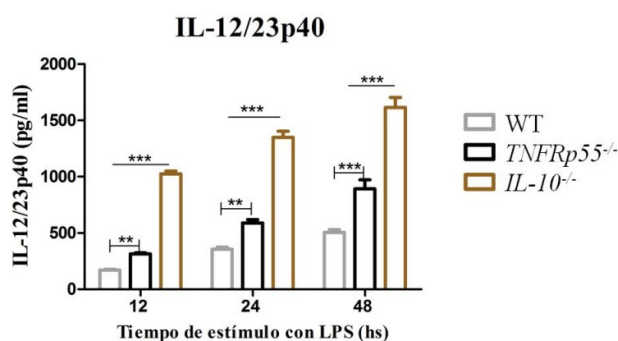
## Ratones *IL-10*<sup>-/-</sup> permiten explicar la relación IL-12/23p40 con IL-10

Para comprender la contribución de IL-10 en la regulación de IL-12/23p40 utilizamos ratones *IL-10*<sup>-/-</sup>. En primer lugar, realizamos un estudio comparativo de las poblaciones celulares de bazo de ratones *IL-10*<sup>-/-</sup> (Fig.9). Pudimos observar que si bien estos ratones no muestran diferencias en la frecuencia de CDs, macrófagos, linfocitos B, linfocitos T CD4<sup>+</sup> ni linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Fig. 9 A, B, D-F), muestran mayor infiltración de neutrófilos a nivel basal comparado con ratones WT y *TNFRp55*<sup>-/-</sup>. Esto indicaría que ratones *IL-10*<sup>-/-</sup> poseen en bazo un perfil basalmente inflamatorio (Fig. 9C). Este resultado nos permitió inferir que estos ratones al ser más susceptibles a la inflamación, no podían ser infectados con Ye, ya que los mismos no sobrevivirían a la infección.



**Fig.9:** Poblaciones celulares del sistema inmune de esplenocitos. Nivel basal de CDs (MHC II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) (A), Macrófagos (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) (B), Neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>) (C), Linfocitos B (CD19<sup>+</sup>) (D), Linfocitos T CD4 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) (E), Linfocitos T CD8 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) (F), estudiados por citometría de flujo en esplenocitos de ratones WT, *TNFRp55<sup>-/-</sup>* o *IL-10<sup>-/-</sup>*. El análisis estadístico fue llevado a cabo por ANOVA de una vía seguido por el test de comparación múltiple de Tukey. Valores  $p \leq 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

A su vez, realizamos una comparación entre los grupos de ratones luego de una estimulación *in vitro* con LPS a diferentes tiempos. Observamos que en condiciones de deficiencia en IL-10, esplenocitos producen niveles significativamente más elevados de IL-12/23p40, aún mayores que el producido por esplenocitos de ratones deficientes en TNFRp55 (Fig. 10).

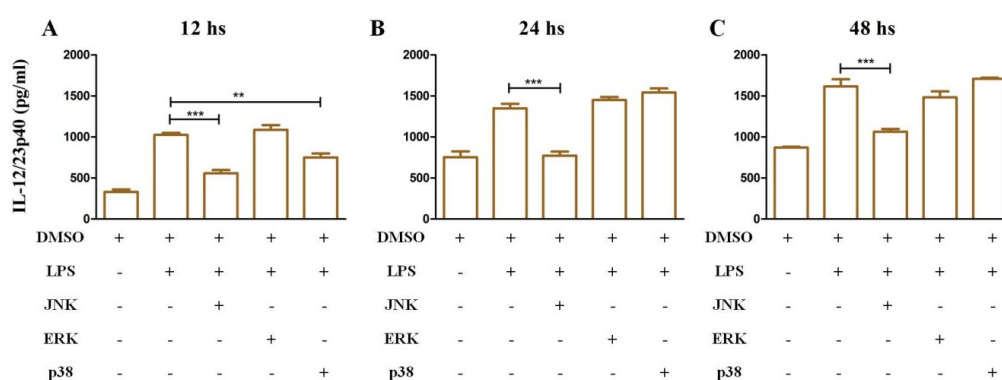


**Fig. 10** Comparación de los niveles de IL-12/23p40 en las diferentes cepas de ratones. Comparación a diferentes tiempos (12, 24 y 48 horas) post-estímulo con LPS (1µg/ml). El análisis estadístico fue llevado a cabo por ANOVA de dos vías seguido por el test de comparación múltiple de Bonferroni. Valores  $p \leq 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Además, estudiamos los efectos de los inhibidores de las vías de señalización MAPKs en un contexto de deficiencia en IL-10. Observamos que a tiempos tempranos

(12hs), JNK y p38 participan en la producción de IL-12/23p40 (Fig. 11A). Sin embargo, sólo la inhibición JNK permite disminuir los niveles de IL-12/23p40 a 24 y 48 hs de estímulo con LPS (Fig. 11B y 11C) destacando nuevamente el rol central de ésta cascada MAPK en la producción de IL-12/23p40.

Los resultados indican una vía de regulación mediada por IL-10 en la producción de IL-12/23p40, ya que en condiciones de deficiencia de IL-10, la misma se encuentra significativamente más elevada. A su vez, la vía de MAPKs - JNK está implicada en la producción de IL-12/23p40, la cual podría, en tiempos tempranos de la infección con Ye, controlar los niveles de ésta citoquina.

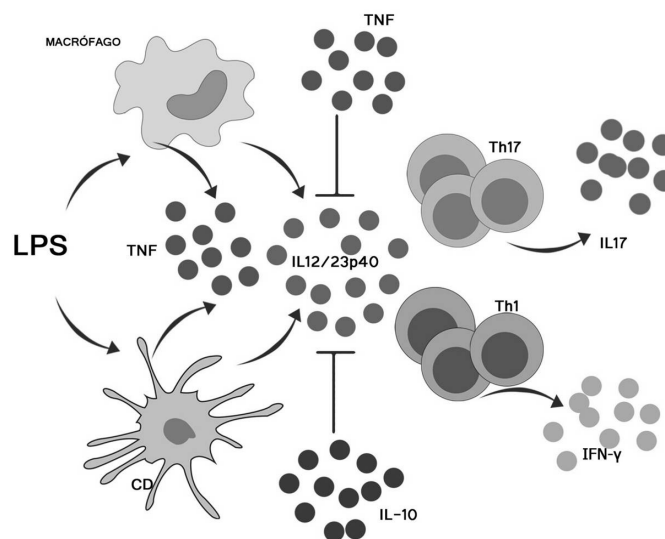


**Fig.11 Niveles de IL-12/23p40 en presencia de inhibidores de MAPKs en ratones *IL-10*<sup>-/-</sup>.** Esplenocitos de ratones *IL-10*<sup>-/-</sup> fueron estimulados con LPS en presencia de los inhibidores de JNK, ERK o p38. A las 12 (A), 24 (B) y 48 (C) horas se midieron los niveles de IL-12/23p40 secretados en el sobrenadante de cultivo. El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una vía seguido por el test de comparación múltiple de Tukey. Valores  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

## Resumen. Modelo

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este objetivo y considerando estudios previos de nuestro laboratorio, proponemos un modelo de las células y citoquinas que cumplirían un rol central en la respuesta inflamatoria a componentes bacterianos en bazo, como así también en su regulación. Este modelo contribuiría a explicar en parte los mecanismos inmunopatogénicos involucrados en el desarrollo de ARE crónica en ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* infectados con *Ye*.

La figura 12 muestra el escenario de la infección por *Ye* en un ratón *TNFRp55<sup>-/-</sup>*, luego de la re-estimulación con LPS de *E. coli*. CDs y macrófagos al ser estimulados producen altos niveles de TNF e IL-12/23p40 (mediante las vías de JNK y p38). Esta última estimula la diferenciación a células Th17 y Th1, que secretan IL-17 e IFN- $\gamma$ , respectivamente [135]. La producción de IL-12/23p40 no puede ser controlada mediante el IL-10 y TNF en ausencia de TNFRp55. Es de destacar que TNF cumple un rol dual: en tiempos tempranos de la infección *in vivo* cumple una función pro-inflamatoria protegiendo a los ratones de la infección con *Ye*; pero en tiempos tardíos, desempeñaría un rol regulatorio modulando la secreción de IL-12/23p40.



**Fig.12 Modelo Infección por *Ye* en esplenocitos *TNFRp55<sup>-/-</sup>*.** Luego del re-estímulo con LPS de *E.coli*, las células dendríticas (CDs) y macrófagos liberan IL-12/23p40 y TNF en altos niveles. IL-12/23p40 induce la diferenciación a linfocitos Th1 y Th17 que liberan las citoquinas pro-inflamatorias como IFN- $\gamma$  e IL-17, respectivamente. Los niveles de IL-12/23p40 no pueden ser reguladas por IL-10 ni TNF en ausencia de TNFRp55, llevando a la inflamación crónica en el modelo de ARE.

En conclusión, los resultados obtenidos indican que las CD<sub>s</sub>, como células centrales en la producción de IL-12/23p40, cumplirían un rol clave en la desregulación de la respuesta inmune observada en condiciones de deficiencia de TNFRp55. Profundizar el conocimiento de esta desregulación en estas células, como así también en las cascadas de sobreproducción de IL-12/23p40 contribuirá a dilucidar la inmunopatogenia de ARe inducida por Ye en este modelo murino. Además, aportará al conocimiento del rol modulador de TNF a través de TNFRp55.

## *Objetivo 2*

*Optimizar la obtención de células dendríticas con el fin de estudiar la desregulación de la respuesta inmune en ratones  $TNFRp55^{-/-}$ , analizando su fenotipo, grado de activación y producción de citoquinas luego del estímulo in vitro con LPS o de la infección in vitro con Ye.*



En este apartado, describiremos todos los métodos de obtención que estudiamos a fin de aislar células dendríticas en la cantidad suficiente para hacer ensayos posteriores.

### **Obtención de CDs a partir de peritonitis aséptica.**

Un método descrito para aislar poblaciones celulares del sistema inmune, como macrófagos y neutrófilos, por su fácil obtención y alto rendimiento, es el aislamiento de células del peritoneo previa estimulación con un agente pro-inflamatorio [153]. En estudios previos hemos demostrado la desregulación producida por LPS de *Ye* en macrófagos peritoneales [152], por lo cual células del lavado peritoneal podrían ser una fuente de obtención de CDs para su estudio en condiciones de deficiencia en *TNFRp55*. Si bien se han hallado células con marcadores de CDs en lavados peritoneales de ratas en estado basal [154], no ha sido reportada la frecuencia de CDs que podrían ser obtenidas en dichas muestras.

Además, la bibliografía menciona datos dispares en cuanto a los tipos celulares presentes en el lavado peritoneal, ya sea según la especie, cepa o género de los animales de experimentación; como así también según se utilicen estímulos inflamatorios previos o se trabaje con células residentes. Por esta razón, fue prioritario definir la composición de las suspensiones celulares obtenidas del peritoneo en los animales de nuestro modelo experimental con el objeto de extrapolar y comparar resultados en los pasos subsiguientes.

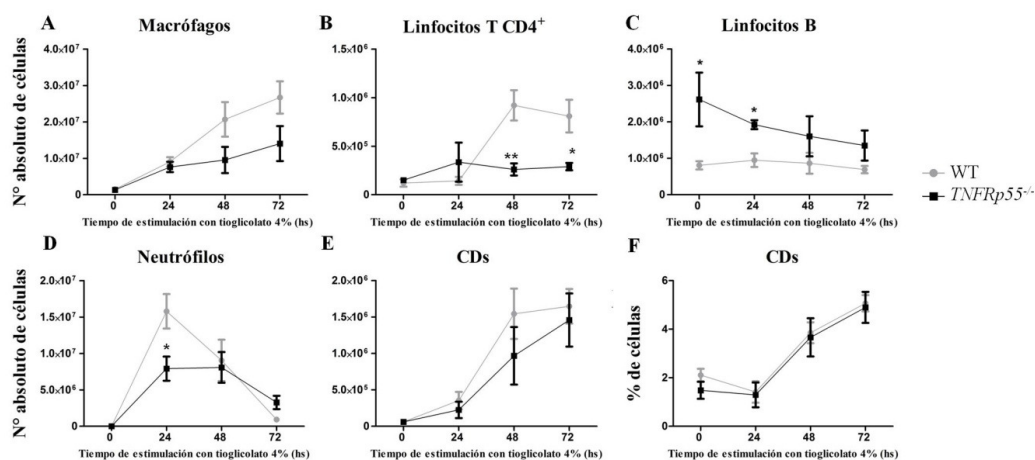
Como punto de partida, nos propusimos estudiar la cinética del reclutamiento celular a peritoneo de ratones WT y *TNFRp55*<sup>-/-</sup>, luego de una peritonitis aséptica inducida con tioglicolato al 4%, a fin de conocer el tiempo de obtención de un alto porcentaje de CDs. Para ello, realizamos un estudio cinético a los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas post-estímulo y evaluamos las poblaciones celulares en los lavados peritoneales: CDs, macrófagos, linfocitos T colaboradores, linfocitos B y neutrófilos. Para este análisis empleamos citometría de flujo e identificamos cada tipo celular empleando marcadores específicos como se detalla a continuación: CD19<sup>+</sup> para linfocitos B, CD3<sup>+</sup>

CD4<sup>+</sup> para linfocitos T colaboradores, CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> para macrófagos, MHC-II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> para CDs y Ly6G<sup>+</sup> para neutrófilos (Fig. 13).

Realizamos un estudio comparativo entre ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup> y WT, y encontramos en estado basal (0 hs), un número absoluto significativamente mayor de linfocitos B en condiciones de deficiencia de TNFRp55 (Fig.13C). A las 24 horas post-estímulo, el mismo grupo presentó un mayor número de linfocitos B pero menor de neutrófilos (Fig.13D). A 48 y 72 horas post-estímulo, el grupo *TNFRp55*<sup>-/-</sup> presentó menor número de linfocitos T colaboradores (Fig. 13B) y una tendencia a un mayor número de macrófagos aunque no alcanzó a ser estadísticamente significativo (Fig. 13A). Teniendo en cuenta estas observaciones, podemos inferir que frente a un mismo estímulo en condiciones de deficiencia de TNFRp55, existe una cinética diferencial de reclutamiento celular a peritoneo.

El mismo análisis fue realizado en la población de CDs, sin embargo no encontramos diferencias entre los grupos de ratones (Fig. 13E). El rendimiento porcentual de CDs alcanzado por este método fue de 2% en estado basal y de 5% a 72 horas post-estímulo (Fig. 13F), alcanzando el valor absoluto  $1,5 \times 10^6$  CDs por ratón (Fig. 13E). Este valor resultó inferior al esperado e insuficiente para realizar el aislamiento de estas células empleando un método de enriquecimiento con perlas magnéticas disponible en el laboratorio. Además, el tiempo necesario para aislar estas escasas células resultaría muy prolongado lo cual iría en detrimento de la viabilidad celular, resultando poco práctico para futuros experimentos.

Cabe destacar que si bien la obtención de CDs de lavado peritoneal no resultó adecuada por su bajo rendimiento, los resultados obtenidos demostraron una cinética de reclutamiento celular a peritoneo diferencial en condiciones de deficiencia de TNFRp55. Si bien no profundizamos en los mecanismos involucrados en estas diferencias ya que exceden al objetivo planteado, estos resultados resultan interesantes para futuros estudios.



**Fig.13 Poblaciones celulares reclutadas a peritoneo en una peritonitis aséptica.** Número absoluto de macrófagos (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) (A), Linfocitos T CD4 (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) (B), Linfocitos B (CD19<sup>+</sup>) (C), Neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>) (D), CDs (MHC II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) (E), y frecuencia de CDs (F), fueron estudiados por citometría de flujos en exudado peritoneal de ratone WT o *TNFRp55*<sup>-/-</sup> luego del estímulo con 4% tioglicolato. El análisis estadístico fue llevado a cabo por ANOVA de dos vías seguido por el test de comparación múltiple de Bonferroni. Valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

## Diferenciación de CDs a partir de médula ósea

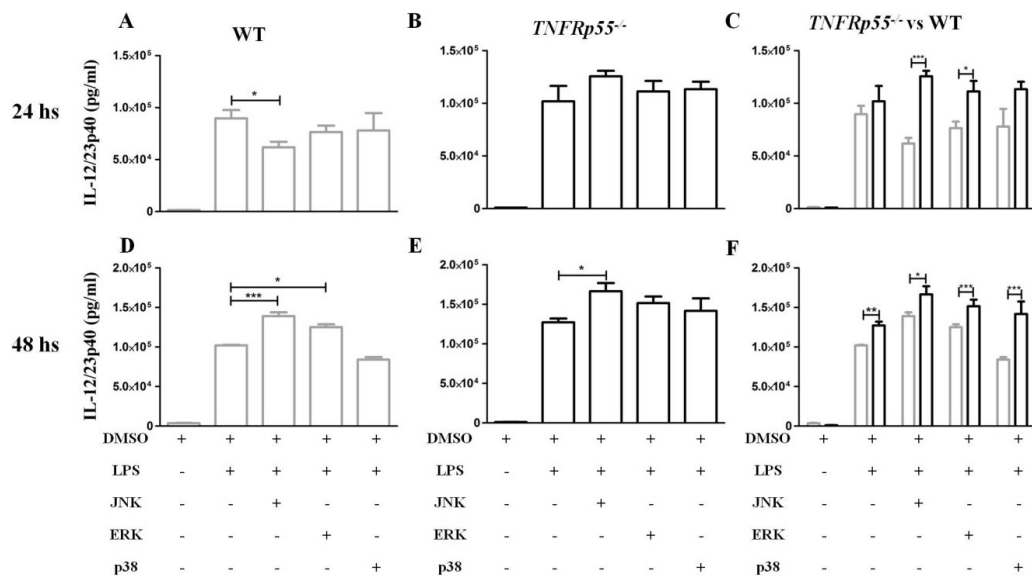
La diferenciación de CDs de médula ósea empleando el factor de crecimiento GM-CSF es un método muy conocido para obtener CDs con alto rendimiento. Para ello, células de médula ósea fueron obtenidas de ratones WT y *TNFRp55*<sup>-/-</sup>, las cuales fueron diferenciadas como se describen en la sección 3.3.1 (MyM).

A fin de realizar estudios funcionales con estas células, analizamos la participación de las vías MAPKs en la producción de IL-12/23p40 mediante el efecto de inhibidores específicos de ERK, JNK y p38. Para lo cual, CDs obtenidas de médula ósea fueron distribuidas en placas de 24 o 96 pocillos y estimuladas como se describe en la Fig.14.

Primero realizamos un estudio comparativo a 24 y 48 hs post-estímulo. A las 24 horas, encontramos una disminución en la secreción de IL-12/23p40 cuando inhibimos la vía JNK en CDs WT, sin encontrar diferencias con CDs *TNFRp55*<sup>-/-</sup> (Fig. 14A y B). No obstante, 48 horas post-estímulo observamos un aumento de IL-12/23p40 cuando inhibimos la vía ERK en CDs WT (Fig. 14D) y un aumento de IL-12/23p40 en ambos

grupos de ratones cuando inhibimos la vía JNK (Fig. 14D y 14E). Por lo tanto, estas vías participarían en la regulación y no en la producción de IL-12/23p40. Al comparar CDs de ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* versus WT, las inhibiciones de MAPKs no modificaron la sobreproducción significativa de IL-12/23p40 por CDs de ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* respecto a WT tanto a 24 hs (Fig. 14C) como a 48 hs (Fig. 14F). A su vez, destacamos una diferencia en la secreción de IL-12/23p40 por CDs obtenidas de médula ósea, en el orden de  $1 \times 10^5$  pg/ml (0,1µg/ml), que resultó más elevada que la secretada por esplenocitos totales.

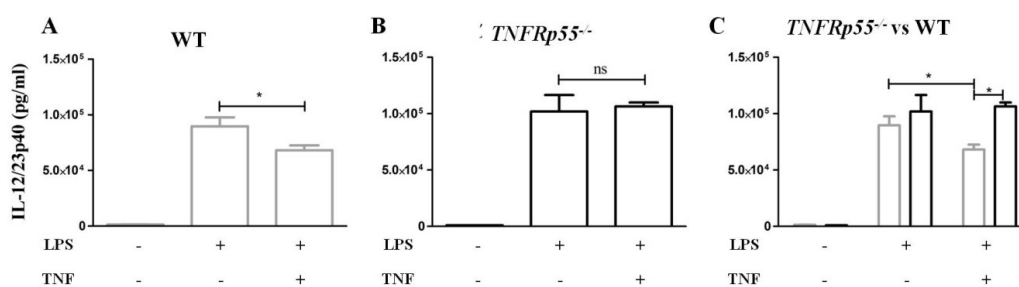
Mediante estas observaciones, la obtención de CDs a partir de su diferenciación desde médula ósea resultó de alto rendimiento, pero observamos diferencias en términos de funcionalidad con respecto a esplenocitos. Por lo cual no nos permite explicar los resultados obtenidos *in vivo*, aunque en términos de conocimiento resultó interesante el perfil de activación y de respuesta encontrados en estas células.



**Fig. 14. Niveles de IL-12/23p40 secretados por CDs de ratones WT o *TNFRp55<sup>-/-</sup>* en presencia de inhibidores de MAPKs.** CDs obtenidas por diferenciación a partir de médula de ósea fueron estimulados con LPS (1µg/ml) en presencia de los inhibidores de las MAPKs JNK, ERK o p38. A las 24 horas (A-C), y 48 horas (D-F) post-estímulo, se midieron los niveles de IL-12/23p40 secretados en el sobrenadante de los cultivos. Estudio comparativo en los distintos tiempos ensayados de ratones (C y F). El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una o dos vías seguido por el test de comparación múltiple Tukey y Bonferroni, respectivamente. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

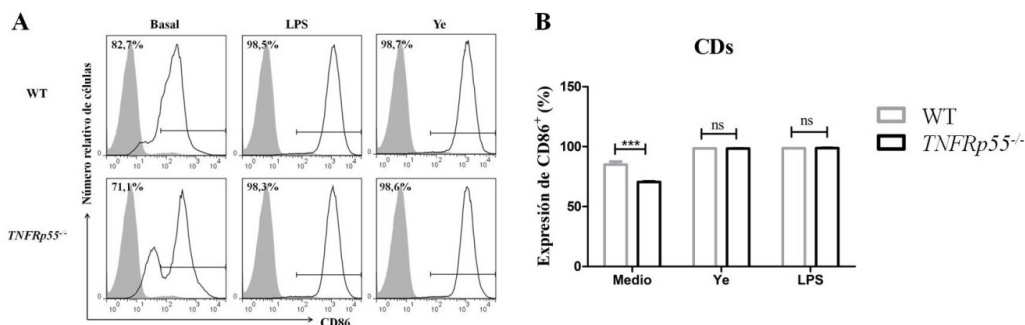
## Estandarización de la concentración de TNFh y protocolo de co-cultivo

En las CDs obtenidas de ambos grupos de ratones estudiamos los efectos de TNF, para lo cual usamos TNF humano (TNFh), el cual se une específicamente a TNFRp55 [155]. La concentración a utilizar fue estandarizada en células JAWS II (línea celular de CDs) (ensayo mostrado en el siguiente apartado). Realizamos un estudio comparativo entre CDs de ambos grupos de ratones, donde observamos a las 24 horas post-estimulo con LPS, una disminución en la producción de IL-12/23p40 en CDs obtenidas de ratones WT estimuladas con LPS en presencia de TNF (Fig. 15A). No encontramos diferencias en CDs *TNFRp55*<sup>-/-</sup> bajo las mismas condiciones (Fig. 15B). Estos resultados indicarían que TNF estaría implicado en la regulación de IL-12/23p40 y que en la misma participaría la señalización por TNFRp55.



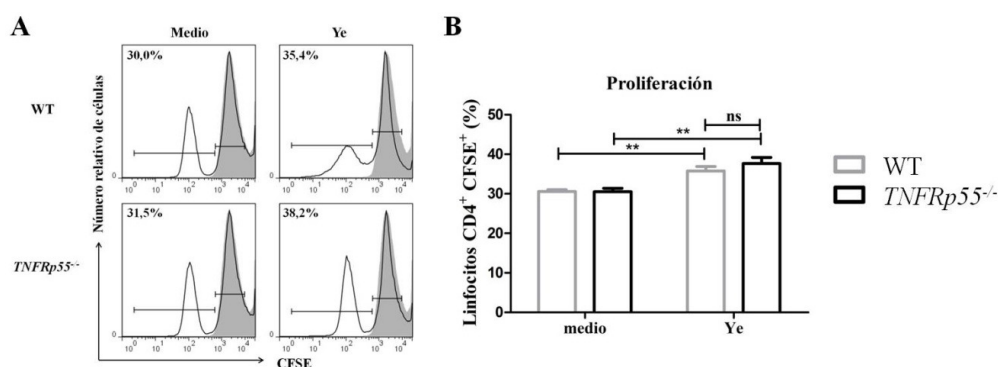
**Fig.15. Niveles de IL-12/23p40 secretados por CDs de ratones WT y *TNFRp55*<sup>-/-</sup> en presencia de TNFh.** CDs de ratones WT (A) o *TNFRp55*<sup>-/-</sup> (B) fueron estimulados como se indica en la figura con LPS solo o en presencia de TNF. A las 24 horas, se midieron los niveles de IL-12/23p40 secretados en el sobrenadante de los cultivos. Estudio comparativo de CDs *TNFRp55*<sup>-/-</sup> versus WT (C). El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una o dos vías seguido por el test de comparación múltiple Tukey y Bonferroni, respectivamente. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos ( $*p < 0.05$ ).

Por otro lado, realizamos una infección *in vitro* con Ye para comparar el grado de activación de CDs de ambos grupos de ratones. En la figura 16, observamos una menor expresión de CD86 en CDs *TNFRp55*<sup>-/-</sup> a nivel basal, pero ambos grupos se activaron de manera similar mediante el estímulo con LPS o la infección con Ye.



**Fig.16. Expresión de CD86<sup>+</sup> en CDs de ratones WT o *TNFRp55*<sup>-/-</sup>.** Los cuales fueron estimulados con LPS o infectadas *in vitro* con Ye. Las células fueron analizadas por citometría para estudiar el grado de activación. **A.** Histograma representativo de cada condición, el pico sombreado corresponde al control de isotipo, la línea indica la marca positiva y el porcentaje indica las células positivas **B** Análisis comparativo entre ambos grupos de CDs. El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de dos vías seguido por el test de comparación múltiple Bonferroni. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\*\* $p < 0.001$ ).

A su vez, ensayamos el protocolo de co-cultivo de CDs con linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> fueron aislados, utilizando perlas magnéticas sensibilizadas con anticuerpos anti-CD4, de esplenocitos de ratones WT naïve. Posteriormente, estos linfocitos fueron marcados con CFSE, a fin de estudiar su proliferación en respuesta a la activación con las CDs WT o *TNFRp55*<sup>-/-</sup> infectadas *in vitro* con Ye. Observamos mayor proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> incubados con CDs infectadas, sin diferencias entre ambos grupos de CDs (Fig.17).



**Fig.17. Proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> co-cultivados con CDs** de ratones WT o *TNFRp55*<sup>-/-</sup> obtenidas por diferenciación de médula ósea, fueron infectadas *in vitro* con Ye durante 1 hora. Luego, de incubar durante 24 hs con gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares, las CDs fueron lavadas y co-cultivadas en una relación 5:1 con linfocitos T provenientes de bazo de ratón WT naïve marcados con CFSE. Se analizó la proliferación celular por citometría de flujo. **A.** Histograma representativo de cada condición, el pico sombreado indica linfocitos T marcados con CFSE no co-cultivados con CDs (marca sin proliferación). Las líneas de derecha a izquierda indican células resultantes de la proliferación celular, cuyo porcentaje se indica en el margen superior. **B.** Análisis comparativo entre co-cultivos con CDs *TNFRp55*<sup>-/-</sup> o WT. El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de dos vías seguido

por el test de comparación múltiple Bonferroni. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\*\* $p < 0.01$ ).

En resumen, CDs obtenidas por diferenciación de médula ósea, presentaron diferente funcionalidad con respecto a la observada en esplenocitos totales, tanto en la secreción de IL-12/23p40 como en la respuesta a los inhibidores de MAPKs. Por lo cual no nos permite analizar *in vitro* los mecanismos moleculares de las diferencias detectadas *in vivo* (ver resultados previos).

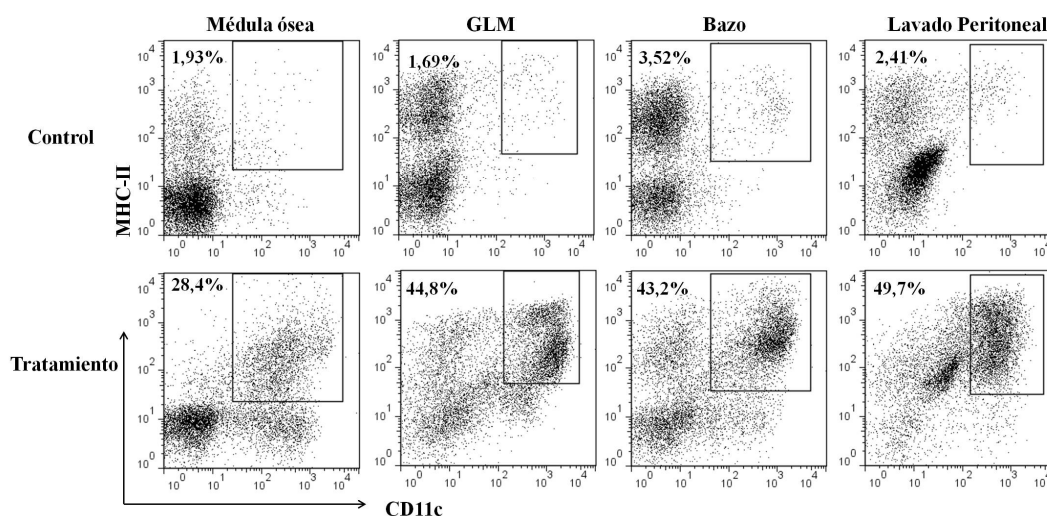
Por otro lado, la estimulación con LPS en presencia de TNFh demostró un efecto regulador de TNF sobre la secreción de IL-12/23p40 en CDs WT, pero no en células deficientes en TNFRp55, evidenciando la participación de esta señalización en este efecto regulatorio. A su vez, el ensayo de co-cultivo permitió determinar que CDs de ambos grupos se activan de igual forma al ser infectadas *in vitro* con Ye, induciendo similar proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> provenientes de un ratón WT naïve. Estos ensayos nos permitieron plantear nuevos experimentos utilizando TNFh para conocer la regulación mediada por TNFRp55 en CDs, y reformular experimentos de co-cultivo utilizando linfocitos T provenientes de ratones WT y *TNFRp55*<sup>-/-</sup> infectados y no naïve, para profundizar en la funcionalidad de éstas células utilizando todas la variables.

### **Obtención de CDs a partir de un modelo de expansión celular**

CDs se encuentran en muy escaso número en diversos tejidos. Se ha demostrado que la inyección del factor Flt3L, conocido por inducir diferenciación de células dendríticas desde sus precursores hematopoyéticos, produce un gran aumento de CDs en diferentes órganos [138]. Debido a que Flt3L recombinante es de alto costo, apoyados por trabajos publicados decidimos expandir el número de CDs *in vivo* utilizando un modelo de expansión celular.

Utilizamos la línea de melanoma B16 transfectada de manera estable con el constructo que codifica para Flt3L (Flt3L). Las células de esta línea fueron cultivadas en las condiciones adecuadas indicadas en materiales y métodos, y luego fueron inyectadas a ratones WT de manera subcutánea en la parte posterior del cuello. Al ser una línea de melanoma, induce en los ratones un tumor sólido, el cual produce y libera el factor en una cantidad dependiente del tamaño del mismo. En los primeros experimentos,

probamos la línea celular y el modelo de injerto utilizando ratones hembras WT. Obtuvimos un aumento significativo de CDs logrando altos porcentajes de las mismas en los diferentes órganos: 40 % en bazo, 45% en ganglio linfático mesentérico, 50 % en lavado peritoneal y un 30 % en médula ósea (Fig. 18).



**Fig.18. Modelo de expansión celular.** Ratones hembras WT fueron inyectadas de manera subcutánea con células B16 transfectadas con Flt3L. Luego de aproximadamente dos semanas, pudimos observar que el tumor se había formado. Posteriormente obtuvimos médula ósea, GLM, bazo y lavado peritoneal de los ratones tratados y control. Luego del procesamiento de los órganos, las células fueron marcadas con anticuerpos anti-MHC-II y anti-CD11c, para determinar el aumento de CDs en cada órgano en estudio. Se muestran diagramas de punto representativo de los resultados, la selección representa CDs y el porcentaje de las mismas en cada órgano.

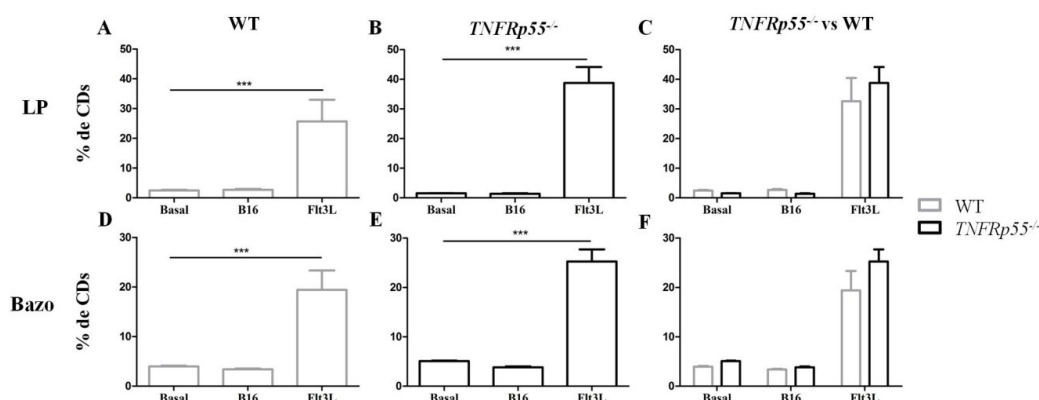
En los experimentos subsiguientes utilizamos ratones machos WT y *TNFRp55*<sup>-/-</sup> para mantener el género utilizado en los experimentos de esplenocitos. Al no observar el crecimiento del tumor, ensayamos diferentes concentraciones de células a inyectar, sin lograr el desarrollo del tumor. Por lo tanto, utilizamos ratones hembras, en los cuales se pudieron reproducir los resultados previos. Por lo tanto inferimos que este tumor es dependiente de hormonas.

Para demostrar que los resultados observados se deben al factor y no al tumor inducido por las células B16, en los siguientes ensayos incluimos grupos de ratones WT y *TNFRp55*<sup>-/-</sup> controles (basal), inyectados con células B16 no transfectadas, o con células B16 transfectadas con Flt3L. Luego de observar el crecimiento del tumor, obtuvimos los bazos y lavados peritoneales de todos los grupos. Posteriormente, las células provenientes de cada órgano fueron marcadas para CDs (MHC-II y CD11c) y



analizadas mediante citometría de flujo. En estos experimentos observamos que sólo los grupos que fueron inyectados con células B16 transfectadas con Flt3L produjeron un aumento en la frecuencia de CDs tanto en lavado peritoneal (Fig. 19A y 19B), como en esplenocitos totales (Fig. 19D y 19 E). Luego, realizamos un estudio comparativo entre ratones WT y *TNFRp55*<sup>-/-</sup> en el cual no observamos diferencias en las frecuencias de CDs en los órganos correspondientes. Por lo cual, concluimos que el factor Flt3L induce una expansión en la frecuencia de CDs, la cual no es afectada por la falta de TNFRp55.

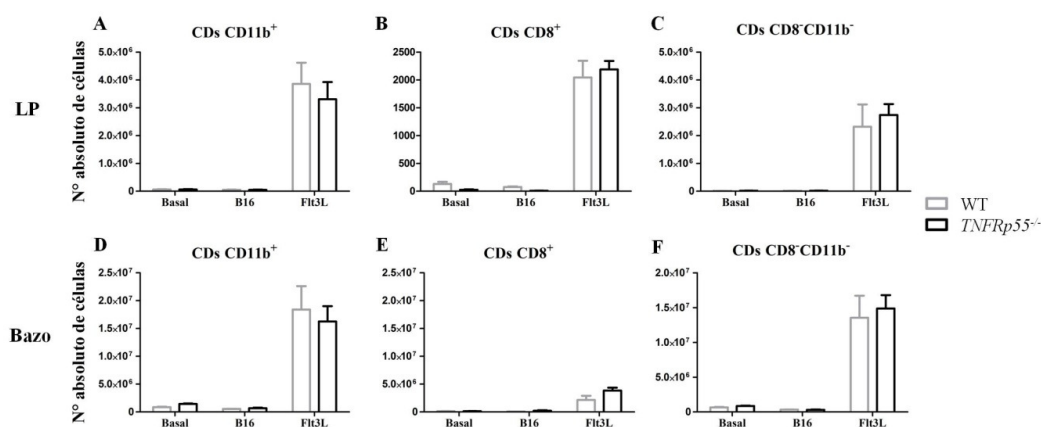
Se observaron diferencias macroscópicas de los órganos de ratones no tratados (basal) o inyectados con B16 comparadas con aquellos de ratones tratados con células B16 transfectadas con Flt3L que presentaron esplenomegalia y adenomegalia. Además, se observó mayor turbidez en los lavados peritoneales de ratones que recibieron la línea transfectada.



**Fig.19 Frecuencia de CDs.** Mediante citometría se identificaron las CDs (MHC II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) provenientes de lavado peritoneal (A – C) y esplenocitos totales (D – F) de ratones WT o *TNFRp55*<sup>-/-</sup> inyectados con células B16 (B16) ó con células B16 transfectadas de manera estable con el constructo que codifica para Flt3L (Flt3L), y compararon con controles (basal). Se muestra los resultados del estudio comparativo entre ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup> vs WT cada órgano (C y F). El análisis estadístico fue llevado a cabo por ANOVA de una o dos vías seguido por el test de comparación múltiple de Tukey o Bonferroni, respectivamente. Valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Datos en la bibliografía indican que el factor Flt3L en este modelo de expansión, induce un aumento selectivo de la subpoblación CD8<sup>+</sup> de CDs [156] y otros trabajos no encuentran una diferencia en las subpoblaciones [157]. Por lo cual, evaluamos las subpoblaciones de CDs en ambos órganos, ya que la subpoblación CD8<sup>+</sup> se encuentra en baja proporción en lavado peritoneal a diferencia de bazo.

Primero, tomamos células de lavado peritoneal y bazo en todas las condiciones antes ensayadas en ambos grupos de ratones, las marcamos específicamente para CDs (MHC-II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>), y utilizamos anticuerpos para CD11b y CD8 para analizar las subpoblaciones de CDs. En lavado peritoneal, la subpoblación CD8<sup>+</sup> (Fig. 20B) resultó despreciable en comparación a las demás subpoblaciones (Fig. 20A y 20C), indicando que esta subpoblacion no aumenta de manera diferencial en condiciones de Flt3L. En esplenocitos observamos un incremento proporcional y equitativo en todas las subpoblaciones estudiadas (Fig. 20D – 20F). Por lo cual podemos inferir que la estimulación específica con Flt3L en el modelo de expansión ensayado no favorece la amplificación de ninguna de las subpoblaciones estudiadas de CDs. A su vez, no encontramos diferencias entre las subpoblaciones al comparar ambos grupos de ratones (Fig. 20).



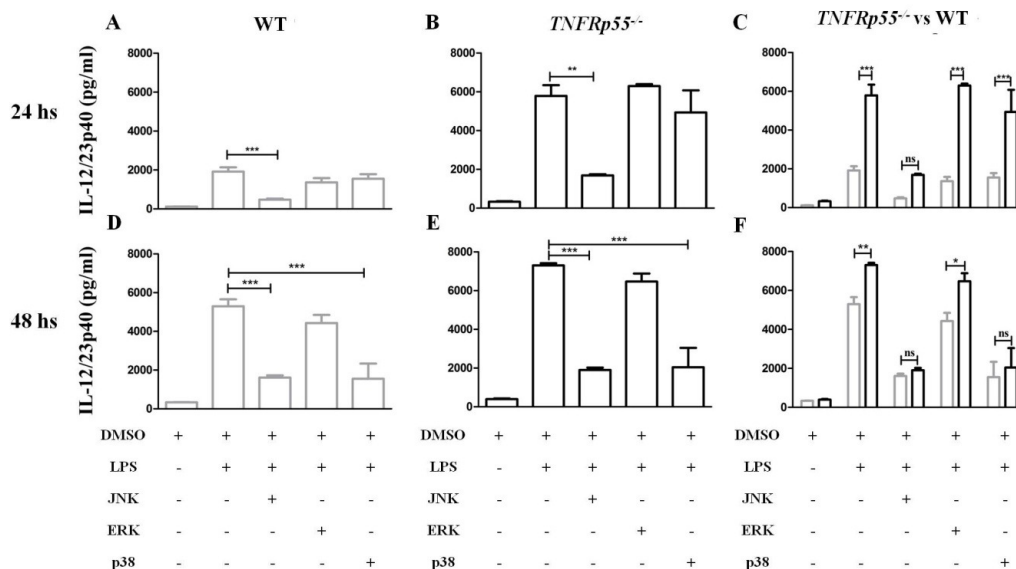
**Fig.20. Subpoblaciones de CDs.** Mediante citometría se marcaron específicamente CDs (MHC II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) provenientes de bazo (A-C) y lavado peritoneal (D-F) de ratones WT o *TNFRp55*<sup>-/-</sup>. Las subpoblaciones CD8<sup>+</sup> (A y D), CD11b<sup>+</sup> (B y E) y CD11b<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (C y F) fueron evaluadas. El análisis estadístico fue llevado a cabo por ANOVA de dos vías seguido por el test de comparación múltiple de Bonferroni. Valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos

En bazo obtuvimos un 30% de CDs (valor absoluto:  $3,5 \times 10^7$  células) y en lavado peritoneal un 50% (valor absoluto:  $8 \times 10^6$  células). De este modo, demostramos que el método de expansión *in vivo* ensayado resulta adecuado para obtener y purificar CDs con un alto rendimiento en ambos grupos de ratones.

## Análisis de las vías MAPKs en la producción de IL-12/23p40 e IL-10

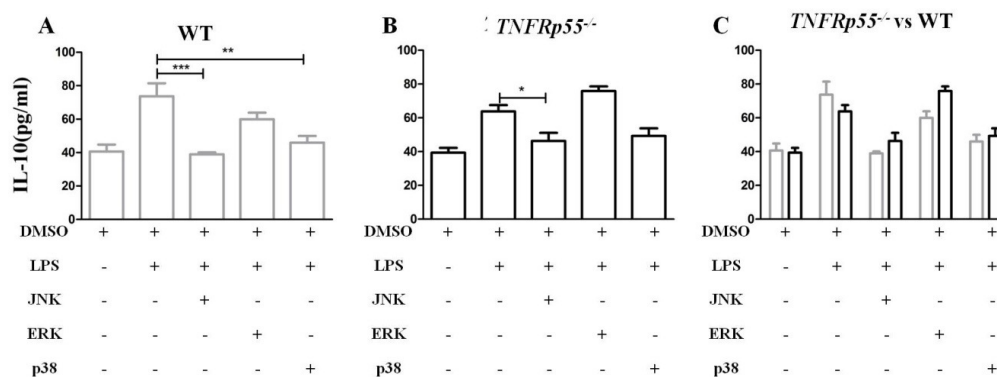
A fin de analizar la participación de las vías MAPKs en los mecanismos de desregulación en la sobreproducción de IL-12/23p40 en ausencia de TNFRp55 en CDs purificadas, realizamos el modelo de expansión, y luego del tiempo necesario para el desarrollo del tumor, obtuvimos los esplenocitos de ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* y WT tratados con la línea B16 transfectada con Flt3L. Posteriormente, mediante perlas magnéticas, enriquecimos con CDs, las cuales fueron distribuidas en placas de 96 pocillos estimuladas con LPS con o sin la presencia de inhibidores de las vías MAPKs (JNK, ERK y p38).

Como en el estudio previo en esplenocitos totales (Fig.6), observamos una disminución significativa cuando inhibimos la vía JNK a las 24 hs en CDs WT y CDs *TNFRp55<sup>-/-</sup>* (Fig. 21A y 21D), y frente a la inhibición de tanto JNK como p38 a las 48 hs en CDs WT y CDs *TNFRp55<sup>-/-</sup>* (Fig. 21B y 21E) con relación a los valores observado en células sin inhibidor. En el estudio comparativo entre ambos tipos de CDs, observamos que CDs *TNFRp55<sup>-/-</sup>* produjeron significativamente mayor cantidad de IL-12/23p40 en los tiempos ensayados, y alcanzaron niveles similares a CDs WT cuando se utilizaron los inhibidores JNK y p38 (Fig. 21C y 21F). De estas observaciones, inferimos que las vías JNK y p38 se encuentran implicadas en la producción de IL-12/23p40. Además, los resultados obtenidos empleando el modelo de expansión de CDs descrito resultaron comparables a los obtenidos en esplenocitos sin previa expansión (objetivo 1), indicando que este modelo nos permitiría profundizar los mecanismos moleculares asociados a la sobreproducción de IL-12/23p40 en esplenocitos de ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>*.



**Fig. 21. Niveles de IL-12/23p40 secretada en presencia de inhibidores de MAPKs.** CD's obtenidas de esplenocitos luego de su expansión celular en ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* o *TNFRp55<sup>-/-</sup>* fueron estimulados con LPS (1µg/ml) en presencia de los inhibidores de MAPKs JNK, ERK o p38. **A-C** 24 horas post-estímulo se midieron los niveles de IL-12/23p40 secretados en el sobrenadante de los cultivos **D-F** 48 horas post-estímulo se midieron los niveles de IL-12/23p40. Estudio comparativo de CD's de ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* versus WT en sobrenadantes de 24 y 48 hs (**C** y **F**, respectivamente). El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una o dos vías seguido por el test de comparación múltiple Tukey y Bonferroni, respectivamente. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

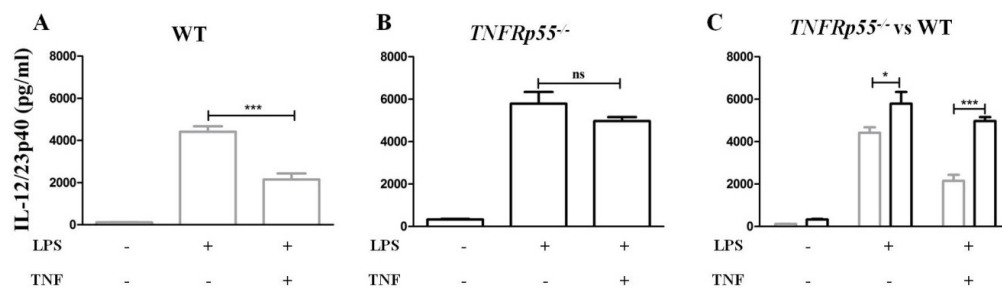
En los mismos sobrenadantes y en estadios tempranos (24 hs), determinamos los niveles de IL-10 mediante ELISA, para corroborar si existía una relación entre ambas citoquinas al emplear CD's purificadas. Evaluamos la implicancia de los inhibidores MAPKs en CD's WT y *TNFRp55<sup>-/-</sup>* 24 horas post-estímulo con LPS. A las 24 horas post-estímulo, observamos disminución significativa en la secreción de IL-10 por CD's WT cuando utilizamos inhibidores de JNK y p38 (Fig. 22A), y en CD's *TNFRp55<sup>-/-</sup>* en presencia sólo del inhibidor JNK en comparación con los valores observados en células sin inhibidor (Fig. 22B). Estos resultados sugieren que la vía de señalización de las MAPKs también participarían en la secreción de IL-10, volviendo a corroborar los resultados presentados en el objetivo 1.



**Fig. 22. Niveles de IL-10 secretadas en presencia de inhibidores de MAPKs.** CDs de ratones WT (A) o *TNFRp55*<sup>-/-</sup> (B) fueron estimulados con LPS en presencia de los inhibidores de MAPKs JNK, ERK o p38. A las 24 horas, se midieron los niveles de IL-10 secretados en el sobrenadante de cultivo. Estudio comparativo entre los niveles de IL-10 en los sobrenadantes de CDs de ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup> o WT (C). El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una o dos vías seguido por el test de comparación múltiple Tukey y Bonferroni, respectivamente. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

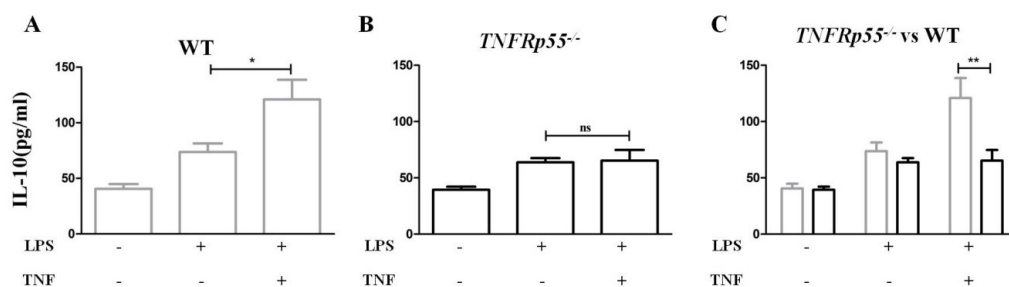
### Efecto regulador de TNF en la vía TNFRp55: TNF humano

Para comprender mejor el rol de TNFRp55 de CDs en la producción de IL-12/23p40, utilizamos las CDs de bazo luego de su expansión celular en ambos grupos de ratones. Estas células fueron estimuladas con LPS solo o en presencia de TNFh. En este ensayo, observamos que TNFh provoca una disminución significativa en la producción IL-12/23p40 por CDs WT (Fig. 23A) en comparación a los valores observado en células sin TNFh. Sin embargo, TNFh no modificó los niveles de IL-12/23p40 en los sobrenadantes de CDs *TNFRp55*<sup>-/-</sup> con relación a los valores hallados en células sin TNFh. Estos resultados podrían sugerir que TNF mediaría a través de TNFRp55 su rol regulatorio sobre la producción de IL-12/23p40.



**Fig.23. Niveles de IL-12/23p40 secretados en presencia de TNFh.** CDs purificadas de bazo de ratones WT o *TNFRp55<sup>-/-</sup>* obtenidas luego de su expansión, fueron estimuladas con LPS solo o en presencia de TNF humano (TNFh). A las 24, se midieron los niveles de IL-12/23p40 secretados en el sobrenadante de cultivo (A y B). Estudio comparativo entre CDs de ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* vs WT (C). El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una o dos vías seguido por el test de comparación múltiple Tukey y Bonferroni respectivamente. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

Asimismo, simultáneamente medimos IL-10 en los mismos sobrenadantes mediante ELISA, a fin de determinar la asociación de IL-12/23p40 con IL-10. En este ensayo observamos que CDs WT producen significativamente mayor cantidad de IL-10 en presencia de LPS y TNFh (Fig. 24A) comparadas con células no tratadas con TNFh. Estas diferencias no se observaron entre CDs *TNFRp55<sup>-/-</sup>* (Fig. 24B) tratadas y no tratadas. Sin embargo, se observó una menor producción, resultando en una menor producción de IL-10 por CDs *TNFRp55<sup>-/-</sup>* en comparación con CDs WT (Fig. 24 C). Estas observaciones apoyan que la vía de señalización de TNFRp55 participaría en la regulación de IL-12/23p40 y que la producción de IL-10 podría mediar esta regulación.

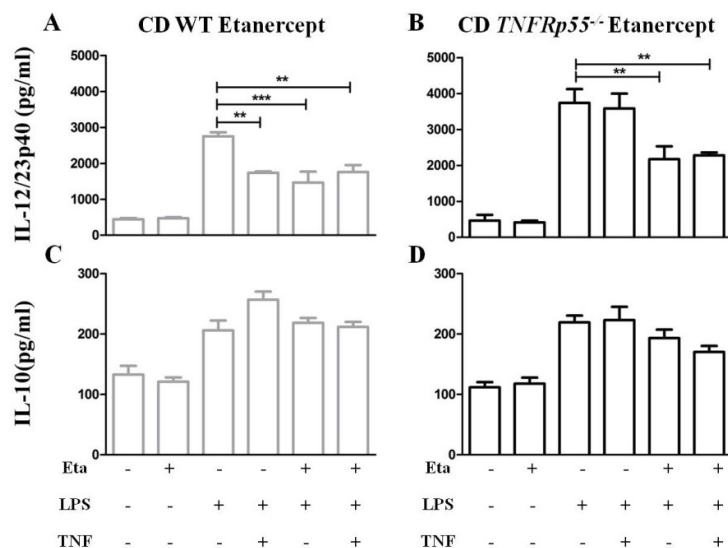


**Fig.24. Niveles de IL-10 secretados en presencia de TNFh.** CDs purificadas de bazo de ratones WT o *TNFRp55<sup>-/-</sup>* luego de su expansión, fueron estimuladas con LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) solo o en presencia de TNF (60  $\text{ng/ml}$ ). A las 24 hs, se midieron los niveles de IL-10 secretados en el sobrenadante de cultivo (A y B). Estudio comparativo entre cada grupo (C). El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una o dos vías seguido por el test de comparación múltiple Tukey y Bonferroni respectivamente. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

## Implicancia de los receptores de TNF en IL-12/23p40

A fin de confirmar los experimentos anteriores, decidimos utilizar inhibidores específicos de TNF o TNFRp55, para conocer la implicancia de los receptores TNFRp55 y TNFRp75 sobre la producción de IL-12/23p40 por CDs.

Para comenzar, utilizamos Etanercept, el cual es una proteína dimérica, construida genéticamente por fusión del dominio extracelular soluble del receptor-2 del factor de necrosis tumoral humano (TNFR2/p75), unido al dominio Fc de la IgG1 humana [158]. Así, mediante Etanercept se inhibe TNF secretado por la célula impidiendo la unión de esta citoquina a sus receptores específicos. En este ensayo, corroboramos en CDs WT, la regulación por parte de TNFh de la producción de IL-12/23p40 (Fig. 25A), y detectamos un leve aumento que no llegó a ser significativo en la producción de IL-10 (Fig. 25C). Cuando utilizamos Etanercept en presencia de LPS y de TNFh, observamos un efecto regulatorio sobre la producción de IL-12/23p40 frente al estímulo con LPS de CDs WT (Fig. 25A). Sin embargo, Etanercept moduló por sí mismo la producción de IL-12/23p40 por LPS en CDs WT (Fig. 25 A), y este efecto regulador fue también detectado en CDs *TNFRp55<sup>-/-</sup>* (Fig. 25B). La presencia de etanercept no modificó significativamente la secreción de IL-10 por CDs de ambos grupos (Fig. 25C y 25D). Estos resultados indicarían que el TNF endógeno, secretado frente al estímulo con LPS mediante TNFRp75, podría participar en la estimulación de la secreción de de IL-12/23p40.

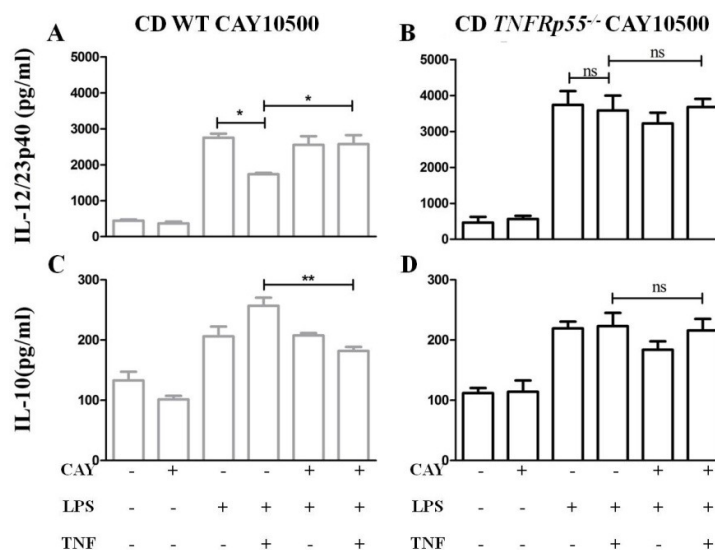


**Fig. 25. Niveles de IL-12/23p40 e IL-10 secretados en presencia de Etanercept.** CDs de ratones WT (A y C) o *TNFRp55<sup>-/-</sup>* (B y D) fueron estimulados con LPS (1µg/ml) solo o en presencia de TNFh (60 ng/ml), Etanercept (1µg/ml) o ambos, como se indica en la parte inferior de la figura. A las 24 horas, se midieron los niveles de IL-12/23p40 (A y B) e IL-10 (C y D) secretados en los sobrenadantes de cultivo. El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una vía seguido por el test de comparación múltiple Tukey. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

Para conocer la implicancia de TNFRp55 en la regulación de IL-12/23p40, utilizamos el inhibidor CAY10500 (CAY), el cual se une a TNF e impide la unión a TNFRp55 [159]. Para comenzar, estandarizamos la concentración del mismo en la línea JAWS II (línea de CDs), ya que el mismo es citotóxico a determinadas concentraciones (ensayo mostrado en el siguiente apartado).

En estos ensayos volvimos a corroborar la disminución de la producción de IL-12/23p40 en CDs WT cuando son estimuladas con LPS en presencia de TNFh. Este efecto fue revertido en presencia de CAY (Fig. 26 A). A su vez, la producción en IL-10 también se ve afectada de manera inversa a la de IL-12/23p40 (Fig. 26C). No encontramos diferencias significativas en CDs *TNFRp55<sup>-/-</sup>* (Fig. 26B y 26D) apoyando nuevamente que la modulación de IL-12/23p40 por TNF es mediada por TNFRp55. Además, en este rol regulador de TNFRp55 sobre la secreción de IL-12/23p40 participaría en la producción de IL-10.





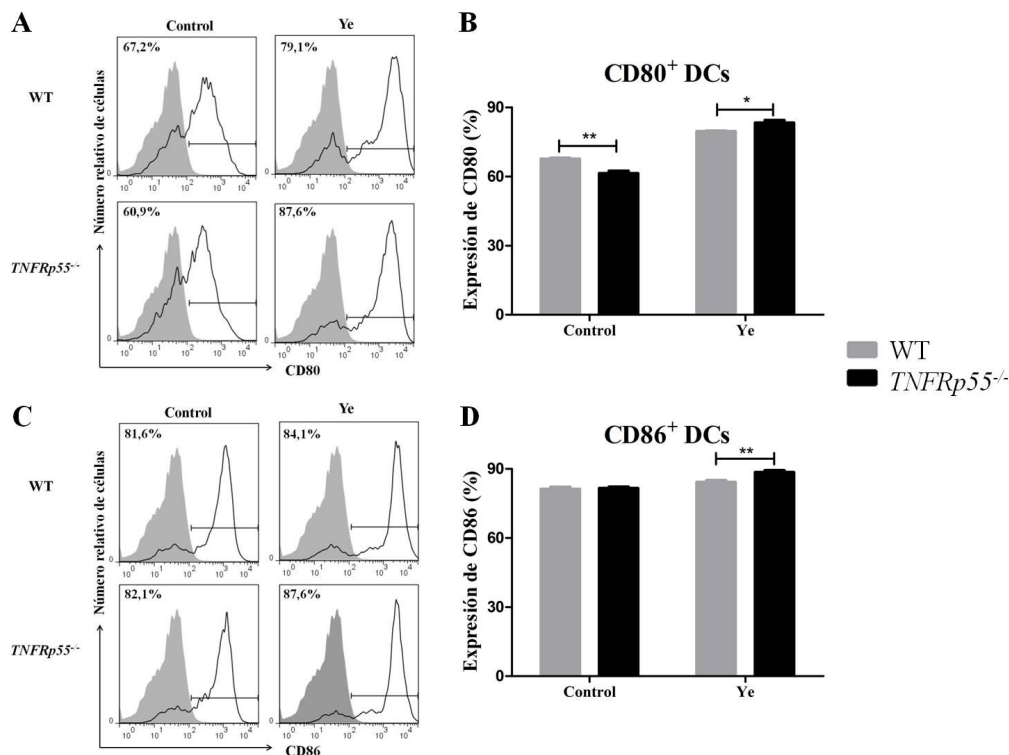
**Fig.26. Niveles de IL-12/23p40 e IL-10 secretados en presencia de CAY10500.** CDs de ratones WT (A y C) o *TNFRp55<sup>-/-</sup>* (B y D) fueron estimulados con LPS (1µg/ml) en presencia de TNFh (60 ng/ml), CAY (1µg/ml) o ambos, como se indica en la parte inferior de la figura. A las 24 horas, se midieron los niveles de IL-12/23p40 (A y B) e IL-10 (C y D) secretados en los sobrenadantes de los cultivos. El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una vía seguido por el test de comparación múltiple Tukey. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

Para concluir, de estas observaciones podemos inferir que en nuestro modelo experimental TNF podría tener un rol dual sobre la producción de IL-12/23p40 a través de sus receptores: a través de TNFRp75 podría inducir la producción de dicha citoquina, y por TNFRp55 estaría involucrado en la regulación de IL-12/23p40.

### Grado de activación de CDs frente a una infección *in vitro* con Ye

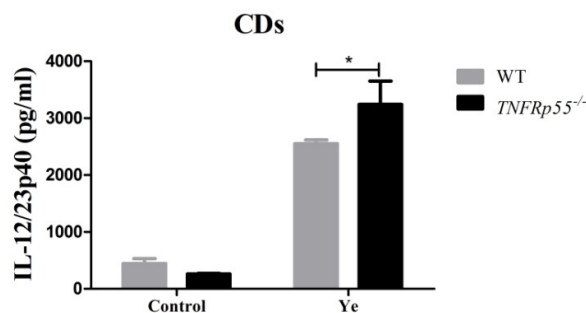
A fin de conocer el grado de activación y la producción de IL-12/23p40 en CDs *TNFRp55<sup>-/-</sup>* y WT en respuesta a Ye, realizamos una infección *in vitro*. Para comenzar, utilizamos CDs purificadas de bazo luego de su expansión en ambos grupos de ratones. Las células fueron distribuidas en placas de 96 pocillos e infectadas con Ye por 1 hora. Luego se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares, y finalmente se incubaron por 24 hs en estufa de cultivo. Posteriormente, fueron levantadas y marcadas con MHC-II y CD11c (marcadores específicos de CDs), y con CD86 y CD80 para medir el grado de activación (moléculas co-estimuladoras). En estos ensayos, observamos un aumento en la expresión de CD80 y CD86 en CDs *TNFRp55<sup>-/-</sup>* a diferencia de sus correspondientes WT que no mostraron variaciones por la infección

con Ye (Fig. 27B y 27D). La alta expresión basal de ambas moléculas co-estimuladoras en CDs de ambos grupos de ratones puede ser debida al método de purificación, que es por selección positiva de las células.



**Fig.27: Estudio del grado de activación de CDs de ratones WT o *TNFRp55*<sup>-/-</sup>.** Las cuales fueron infectadas *in vitro* con Ye durante 1 hora, luego se agregó gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. A las 24 horas, se midieron los niveles de CD80 y CD86 por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de la de la expresión de CD80 (A) y CD86 (C), y el análisis de la frecuencia de expresión de CD80 (B) y CD86 (D). El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de dos vías seguido por el test de comparación múltiple Bonferroni. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

Además, determinamos la concentración de IL-12/23p40 en los sobrenadantes de los cultivos. En estos ensayos, encontramos aumento de los niveles de IL-12/23p40 en CDs *TNFRp55*<sup>-/-</sup> infectados con Ye en comparación a su contraparte WT (Fig. 28). En base a estos resultados, podemos concluir que las CDs *TNFRp55*<sup>-/-</sup> presentan un mayor grado de activación frente a la infección con Ye que las CDs WT.

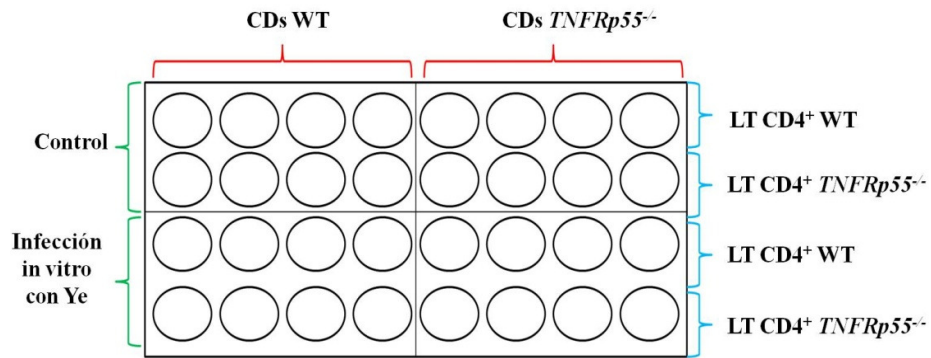


**Fig. 28 Niveles de IL-12/23p40 secretados por CDs purificadas de ratones WT o *TNFRp55<sup>-/-</sup>*.** Las cuales fueron infectadas *in vitro* con Ye durante 1 hora. Luego de ser incubadas con gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares durante 24 horas post-estímulo, se midieron los niveles de IL-12/23p40 secretados en los sobrenadantes de cultivo. El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de dos vías seguido por el test de comparación múltiple Bonferroni respectivamente. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

### **Efecto de CDs *TNFRp55<sup>-/-</sup>* infectadas con Ye en la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>**

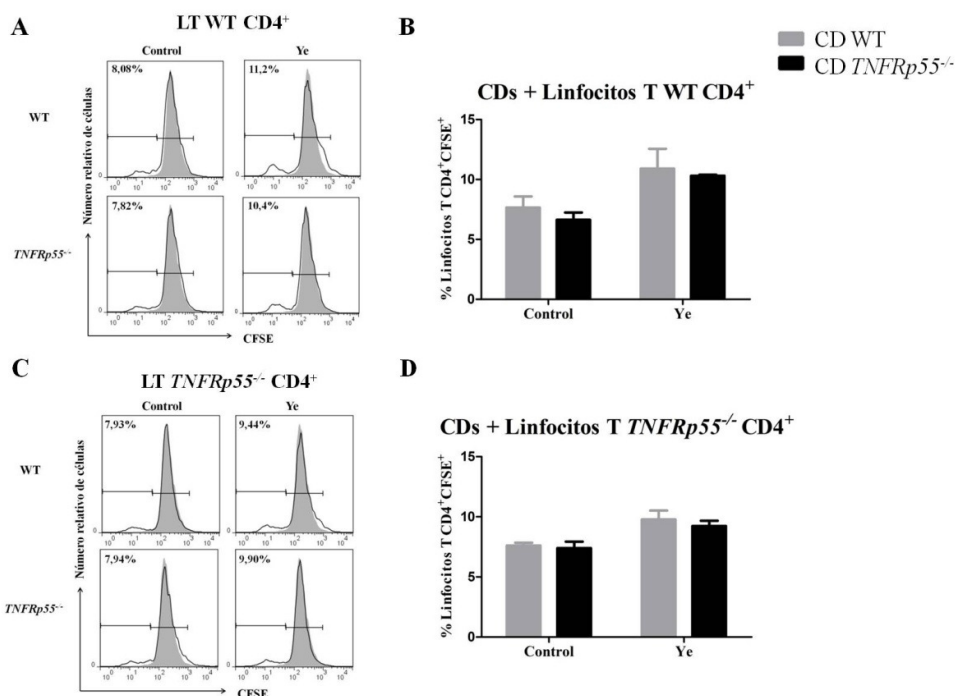
De acuerdo con los resultados anteriormente mostrados, CDs *TNFRp55<sup>-/-</sup>* se encontrarían más activadas y producen mayor cantidad de IL-12/23p40. A fin de determinar la funcionalidad de las mismas sobre la respuesta de linfocitos T, nos propusimos a realizar co-cultivos con linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Para ello, purificamos CDs de bazo luego de su expansión en ambos grupos de ratones, las cuales fueron distribuidas en placas de 96 pocillos. Posteriormente, infectamos estas células *in vitro* con Ye durante 1 hora, y luego del agregado de gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares, se incubaron durante 24 horas.

Simultáneamente, realizamos una infección *in vivo* con Ye por vía orogástrica en ratones machos WT y *TNFRp55<sup>-/-</sup>*. Luego de 5 días, obtuvimos esplenocitos de estos ratones, en los que separamos mediante perlas magnéticas los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y los marcamos con CFSE. Estos linfocitos fueron agregados al cultivo de CDs, luego de las 24 horas de su infección *in vitro*, en una relación 10:1 (linfocitos/CDs). Las combinaciones de células co-cultivadas se resumen en la Fig. 29.



**Fig. 29 Esquema de los ensayos de co-cultivo de CDs con linfocitos para el estudio de proliferación linfocitaria.** CDs fueron purificadas de bazo luego de su expansión en ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup> y WT se infectaron *in vitro* con *Ye* durante 1 hora. Células no infectadas se emplearon como control. Luego se incubaron con gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares durante 24 horas. Se obtuvieron linfocitos T CD4 de ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup> o WT luego de 5 días de infección con *Ye* y se marcaron con CFSE. Las CDs *TNFRp55*<sup>-/-</sup> o WT se co-cultivaron durante 5 días con linfocitos T CD4<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> *TNFRp55*<sup>-/-</sup> o WT en las combinaciones que se muestran en la figura. .

Luego de 5 días de co-cultivo, observamos que en condición de infección previa *in vitro* con *Ye*, CDs WT como *TNFRp55*<sup>-/-</sup> promueven la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> WT (Fig. 30B) como *TNFRp55*<sup>-/-</sup> (Fig. 30D) sin observar diferencias entre CDs WT y *TNFRp55*<sup>-/-</sup>. Estos resultados indican que la deficiencia de TNFRp55 en las CDs no afecta la proliferación de linfocitos T.

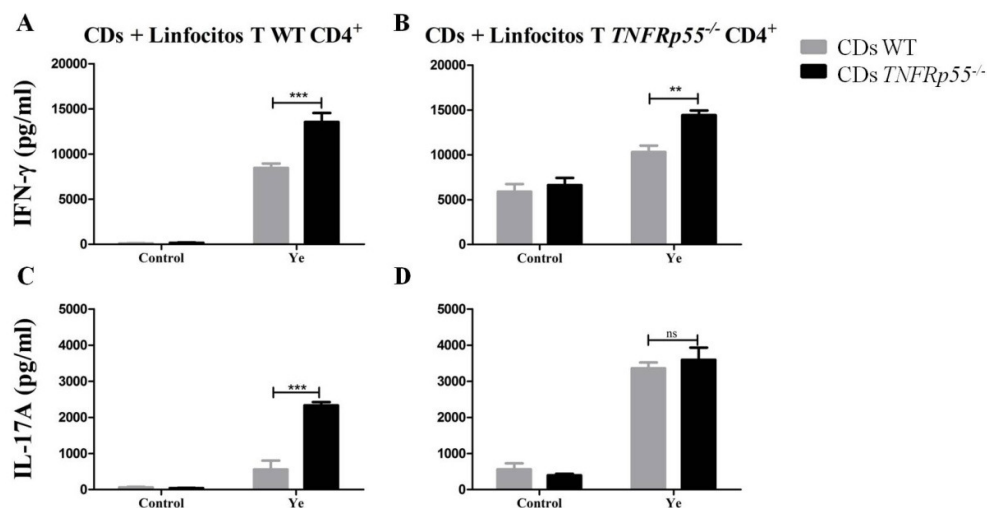


**Fig.30. Proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CFSE<sup>+</sup> mediante co-cultivo con CDs infectadas *in vitro* con Ye.** CDs de ratones WT o TNFRp55<sup>-/-</sup> fueron infectadas *in vitro* con Ye durante 1 hora. Luego de incubar con gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. A las 24 horas post-estímulo se agregaron linfocitos T WT o TNFRp55<sup>-/-</sup> provenientes de ratones infectados con Ye (5 días post-infección) marcados con CFSE, en una relación 10:1. Luego de 5 días de co-cultivo, se realizó el análisis mediante citometría de flujo. Se muestran histograma representativo de cada condición, el pico sombreado gris indica linfocitos T marcados con CFSE que no estuvieron en contacto con CDs (la marca sin proliferación), las líneas indican los marcadores de células proliferantes (marcador de la izquierda) y no proliferantes (marcador de la derecha). El porcentaje corresponde a células proliferantes (A y C). Análisis comparativo de los porcentajes de células proliferantes de linfocitos WT o TNFRp55<sup>-/-</sup> incubados con CDs WT o TNFRp55<sup>-/-</sup> (B y D). El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de dos vías seguido por el test de comparación múltiple Bonferroni. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos

### Efectos de las CDs TNFRp55<sup>-/-</sup> sobre el perfil de citoquinas secretadas por linfocitos T CD4<sup>+</sup>

A fin de determinar los efectos de CDs TNFRp55<sup>-/-</sup> sobre el perfil de citoquinas producidas por linfocitos T CD4<sup>+</sup>, realizamos ensayos similares a los descriptos en co-cultivos (Fig. 29), empleando en este caso linfocitos no marcados con CFSE. Luego de 5 días de co-cultivo, se tomaron los sobrenadantes de los cultivos de todas las condiciones ensayadas, y se midieron las concentraciones de IL-17A e IFN- $\gamma$  mediante ELISA. En estos ensayos observamos que linfocitos T WT CD4<sup>+</sup> en presencia de CDs TNFRp55<sup>-/-</sup> infectadas *in vitro*, producen altas concentraciones de IFN- $\gamma$  e IL-17A en

comparación con células T CD4<sup>+</sup> WT co-cultivadas con CDs WT (Fig. 31A y 31C). Asimismo, linfocitos T *TNFRp55*<sup>-/-</sup> en presencia de CDs *TNFRp55*<sup>-/-</sup> estimuladas producen altas concentraciones de IFN- $\gamma$  (Fig. 31B). No obstante, estos linfocitos producen los mismos niveles de IL-17A que linfocitos WT en presencia de CDs *TNFRp55*<sup>-/-</sup> infectadas previamente con Ye (Fig. 31D).

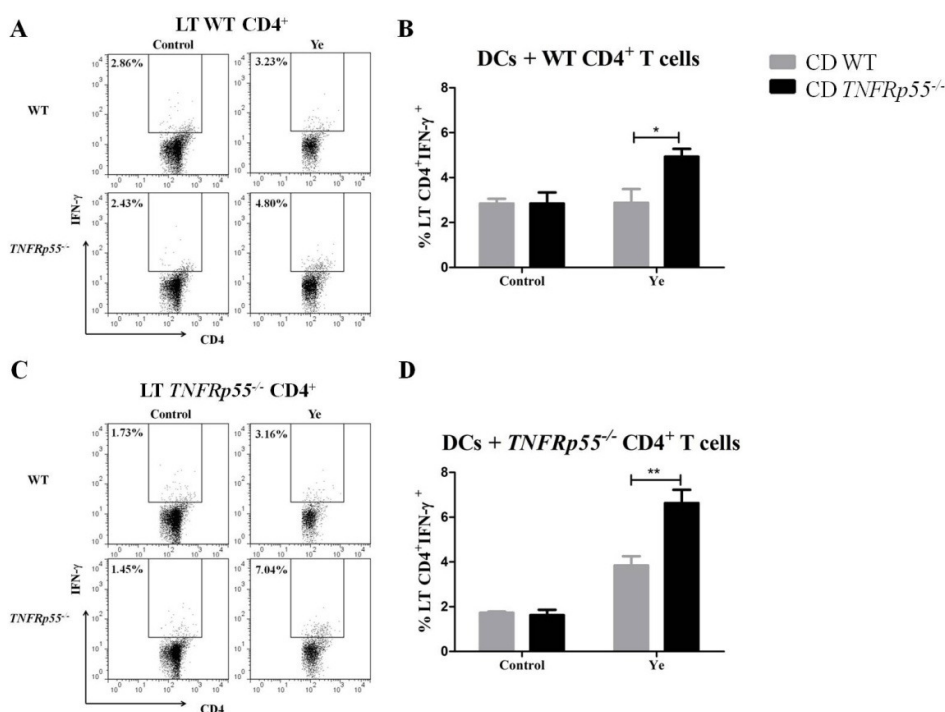


**Fig.31. Niveles de IFN- $\gamma$  e IL-17A secretados por linfocitos T CD4<sup>+</sup> en ensayos de co-cultivo con CDs.** CDs de ratones WT o *TNFRp55*<sup>-/-</sup> fueron infectadas *in vitro* con Ye durante 1 hora. Luego de incubar con gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares, y a las 24 horas post-estímulo se agregaron linfocitos T WT o *TNFRp55*<sup>-/-</sup>, provenientes de ratones infectados con Ye (5 días post-infección) en una relación 10:1. Luego de 5 días de co-cultivo se tomaron los sobrenadantes de los cultivos. Los niveles de IFN- $\gamma$  (A y B), y de IL-17A (C y D) fueron medidos mediante ELISA. El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de dos vías seguido por el test de comparación múltiple Bonferroni. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ns: no significativo).

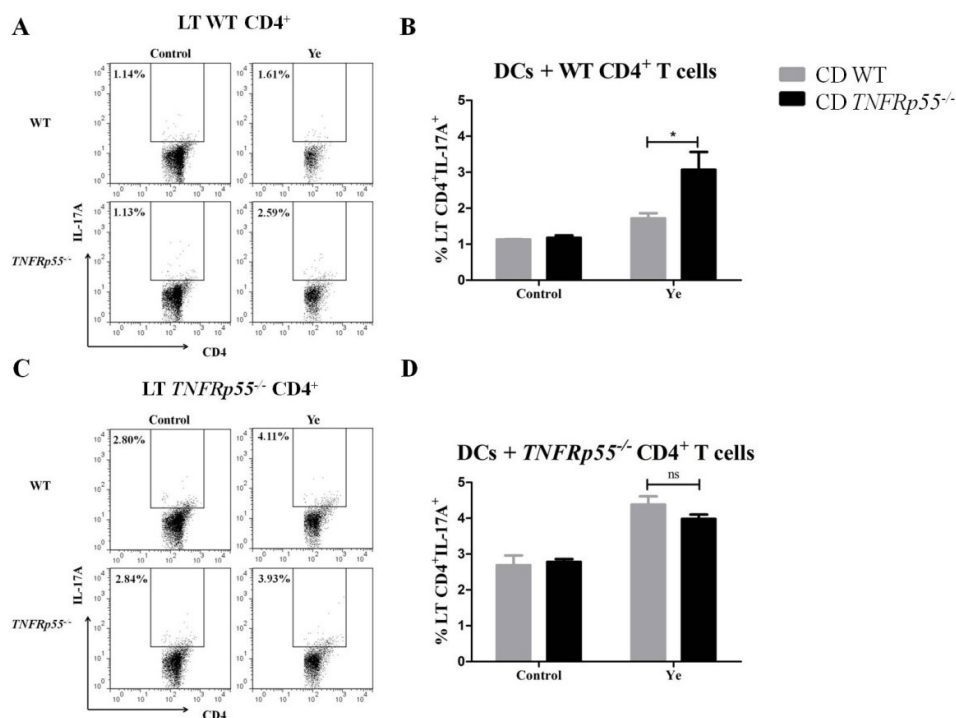
Además, corroboramos estos resultados mediante citometría de flujo, analizando el fenotipo de los linfocitos T CD4 luego del co-cultivo con las CDs *TNFRp55*<sup>-/-</sup> o WT. Realizamos el mismo ensayo de co-cultivo previamente descrito (Fig. 29) durante 5 días de cultivo, con la diferencia que en las últimas horas del cultivo se agregó brefeldina como agente inhibidor de la secreción de citoquinas al medio. Las células fueron marcadas para ser analizadas por citometría de flujo. Utilizamos marcadores específicos de linfocitos T (CD3 y CD4) y marcamos intracelularmente para la detección de IFN- $\gamma$  o IL-17A.

En estos ensayos observamos alta frecuencia de linfocitos T WT CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> como de linfocitos T *TNFRp55*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cuando son co-cultivados con CDs

*TNFRp55*<sup>-/-</sup> infectadas previamente con Ye, con diferencias significativas con respecto a co-cultivos con CDs WT (Fig. 32B y 32D). Asimismo, la frecuencia de linfocitos T WT CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> resultó significativamente superior en co-cultivos con CDs *TNFRp55*<sup>-/-</sup> infectadas *in vitro* con Ye (Fig. 33B). No obstante, linfocitos T *TNFRp55*<sup>-/-</sup> no mostraron diferencias en la frecuencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> comparados con linfocitos T en presencia de CDs WT o *TNFRp55*<sup>-/-</sup> infectadas con Ye (Fig. 33D). En base a estos resultados, podemos inferir que CDs *TNFRp55*<sup>-/-</sup> pueden promover la diferenciación de linfocitos T WT a Th1 productores de IFN- $\gamma$  como a Th17 productores de IL-17A.



**Fig.32. Citometría de la expresión intracelular de IFN- $\gamma$  por linfocitos T co-cultivados con CDs.** CDs de ratones WT o *TNFRp55*<sup>-/-</sup> fueron infectadas *in vitro* con Ye durante 1 hora. Luego de incubar con gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares, a las 24 horas post-estímulo se co-cultivaron con linfocitos T WT o *TNFRp55*<sup>-/-</sup>, provenientes de ratones infectados con Ye (5 días post-infección) en una relación 10:1. Luego de 5 días de co-cultivo y de incubar con brefeldina A, las células fueron marcadas para analizar por citometría de flujo, utilizando marcadores específicos de linfocitos Th (CD3 y CD4), y luego se marcaron intracelularmente para la detección de IFN- $\gamma$ . Se muestran diagramas de punto representativos de cada condición, luego de selección de la población CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (A y C). Se realizó el análisis comparativo de la frecuencia de linfocitos Th IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en los diferentes co-cultivos ensayados (B y D). El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de dos vías seguido por el test de comparación múltiple Bonferroni. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).



**Fig.33. Citometría de la expresión intracelular de IL-17A por linfocitos T co-cultivados con CDs.** CDs de ratones WT o *TNFRp55<sup>-/-</sup>* fueron infectadas *in vitro* con Ye durante 1 hora. Luego de la incubación con gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares, luego de 24 horas post-estímulo se co-cultivaron con linfocitos T WT o *TNFRp55<sup>-/-</sup>*, provenientes de ratones infectados con Ye (5 días post-infección) en una relación 10:1. Luego de 5 días de co-cultivo y la incubación con brefeldina, las células fueron marcadas para analizar por citometría de flujo, utilizando marcadores específicos de linfocitos Th (CD3 y CD4), y luego se marcaron intracelularmente para detectar IL-17A. Se muestran los diagramas de punto representativos de cada condición previa selección de población CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (A y C). Se realizó el análisis comparativo de la frecuencia de linfocitos Th IL-17<sup>+</sup> en los diferentes co-cultivos ensayados (B y D). El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de dos vías seguido por el test de comparación múltiple Bonferroni. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos ( $*p < 0.05$ , ns: no significativo).

## Resumen. Modelo

En base a los resultados obtenidos en el presente objetivo proponemos el siguiente modelo:

En CDs, en respuesta a LPS, TNF, a través de TNFRp75, induciría la producción de IL-12/23p40. Esta secreción sería regulada vía TNF/TNFRp55, la cual podría estar mediada por la producción de IL-10 y otros mecanismos no analizados en el presente estudio. En ausencia de TNFRp55, las CDs aumentan la secreción de IL-12/23p40,





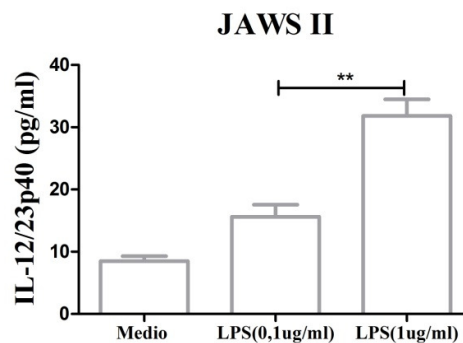
## *Objetivo 3*

*Caracterizar un nuevo modelo de estudio molecular en una línea de CDs que permita dilucidar los mecanismos del rol modulador de TNF y TNFRp55 en nuestro modelo de artritis reactiva.*

En el apartado anterior optimizamos el método de expansión y purificación de CDs, el cual nos permitió dilucidar el rol de TNFRp75 y TNFRp55 sobre la producción de IL-12/23p40 por estas células, como así también su contribución a la diferenciación a diferentes perfiles de linfocitos T. No obstante, se requiere de uno a dos meses de trabajo para obtener CDs mediante este ensayo. A fin de realizar estudios sobre los mecanismos moleculares responsables de la desregulación de IL-12/23p40 en condiciones de deficiencia de TNFRp55, planteamos utilizar la línea JAWS II, la cual es una línea de CDs inmaduras obtenidas por diferenciación de médula ósea del ratón  $p53^{-/-}$  [160].

### Determinación de IL-12/23p40 en JAWS II

Para comenzar, cultivamos la línea utilizando las recomendaciones de ATCC (en medio IMDM en presencia de GM-CSF) que describe las células JAWS II como un cultivo mixto de células adheridas y en suspensión con crecimiento lento, que tienden a crecer mejor en medio con pH bajo. A fin de conocer si estas células secretan IL-12/23p40, primero recurrimos a bibliografía, en la cual existen datos dispares sobre la secreción de esta subunidad de las citoquinas IL-12 e IL-23 [161, 162]. Por lo tanto, primero, ensayamos en esta línea la respuesta a un estímulo con LPS en dos concentraciones (0,1  $\mu\text{g/ml}$  ó 1  $\mu\text{g/ml}$ ) y determinamos en el sobrenadante de los cultivos la producción de IL-12/23p40. Observamos un aumento en la secreción de IL-12/23p40 por estas células en respuesta a la concentración más alta de LPS ensayada, aunque la secreción fue considerablemente baja comparado a los resultados obtenidos en cultivo primario de esplenocitos (Fig. 35).

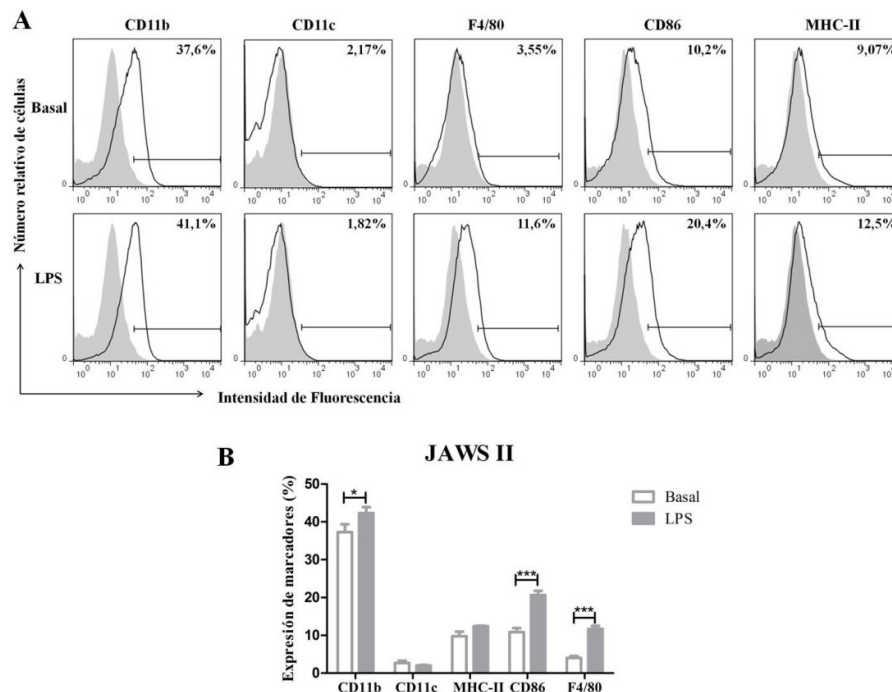


**Fig. 35. Niveles de secreción de IL-12/23p40 por células JAWS.** Células JAWS II fueron distribuidas en placas de 24 pocillos y estimuladas con dos concentraciones de LPS (0,1  $\mu\text{g/ml}$  y 1  $\mu\text{g/ml}$ ) por 24 horas. Los niveles de IL-

12/23p40 en los sobrenadante de los cultivos fueron determinados mediante ELISA. El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una vía seguido por el test de comparación múltiple Tukey. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\*\* $p < 0.01$ ).

## Expresión de marcadores moleculares

A fin de determinar el grado de expresión de marcadores celulares y de activación, realizamos ensayos de citometría de flujo. Debido a que estas células poseen un fenotipo inmaduro utilizamos marcadores específicos de CDs (MHC-II y CD11c), como de macrófagos (F4/80 y CD11b). A su vez, verificamos el grado de activación luego del estímulo con LPS, midiendo la expresión de CD86, y comparamos la misma con la expresión basal. Observamos el fenotipo de CDs inmaduras esperado destacándose la baja expresión de MHC-II y CD11c, y la alta expresión de CD11b. El estímulo con LPS aumentó significativamente la expresión de las moléculas F4/80 y CD86 y levemente, pero alcanzó a ser significativa de CD11b (Fig. 36A y 36B). Estos resultados permiten inferir que la línea de células JAWS II tienen un fenotipo de CDs inmaduras que explicaría su baja secreción de IL-12/23p40.

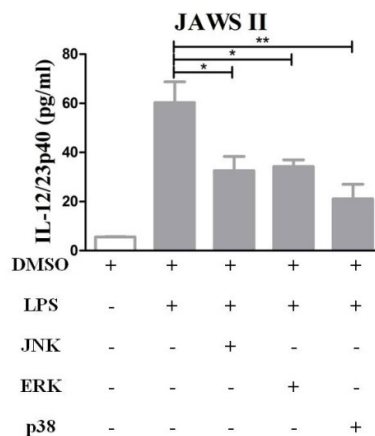


**Fig. 36. Grado de expresión de marcadores moleculares de células JAWS II.** Células JAWS II fueron estimuladas con LPS (1 $\mu$ g/ml) y los niveles de expresión de marcadores celulares y de activación fueron comparadas con su estado basal. Luego las células fueron levantadas y marcadas con CD11b, CD11c, F4/80, CD86 y MHC-II.

Posteriormente, las mismas fueron analizadas mediante citometría de flujo. **A.** Se muestran los histogramas representativos del grado de expresión de los marcadores estudiados, el pico sombreado corresponde al control de isotipo, la línea corresponde al marcador de células positivas y el porcentaje de las mismas se indica en el margen superior derecho de cada gráfico. **B.** Se muestra el análisis estadístico comparativo de cada marcador luego del estímulo con respecto a su nivel basal. El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de dos vías seguido por el test de comparación múltiple Bonferroni. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

## Participación de las vías MAPKs en la producción de IL-12/23p40

A fin de analizar la participación de las vías MAPKs en la producción de IL-12/23p40 por células JAWS II, analizamos los efectos de inhibidores específicos de ERK, JNK y p38 en la secreción de IL-12/23p40 por estas células. Con este propósito, estimulamos células JAWS II con LPS en presencia de los inhibidores. En este ensayo observamos que las vías JNK, ERK y p38 participan en la secreción de IL-12/23p40 por células JAWS II en respuesta a LPS (Fig. 37).

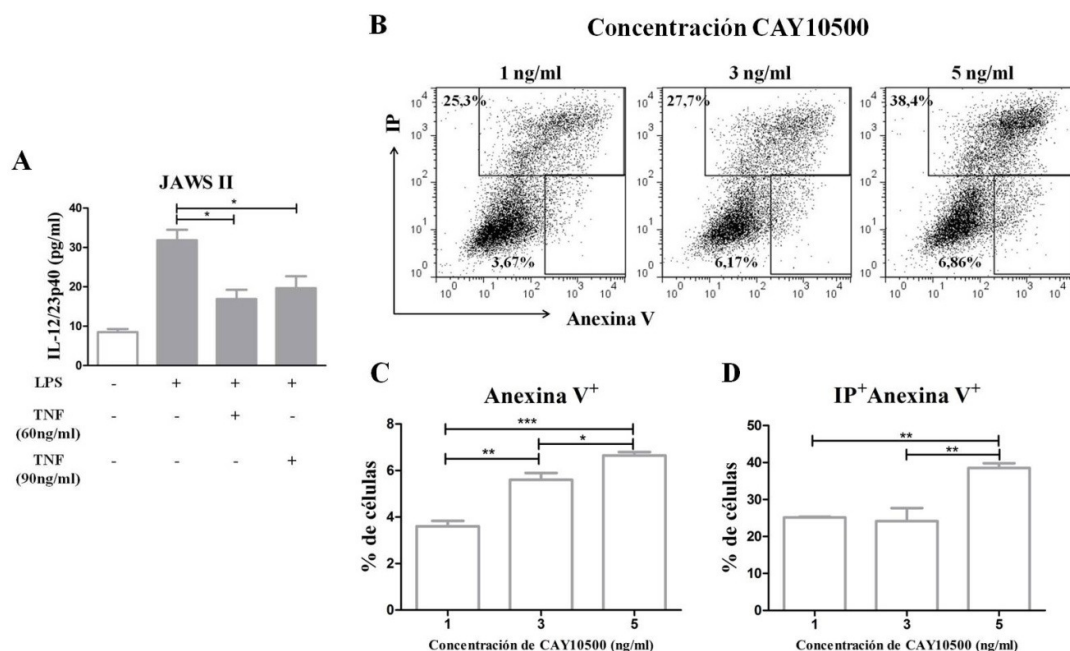


**Fig. 37. Participación de las vías MAPKs en la secreción de IL-12/23p40 por células JAWS II.** Células JAWS II fueron distribuidas en placas de 24 pocillos y estimuladas con LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) por 24 horas en presencia de los inhibidores de MAPKs JNK, ERK y p38. Los Niveles de IL-12/23p40 en los sobrenadante de los cultivos fueron determinados mediante ELISA. El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una vía seguido por el test de comparación múltiple Tukey. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

## Estandarización y optimización de ensayos en células JAWS II

Empleamos células JAWS II para optimizar y estandarizar la concentración de TNFh y del inhibidor CAY10500 a ser empleado en los ensayos descritos en el apartado objetivo 1. Primero, comprobamos que la utilización de TNFh inducía una disminución de IL-12/23p40 en esta línea en una concentración de 60 ng/ml (concentración utilizada en resultados previos, usando células RAW 264.7). Luego ensayamos una concentración más alta (90 ng/ml) ya que estas células expresan menos concentración de IL-12/23p40 que CDs de cultivos primarios, buscando obtener un efecto diferencial bien marcado. En este estudio, obtuvimos una disminución de la secreción de IL-12/23p40 que resultó ser independiente de la concentración de TNFh, por lo cual elegimos la concentración de trabajo a 60 ng/ml (Fig. 38A).

Por otro lado, analizamos el efecto citotóxico del inhibidor específico de TNFRp55 en células JAWS II. Primero estimulamos las mismas con LPS en presencia del inhibidor de la cascada TNFRp55, CAY10500, el que fue ensayado en distintas concentraciones basándonos en estudios realizados en cultivo de RAW 264.7 (1, 3 y 5 ng/ml). Luego de 24 hs, las células fueron marcadas con IP y marcadas para detectar Anexina V para analizar la viabilidad celular. Observamos que a medida que aumenta la concentración del inhibidor CAY10500, aumenta la población anexina V<sup>+</sup>, lo que indica que las células se encuentran en fase de apoptosis temprana (Fig. 38B y 38C). Además, a una concentración 5 ng/ml de CAY10500, las células necróticas (IP<sup>+</sup> Anexina V<sup>+</sup>, dobles positivas) aumentan significativamente a diferencia de las demás concentraciones ensayadas (Fig. 38B y 38D). A partir de este ensayo seleccionamos la concentración de trabajo 1 ng/ml para el inhibidor CAY10500.



**Fig. 38. Optimización de las concentraciones de TNFh y la concentración no citotóxica de CAY10500 en JAWS II.** A. Células JAWS II estimuladas con LPS (1 µg/ml) en presencia de TNFh (60 ó 90 ng/ml) como indica la figura. Los niveles de IL-12/23p40 fueron medidos en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Células JAWS II fueron estimuladas con LPS en presencia del inhibidor CAY10500 en diferentes concentraciones (1, 3 y 5 ng/ml), luego de 24 hs, las células fueron marcadas con Ioduro de propidio (IP) y Anexina V para analizar la viabilidad celular. B. Diagramas de puntos representativos de cada condición ensayada C. Análisis de células en apoptosis temprana (Anexina V<sup>+</sup>) D. Análisis de células necróticas y en apoptosis tardía (células doble positivas). El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una vía seguido por el test de comparación múltiple Tukey. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

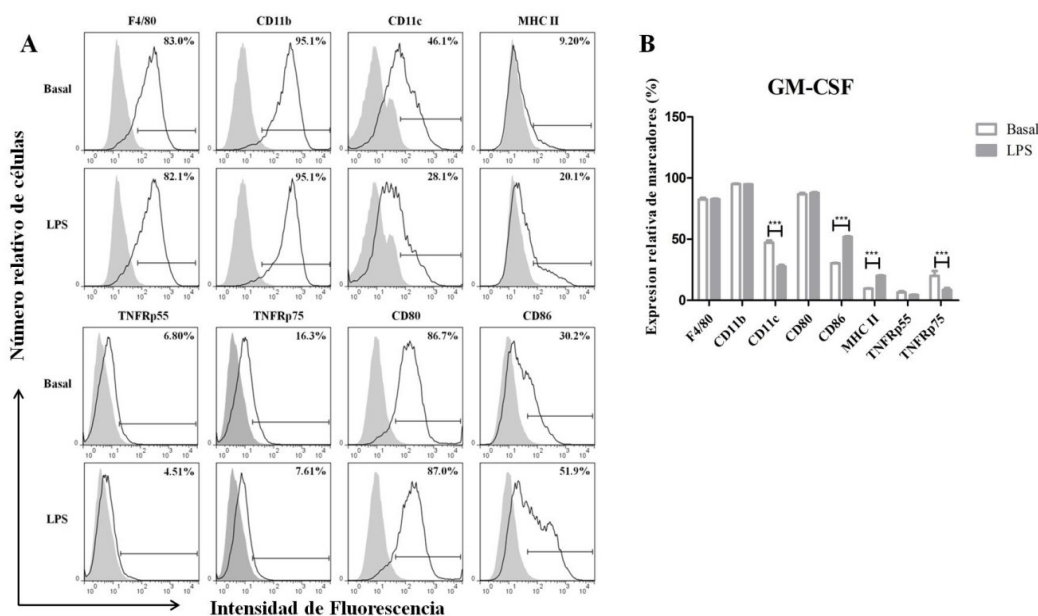
## Modificación de medio de cultivo

Como la línea JAWS II no expresa los marcadores de CDs maduras y a su vez produce una baja concentración de IL-12/23p40, decidimos modificar el medio de cultivo, a fin de obtener células maduras y una producción mayor de IL-12/23p40. Para ello utilizamos el medio de diferenciación de CDs (RPMI) obtenidas de médula ósea que contiene GM-CSF (comercial). Además, probamos medios de cultivo que contenían Flt3L (obtenido de sobrenadantes de medios de cultivo de células B16 transfectadas).

## Análisis de marcadores moleculares

Primero, realizamos un estudio mediante citometría de flujo a fin de determinar la expresión de marcadores de maduración luego de estimular las células CDs con LPS. Comparamos células cultivadas en presencia de GM-CSF o Flt3L y analizamos la expresión de CD11b, CD11c, F4/80, CD86, CD80, MHC-II, TNFRp55 y TNFRp75.

Modificando el medio de cultivo con la presencia de GM-CSF, observamos un aumento en la expresión basal de CD11c, MHC-II y F4/80. Luego del estímulo con LPS, observamos un aumento en la expresión de MHC-II, CD86 y una disminución de CD11c (Fig. 39A y 39B) indicando activación celular. En base a estos ensayos podemos inferir que a diferencia del medio convencional antes descrito, la presencia de GM-CSF en el medio de cultivo favorece la maduración y activación de las células JAWS II en respuesta a LPS (Fig. 36).



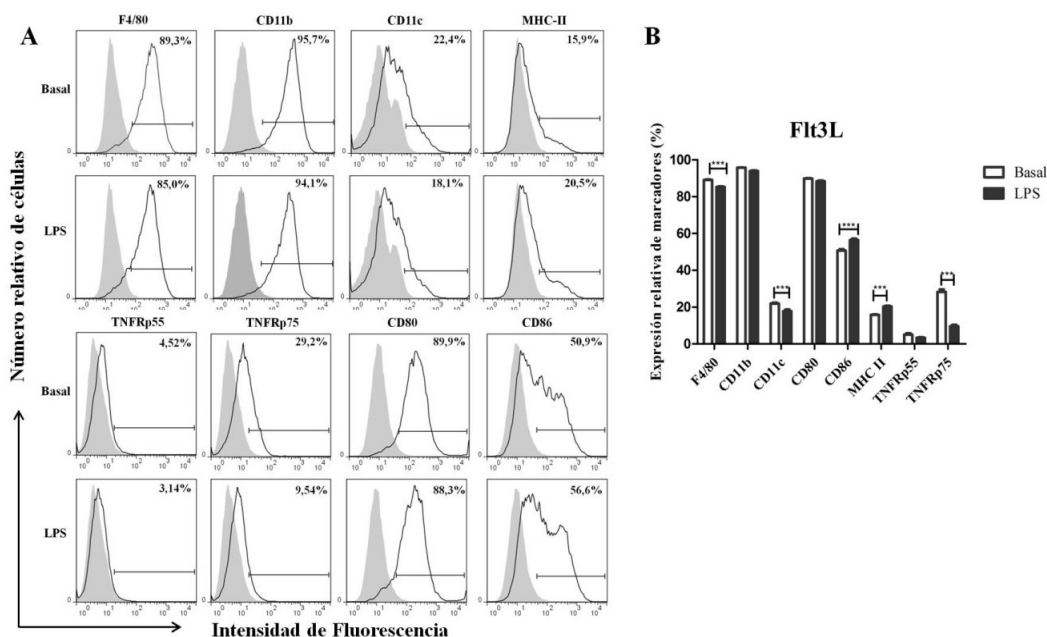
**Fig. 39. Grado de expresión de marcadores de células JAWS II en presencia de GM-CSF en el medio de cultivo.** Células JAWS II fueron cultivadas en medio de cultivo concón el agregado de GM-CSF, y estimuladas con LPS (1 $\mu$ g/ml). Las expresiones de los marcadores F4/80, CD11b, CD11c, MHC-II, TNFRp55, TNFRp75, CD80 y CD86 fueron analizadas por citometría de flujo y comparadas con las expresiones en condiciones basales. **A.** Histogramas representativos del grado de expresión de los marcadores estudiados. Los picos sombreados corresponden a los controles de isotipo, la línea indica células positivas y el porcentaje de las mismas se indica en el margen superior derecho de cada histograma. **B.** Análisis estadístico comparativo entre el estado basal y estimulado.



El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de dos vías seguido por el test de comparación múltiple Bonferroni. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\*\* $p < 0.001$ ).

Del mismo modo, cuando adicionamos el factor Flt3L al medio de cultivo de las células detectamos la maduración y activación de las células JAWS II, ya que las mismas aumentaron la expresión de CD86 y MHC-II, y disminuyeron la expresión de CD11c. Simultáneamente, observamos que las células JAWS II expresan ambos receptores de TNF en un nivel moderado, en presencia de uno u otro factor. Se detectó que la expresión de TNFRp75 disminuye cuando las células se activan por el estímulo con LPS.

En base a estos resultados podemos inferir que la modificación en el medio de cultivo, permite la maduración y activación de células JAWS II.

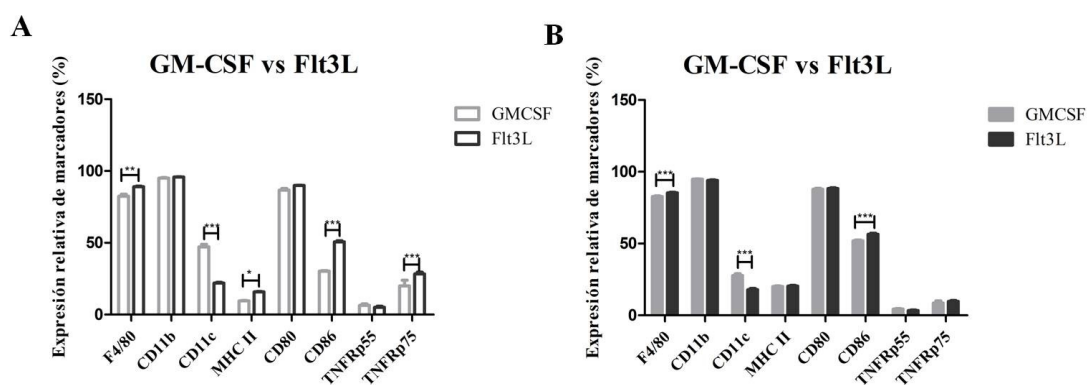


**Fig. 40. Grado de expresión de marcadores de activación de CDs en presencia de Flt3L en el medio de cultivo.**

Células JAWS II fueron cultivadas en medio de cultivo convencional al que se le adicionó Flt3L. Las células fueron estimuladas con LPS (1 $\mu$ g/ml). Las expresiones de los marcadores F4/80, CD11b, CD11c, MHC-II, TNFRp55, TNFRp75, CD80 y CD86 fueron analizados por citometría de flujo y comparadas con las expresiones en estado basal. **A.** Histograma representativo del grado de expresión de los marcadores estudiados, los picos sombreados corresponden al control de isotipo, la línea indica células positivas y el porcentaje de las mismas se indica en el margen superior derecho de cada histograma. **B.** Análisis estadístico comparativo entre el estado basal y estimulado. El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de dos vías seguido por el test de comparación múltiple Bonferroni. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

## Comparación de los efectos de los factores de crecimiento sobre la expresión de marcadores de superficie de células JAWS II

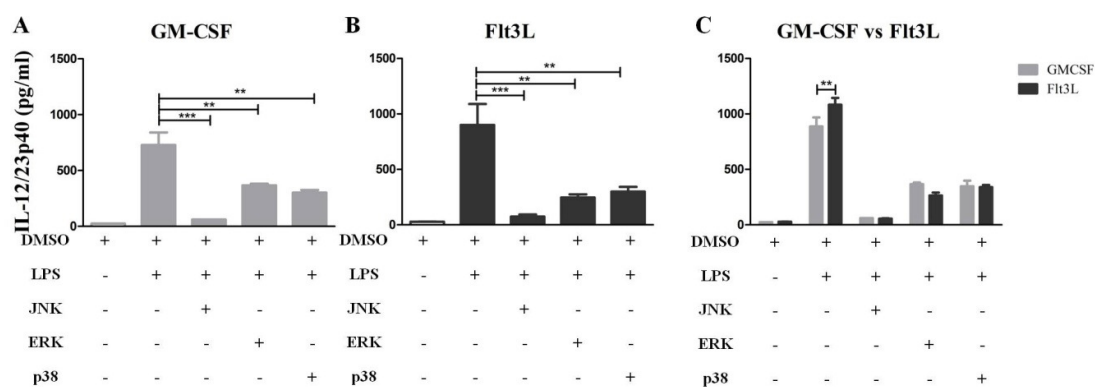
Realizamos un estudio comparativo entre los efectos de del agregado de GM-CSF vs Flt3L sobre el grado de expresión de cada marcador de superficie analizado. Observamos que células JAWS II cultivadas en presencia de Flt3L en estado basal presentan mayor expresión de MHC-II y CD86, y una disminución de CD11c, que las que fueron cultivadas en presencia de GM-CSF (Fig. 41A). Cuando las mismas fueron estimuladas con LPS, se observó una mayor expresión de CD86 y menor de CD11c en presencia de Flt3L (Fig. 41B). Estos resultados indican que en presencia del factor Flt3L las células JAWS II maduran y se activan en estado basal, respondiendo al estímulo con LPS. Podemos concluir que el fenotipo de la línea JAWS II se modifica dependiendo del factor de crecimiento adicionado al medio de cultivo, por lo nos propusimos comparar estos efectos en la secreción de IL-12/23p40 en respuesta a LPS, estudiando además las vías MAPKs y la respuesta a TNFh.



**Fig.41. Comparación de marcadores de superficie de células JAWS II tratadas con distintos factores de crecimiento.** Células JAWS II fueron cultivadas en el medio de cultivo convencional adicionado con GM-CSF o Flt3L. Las células fueron estimuladas con LPS (1µg/ml). Las expresiones de los marcadores F4/80, CD11b, CD11c, MHC-II, TNFRp55, TNFRp75, CD80 y CD86 fueron analizados por citometría de flujo y comparadas con las expresiones a estado basal. **A.** Análisis comparativo de los efectos de GM-CSF vs Flt3L en estado basal **B.** Análisis comparativo entre factores frente al estímulo con LPS. El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de dos vías seguido por el test de comparación múltiple Bonferroni. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (, \*\*\*  $p < 0.001$ ).

## Comparación de los efectos de los factores de crecimiento sobre la producción de IL-12/23p40 por las vías de MAPKs por células JAWS II

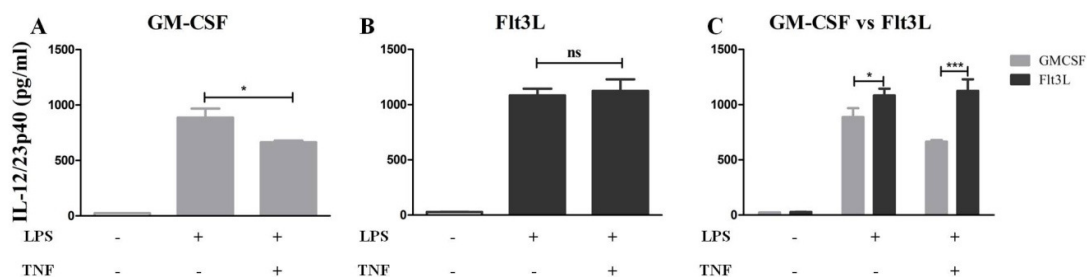
Las células JAWSII fueron cultivadas en presencia de GM-CSF o Flt3L, y estimuladas con LPS en presencia de inhibidores específicos de ERK, JNK y p38, a fin de analizar la participación de las vías MAPKs en los mecanismos de producción de IL-12/23p40. Obtuvimos una alta secreción de IL-12/23p40 por JAWS II cultivadas en los medios de cultivo modificados, comparado a lo obtenido con medio IMDM de un 30-60 pg/ml (Fig. 35 y 37) a una concentración de 750-1000 pg/ml cuando se modificó el medio (Fig. 42 y 43). La presencia de Flt3L indujeron significativamente una mayor secreción de IL-12/23p40 que la presencia de GM-CSF (Fig. 42C). Además, las vías JNK, ERK y p38 mostraron estar involucradas en la producción de IL-12/23p40 por estas células de manera independiente del factor adicionado al medio de cultivo (Fig. 42A y 42B). Por lo expuesto, podemos inferir que el factor Flt3L induce una mayor producción de IL-12/23p40 probablemente debida a la inducción, previamente demostrada, de un mayor grado de maduración de las células.



**Fig.42. Producción de IL-12/23p40 en presencia de inhibidores de MAPKs por células JAWS II tratadas con distintos factores de crecimiento.** Células JAWS II fueron estimuladas con LPS en presencia de los inhibidores MAPKs indicados en la parte inferior del gráfico. Se utilizó LPS (1µg/ml) y 10 µM de cada inhibidor ensayado. Se muestran los efectos de los factores adicionados al medio GM-CSF o Flt3L por separado (A y B, respectivamente) y el estudio comparativo de los efectos de cada factor (C). El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una o dos vías seguido por el test de comparación múltiple Tukey o Bonferroni respectivamente. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

## Comparación de los efectos de los factores de crecimiento sobre el rol regulador de TNFh sobre la producción de IL-12/23p40 por células JAWS II

Para analizar el rol de la señalización TNFRp55 sobre la producción de IL-12/23p40 por células JAWS II en respuesta al estímulo con LPS, cultivamos dichas células en los medios adicionados con GM-CSF o Flt3L y las estimulamos con TNFh. Observamos una respuesta diferencial dependiendo del factor de crecimiento adicionado al medio. Utilizando el factor GM-CSF se detectó que la presencia de TNFh provoca una disminución significativa en la producción de IL-12/23p40 por LPS. Este resultado coincide con los resultados obtenidos previamente. Sin embargo, el factor Flt3L en el medio de cultivo, no permite detectar el efecto regulador de TNFh. En base a estos resultados concluimos que las condiciones de cultivo de la línea JAWS II impactan en la respuesta de las mismas, y que los resultados alcanzados con el agregado del factor GM-CSF en el medio de cultivo se asemeja a los resultados previos obtenidos en nuestro modelo.



**Fig. 43. Efectos de los factores GM-CSF o Flt3L sobre el rol regulador de TNFh en la producción de IL-12/23p40 por células JAWS II.** Células JAWSII cultivadas en medios con GM-CSF o Flt3L, estimuladas con LPS solo o en presencia de TNFh. Se midieron los niveles de IL-12/23p40 secretados en los sobrenadantes de los cultivos, y realizó un estudio comparativo de los efectos de cada factor en el medio de cultivo. **A.** Niveles de IL-12/23p40 en medios con GM-CSF **B.** Niveles de IL-12/23p40 en medios con Flt3L **C.** Análisis comparativo de la secreción de IL-12/23p40 en medios con GM-CSF or Flt3L. El análisis estadístico fue llevado a cabo con ANOVA de una o dos vías seguido por el test de comparación múltiple Tukey y Bonferroni respectivamente. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ns: no significativo).

En conclusión, los ensayos descritos permitieron caracterizar la línea JAWS II y optimizar su medio de cultivo para ser empleada en estudios que permitan profundizar los mecanismos moleculares de la desregulación de IL-12/23p40 en condiciones de deficiencia de TNFRp55.

*Discusión*

## IL-12/23p40 blanco de desregulación

Previamente destacamos que la subunidad p40 integra a la citoquina IL-12 que participa en la diferenciación de linfocitos T colaboradores a Th1 productores de IFN- $\gamma$ , como a IL-23 que participa en el mantenimiento de linfocitos Th17 productores de IL-17A [111]. En numerosas enfermedades inmunopatogénicas, se han detectado altos niveles de IL-17 e IFN- $\gamma$ , como psoriasis, artritis psoriásica, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn y ARe [163]. En estudios previos, hemos demostrado un incremento significativo en los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-17 en articulación de ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>*, con incremento de p40, IL-12p70 e IL-23p19 comparado con ratones WT, sugiriendo que p40 podría ser el blanco de la desregulación en condiciones de deficiencia de TNFRp55 [135]. Recientemente hemos demostrado que este microambiente inflamatorio modula, además, la respuesta de células T regulatorias [136].

En el presente trabajo, encontramos que células esplénicas obtenidas de ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* en el inicio de ARe (14 días post-infección) fueron incapaces de controlar las secreciones de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a LPS. Estos hallazgos son análogos a los obtenidos por estudios *in vitro* de otros autores, en los cuales demostraron a la señalización mediada por TNFRp55 como el principal receptor implicado en la regulación de IL-12/23p40 [149, 164]. Además, en concordancia con estos autores, hemos detectado que esplenocitos WT obtenidos a 14 días post-infección con Ye, luego de un re-estímulo mediante LPS, fueron más susceptibles al mantenimiento de la regulación de IL-12/23p40 que su respectivo control (PBS) [149].

En relación con la función conocida de IL-12 de promover el fenotipo efector de linfocitos Th1 productores de IFN- $\gamma$ , encontramos una clara asociación entre los aumentos significativos en la producción de IL-12/23p40 e IFN- $\gamma$  por esplenocitos obtenidos de ratones de *TNFRp55<sup>-/-</sup>* luego de 14 días post-infección. En contraste, no detectamos una conexión directa entre la producción de IL-12/23p40 e IL-17. Sin embargo, observamos una cantidad considerable de IL-17 secretada por esplenocitos WT y *TNFRp55<sup>-/-</sup>* infectados en respuesta al LPS. Estos resultados podrían deberse a que la diferenciación Th17 es influenciada no sólo por IL-23, sino también por las

citoquinas TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-21, que participan en la inducción (TGF- $\beta$  e IL-6) o amplificación (IL-21) de este perfil [165].

Como agente anti-inflamatorio, el TNF puede limitar directamente las respuestas mediadas por células T induciendo apoptosis o indirectamente a través de la regulación de IL-12. Además, en la inmunoterapia de cáncer se ha observado desde hace tiempo que la administración repetida de IL-12 recombinante podría contribuir al aumento de las propiedades inmunosupresoras del tumor mediante la inducción de IL-10. A pesar de desconocerse el mecanismo molecular subyacente para la retroalimentación negativa, el hallazgo que IL-12 es capaz de inducir potentemente su propio inhibidor apoya el concepto que el sistema inmune está intrínsecamente equipado con mecanismos de retroalimentación negativos intrínsecos que limitan la activación continua de las células T [148]. En relación a este concepto, encontramos que esplenocitos obtenidos de ratones deficientes en IL-10, luego de un estímulo con LPS, producen una mayor cantidad de IL-12/23p40 que ratones deficientes en TNFRp55, por lo cual inferimos una posible conexión entre ambas citoquinas en nuestro modelo experimental.

### **Células dendríticas: rol central en la inmunopatogenia de ARe**

Las CDs son las más efectivas, entre las CPA, en servir de nexo entre la inmunidad innata y adaptativa. Las mismas se encuentran estratégicamente ubicadas en los tejidos para poder tomar con facilidad los antígenos [126]. Se han realizado numerosas investigaciones con el fin de dilucidar la función de CDs en artropatías como la artritis reumatoide, sin embargo actualmente no se conoce la relación CDs-ARe [166].

Diferentes estudios sobre la patogenia de Ye han demostrado que la bacteria puede modular funciones específicas de las CDs, tales como la maduración [167], la captación antigénica [168], el procesamiento [169] y la activación inducida por estas células de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> [167]. Asimismo, algunos factores de virulencia de Ye como YopP pueden inhibir *in vivo* la capacidad de las CDs de actuar como CPA frente a linfocitos T CD8<sup>+</sup> [170], como también YopP puede inducir apoptosis de CDs por mecanismos tanto dependientes como independientes de caspasas [171].



Evidencias en modelos animales implican a CDs en la patogénesis de las ESpA, un grupo de artropatías inflamatorias que incluye la ARe. Se ha demostrado que IL-23 media la entesitis, una característica distintiva de la enfermedad tipo ESpA, y que dicha citoquina es producida por la población CD11b<sup>+</sup>, que incluye macrófagos y CDs [172]. En nuestro estudio, detectamos que la deficiencia en TNFRp55 no afectó el número absoluto de CDs en bazo, pero sí la frecuencia de CDs IL-12/23p40<sup>+</sup>, la cual fue detectada mediante citometría de flujo. Estos resultados evidencian que CDs serían la principal fuente de sobreproducción de IL-12/23p40 encontrada en esplenocitos obtenidos de ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup> en los inicios de la ARe.

En trabajos previos, hemos demostrado que ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup>, después de la infección Ye, son más susceptibles y desarrollan inflamación articular más severa y con tendencia a la cronicidad en comparación a los ratones WT [133]. A su vez, la sobrevivencia de los ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup> luego de la infección oral fue del 60%, mientras que no hubo mortalidad en los ratones WT. También encontramos un aumento en los niveles de IL-12/23p40, IL-12p70 e IL-23 en los ganglios linfáticos que drenan a la articulación, lo cual proporcionó una explicación racional de la desviación de la respuesta Th a los perfiles Th1 y Th17 [135, 136].

En nuestro modelo de expansión *in vivo*, demostramos que CDs *TNFRp55*<sup>-/-</sup> aisladas de bazo secretaron una mayor cantidad de IL-12/23p40 que las correspondientes CDs WT, favoreciendo la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> hacia los fenotipos Th1 y Th17, evidenciados por los aumentos de IFN- $\gamma$  e IL-17A, respectivamente, determinados por citometría de flujo y ELISA. En concordancia, otros autores han encontrado niveles elevados de IL-17, IFN- $\gamma$  e IL-12/23p40 en fluidos sinoviales de pacientes con ARe/ESpA en comparación con aquellos con osteoartritis [173]. Además, se ha informado que el perfil Th17 es expandido e inducido por CDs en ratas transgénicas HLA-B27 propensas a ESpA [174]. Por lo tanto, la sobreproducción de IL-12/23p40 podría ser un mecanismo utilizado por las CDs para dirigir el perfil de linfocitos T hacia fenotipos patogénicos en nuestro modelo de ARe en ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup>.

## Vías MAPKs involucradas en la producción de IL-12/23p40

Las MAPK en mamíferos incluyen JNK, p38 MAPK y ERK. Estas enzimas son proteínas serina-treonina quinasas que regulan diversas actividades celulares como proliferación, diferenciación, apoptosis, supervivencia, inflamación e inmunidad innata [175].

Las MAPK desempeñan un papel importante en la transducción de señales de la inflamación y en la destrucción de las articulaciones y, por lo tanto, son objetivos moleculares claves para la intervención terapéutica en enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoidea. A su vez, algunos reportes destacan que tanto JNK [176] como p38 [177] están implicadas en la destrucción del cartílago en artritis reumatoidea, ya que las mismas se encuentran implicadas en la regulación de metaloproteinasas y citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-6. Sin embargo, al haber múltiples isoformas de estas quinasas (ERK1-8, JNK1-3 y p38- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$  y - $\delta$ ) implicadas en la regulación de una diversidad de respuestas celulares esenciales, la utilización de inhibidores que simplemente eliminan las actividades ERK, JNK o p38 MAPK probablemente tengan efectos secundarios graves [178].

En nuestro modelo experimental, se detectó una reducción considerable en la producción de IL-12/23p40 en esplenocitos estimulados con LPS en los tres grupos de ratones: WT, *TNFRp55*<sup>-/-</sup> e *IL-10*<sup>-/-</sup>. Al utilizar inhibidores específicos de JNK o p38 en esplenocitos obtenidos de ratones control (no infectados), observamos que la producción de IL-12/23p40 en ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup> se redujo significativamente alcanzando niveles de secreción similares a esplenocitos WT. En contraste con los esplenocitos no infectados, esplenocitos obtenidos luego de 14 días post-infección, secretaron niveles tan elevados de IL-12/23p40 en condiciones de deficiencia en TNFRp55, que los inhibidores de MAPKs no provocaron una reducción de IL-12/23p40 para alcanzar los niveles secretados por esplenocitos WT. Además, CDs obtenidas luego de su expansión *in vivo*, y tratadas con el inhibidor de JNK, mostraron una disminución en la producción de IL-12/23p40. Estos hallazgos indican que JNK podría participar en la sobre-producción de IL-12/23p40 encontrada bajo condiciones de deficiencia en TNFRp55. Simultáneamente, encontramos que la vía p38 también estaría implicada en la producción de IL-12/23p40 pero en tiempos tardíos.

Asimismo, teniendo en cuenta que TNFh ha demostrado interactuar específicamente con TNFRp55 de ratón [155], y que la presencia del mismo provocó disminución significativa de IL-12/23p40 en CDs aisladas estimuladas con LPS, corroboramos nuevamente en estos experimentos el efecto regulador de la señalización TNFRp55 sobre la producción de IL-12/23p40.

Resultados similares fueron obtenidos cuando se utilizó la línea celular JAWS II. Debido a que la obtención de CDs a partir de nuestro modelo de expansión requiere mayor tiempo, consideramos que el empleo de esta línea celular ayudaría a dilucidar los mecanismos moleculares implicados en la regulación de IL-12/23p40 mediada por TNFRp55.

### **Inhibidores específicos de TNF**

En nuestro trabajo, como explicamos anteriormente, utilizamos la proteína quimérica etanercept construida genéticamente por fusión del dominio extracelular soluble del receptor-2 del TNF humano (TNFR2/p75) con el dominio Fc de la IgG1 humana [158]. Esta quimera inhibe el TNF secretado por la célula impidiendo su unión a los dos receptores específicos. Para conocer la implicancia de TNFRp55 en la regulación de IL-12/23p40, utilizamos el inhibidor CAY10500, el cual se une a TNF e impide la unión a TNFRp55 específicamente [159].

En este estudio, se observó que etanercept redujo la secreción de IL-12/23p40 en CDs, aisladas de nuestro modelo de expansión provenientes de ratones WT y *TNFRp55*<sup>-/-</sup>, y estimuladas con LPS, lo que sugiere que TNFRp75, pero no TNFRp55, participa en la producción de IL-12/23p40 en nuestras condiciones experimentales. En contraste, una inhibición específica de la señalización TNFRp55 utilizando CAY, evitó el efecto regulador de TNFh en la producción de IL-12/23p40 en CDs WT estimuladas con LPS. Por lo tanto, los datos apoyan firmemente el papel de la ruta TNFRp55 en mantener IL-12/23p40 bajo control.

Interleucina-10 es una citoquina clave en la regulación de la respuesta inmune. Una respuesta inmune adecuada frente a potenciales patógenos implica una regulación de la cinética y los niveles de IL-10, lo que permite la defensa frente a los mismos, antes que ocurra la supresión de la respuesta protectora para prevenir la inflamación crónica

[179]. Además, esta citoquina es necesaria para la regulación de la respuesta inmune de tipo Th1 y Th17 [180, 181].

En este estudio, en CD<sub>s</sub> WT aisladas estimuladas con LPS, la presencia de TNF $\alpha$  provocó niveles elevados de IL-10, y bajos de IL-12/23p40. Estos cambios fueron revertidos utilizando CAY. Estos resultados apoyaron la participación de IL-10 como un regulador negativo de la secreción de IL-12, como ha sido reportado [159]. Sin embargo, no podríamos excluir a otros mecanismos independientes de IL-10 que podrían estar participando en el efecto regulador de TNF $\alpha$  a través de TNFRp55, como se ha sido sugerido por otros autores [182]. En base a los resultados obtenidos sugerimos un rol central de CD<sub>s</sub> mediado por TNFRp55 en el control de ARe inducida por Ye.

### Subtipos de CD<sub>s</sub>

Las CD<sub>s</sub> surgen de los precursores comunes de monocitos en la médula ósea, los cuales se diferencian en progenitores de monocitos comunes o precursores comunes de CD<sub>s</sub> (CDP). Los CDP pueden dar lugar a pCD<sub>s</sub> (CD<sub>s</sub> plasmocitoides) o pre-CD<sub>s</sub> que muestran heterogeneidad considerable por lo que se las clasifica en CD<sub>s</sub> CD8<sup>+</sup>, CD<sub>s</sub> CD4<sup>+</sup>, CD<sub>s</sub> CD8<sup>+</sup>CXCR1<sup>+</sup> y CD<sub>s</sub> CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>. Estas difieren considerablemente en la ontogenia, la localización, el patrón de secreción de citoquinas y la función inmunológica [183].

En el bazo las CD<sub>s</sub> representan cerca de un 2% del total, e incluyen diferentes subtipos. Las es El subconjunto principal de CD<sub>s</sub> en el bazo es el de CD<sub>s</sub> convencionales (CDc), clasificado adicionalmente en los subtipos CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> y CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>. Estos subtipos poseen diferencias en otros marcadores fenotípicos. Así, las CDc CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> son CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>, mientras que las CDc CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> son CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>MHC-II<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>. Estos subtipos de CD<sub>s</sub> difieren en la función inmune, la producción de citoquinas y la capacidad de presentación cruzada de antígenos. Se ha propuesto que las CDc CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> desempeñan un papel en el mantenimiento de la tolerancia a los autoantígenos, en correspondencia con su proximidad a las células T en estado de reposo y su notable capacidad de presentación cruzada. Asimismo, las CDc CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> producen predominantemente IL-12 e IFN- $\alpha$ , citoquinas importantes para la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> [184]. Por el contrario,

las CDc CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> tienen una capacidad de presentación cruzada más débil y se localizan principalmente en la zona marginal del bazo. Frente a la estimulación con LPS, las CDc CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> migran a las áreas de células T, secretan quimiocinas inflamatorias e IFN- $\gamma$ . Sin embargo, el papel principal de CDc CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> sigue sin estar claro [185].

Por otro lado, algunos reportes han demostrado que la utilización de Flt3L produce una expansión selectiva de CDc CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, mientras que GM-CSF produce una expansión selectiva de CDc CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>. Paralelamente, en este trabajo se comparó la utilización de Flt3L recombinante de origen humano con el de ratón, observándose que Flt3L humano induce un mayor aumento de CDc y sus subpoblaciones no se ven modificadas, a diferencia de las Flt3L recombinante de ratón que induce un aumento de CD11c CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> específicamente [157].

En nuestro trabajo, utilizamos un modelo de expansión mediante la inyección de células B16 de melanoma que expresan constitutivamente Flt3L humano. Realizamos una comparación entre células obtenidas de ratones control (que recibieron diluyente), y tratados con células B16 transfectadas y sin transfectar, para verificar nuestros resultados. No encontramos diferencias en las subpoblaciones de CDc, incluso utilizando ratones *TNFRp55*<sup>-/-</sup>. Por otra parte, en nuestros experimentos utilizamos el método de enriquecimiento mediante perlas magnéticas anti-CD11c para aislar CDc. De esta forma, nuestras observaciones muestran los efectos de la suma de ambas subpoblaciones, (CDc CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> que producen IL-12 y las CDc CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> que secretan IFN- $\gamma$ ).

Otros trabajos relacionados con Ye, demostraron que la infección no impacta de la misma manera en los distintos subgrupos de CDc de bazo. Se afecta de manera diferente la captación y procesamiento del antígeno, la expresión de moléculas MHC-II y de moléculas co-estimuladoras resultando en una menor activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> necesarios en la respuesta inmune protectora frente a Ye [150]. Como perspectiva futura, se planea realizar estudios analizando la participación de las subpoblaciones de CDc de bazo en ARe, aunque en base a los resultados, las células CDc CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> estarían especialmente involucradas en nuestros resultados por ser la subpoblación productora de IL-12 [31].

El GM-CSF media diversas señales en la proliferación y supervivencia celular, especialmente en células hematopoyéticas. GM-CSF ayuda a formar colonias progenitoras hematopoyéticas que pueden diferenciarse en granulocitos o macrófagos. Recientemente se ha reportado en experimentos para diferenciar CD a partir de médula ósea, la presencia de dos poblaciones principales diferenciadas por el grado de expresión de MHC-II y F4/80. Estas poblaciones incluyen las células denominadas o GM-BMM que expresan MHC-II<sup>low</sup>F4/80<sup>high</sup>, con fenotipo CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>high</sup>CD80<sup>-</sup>CD64<sup>+</sup> MerTK<sup>+</sup>, y las células denominadas GM-BMDC que expresan MHCII<sup>high</sup>F4/80<sup>low</sup> con el fenotipo CD11c<sup>high</sup>CD8α<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup>CD64<sup>-</sup>MerTK<sup>low</sup>. Curiosamente se observó que la población de GM-BMM aumentó y la de GM-BMDC disminuyó en una forma dependiente de la dosis de GM-CSF. Funcionalmente, las células GM-BMM mostraron habilidades fagocíticas extremadamente altas y mostraron una mayor producción de IL-10 tras la estimulación con LPS. En cambio, las células GM-BMDC no exhibieron capacidad fagocítica, pero fueron eficientes en la producción de TNF, IL-1β, IL-12p70 e IL-6, así como en la inducción de proliferación de células T. Finalmente, el análisis de transcriptoma completo, reveló que GM-BMM y GM-BMDC se superponen con macrófagos residuales *in vivo* y células dendríticas, respectivamente. El uso de poblaciones mixtas en entornos experimentales es común; sin embargo, es deseable aumentar la pureza de las poblaciones de interés tanto como sea posible. Este estudio podría proporcionar información importante para los investigadores que usan células derivados de la médula ósea [186].

Estos nuevos hallazgos reportados podrían permitirnos explicar la diferencia encontrada entre CDs obtenidas mediante nuestro modelo de expansión y las obtenidas mediante diferenciación a partir de médula ósea. Por lo tanto, la mayor cantidad de IL-12/23p40 secretada, luego de un estímulo con LPS por CDs diferenciadas de médula ósea WT, podría ser potenciada por macrófagos o mediante una comunicación entre las células. Esto nos lleva a elegir un método de enriquecimiento en CDs diferente, ya que ambas poblaciones definidas presentan expresión de CD11c, para poder realizar un estudio más profundo sobre las poblaciones de CDs y macrófagos en este órgano.

De acuerdo con estos resultados, Ghosn E y col han reportado que en peritoneo el fenotipo entre CDs y macrófagos es similar, ambos expresan F4/80, CD11b y MHC-II en diferente niveles [187]. Además, Kojima, N. y col basados en la expresión de CD11c, describen la posibilidad de que macrófagos residentes frente a un estímulo

específico se diferencien a CDs maduras, conduciendo a la iniciación de respuestas inmunes específicas [188]. Nuestros experimentos sobre la cinética de las poblaciones de peritoneo luego del estímulo con tioglicolato, muestran un aumento en la población de CDs pero no la suficiente para posteriores estudios. Este resultado nos llevó a estandarizar un modelo de expansión de CD *in vivo* que nos permitió conocer las diferencias en el grado de expresión de CD11c en ambos tipos celulares (datos no mostrados). El método de enriquecimiento empleado en el presente trabajo no nos permitiría purificar CDs maduras específicamente. A pesar de las limitaciones en cantidad de CD, el peritoneo puede representar un modelo para estandarizar un método de enriquecimiento efectivo en CD por la fácil obtención y alto rendimiento de células peritoneales.

## **JAWS II como modelo experimental**

Las células JAWSII son células derivadas de médula ósea que se aislaron de ratones C57BL6 deficientes en p53. Estas células pueden sobrevivir en cultivos un largo plazo en presencia de GM-CSF. Expresan marcadores de superficie asociados tanto a macrófagos como a CD. Frente a estímulos con LPS, estas células aumentan la expresión de MHC-II y CD80, secretando citoquinas pro-inflamatorias [160]. La línea JAWS II ha sido utilizada como modelo para ensayos de inmuno-modulación [189], tratamientos anti-tumorales [190] y ha sido muy utilizada para conocer el rol de CD en la inmunidad específica contra patógenos [162, 191].

En nuestros primeros experimentos utilizamos el protocolo sugerido por ATCC (las siglas del inglés *American Type Culture Collection*) para el cultivo de esta línea celular: medio IMDM [191], 4 mM glutamina, 1 mM piruvato de sodio, 10 % SFB y 5 ng/ml GM-CSF. Cuando analizamos los cultivos, encontramos un perfil inmaduro de CD, que se correspondía con lo reportado, expresión elevada de F4/80 y CD11b, y una baja expresión de MHC-II, CD11c y moléculas co-estimuladoras [189].

Luego de la estimulación de las células JAWSII con LPS (2 µg/ml), algunos autores observaron una producción elevada de IL-1β, IL-6 y TNF pero sin aumento en los niveles de marcadores de superficie como MHC y moléculas co-estimuladoras. En estas mismas condiciones no encontraron producción de IL-12, IL-10 e IFN-γ [161]. En

cambio, otros autores utilizando un estímulo con LPS (1µg/ml) detectaron un aumento en la expresión de moléculas MHC-II y co-estimuladoras, con secreción de IL-12 e IL-10 [162]. Además, se ha observado que estimulando las células con *Vibrio cholerae* se indujo la secreción de IL-15, IL-23 e IFN- $\gamma$  [191]. El estímulo con glucocorticoides aumentó la expresión de IL-10 [192]. En nuestros experimentos utilizando como estímulo LPS (1µg/ml) no observamos un cambio en los niveles de expresión de marcadores de activación o maduración. Asimismo, la producción de IL-12/23p40 resultó muy escasa comparada con la obtenida en CD aisladas a partir del modelo de expansión *in vivo*.

En la bibliografía encontramos que células JAWSII también han sido cultivadas en otros medios como: RPMI-1640 con glutamax [189], IMDM [191], RPMI-1640 [161],  $\alpha$ -MEM [193], DMEM [194] y una proporción 1:1 de medio  $\alpha$ -MEM y RPMI-1640 [190]. Los diferentes medios utilizados no modificaron el crecimiento de las JAWS II. Por lo tanto, nos propusimos cambiar el medio de cultivo por medio RPMI 1640, utilizando GM-CSF o Flt3L como factor de crecimiento. Con esta modificación encontramos que las células JAWS II expresaban marcadores de maduración y activación, y receptores de TNF (TNFRp55 y TNFRp75) luego del estímulo con LPS. En concordancia con nuestro propósito de establecer modelo *in vitro* para el estudio de la regulación de TNF sobre IL-12/23p40, observamos niveles mayores de IL-12/23p40 que los encontrados en los primeros experimentos realizados con la misma línea celular.

Por otro lado, detectamos que la producción de IL-12/23p40 disminuyó utilizando los inhibidores específicos de las MAPKs JNK, p38 y ERK. La utilización de TNFh sobre las células JAWS II indujo una regulación en la secreción de IL-12/23p40, sólo cuando utilizamos el medio con GM-CSF como factor de crecimiento. Como se ha demostrado que la generación de CDs depende de GM-CSF durante artritis inflamatoria aguda o en peritonitis inducida por antígeno [46,47], el cultivo de células JAWS II en presencia de GM-CSF, podría extrapolar *in vitro* un fenotipo de CD presente durante el desarrollo de ARe *in vivo*.

Considerando estas observaciones podemos concluir que en este trabajo estandarizamos las condiciones necesarias para obtener un modelo celular (JAWS II) que nos permitirá tener un conocimiento más profundo en la vía implicada en la regulación de IL-12/23p40 mediada por TNFRp55. Asimismo, debido a que la



utilización de distintos factores de crecimiento puede llevar a diferentes respuestas y fenotipos de CD, las diferencias encontradas en la línea celular utilizando los factores GM-CSF o Flt3L proporcionarían una herramienta apropiada para el estudio de CD en diferentes modelos experimentales, según el fenotipo encontrado.

En resumen, los resultados presentados en este trabajo apoyan la hipótesis que las CD son células esenciales en el escenario inmunopatogénico de ARe inducida por Ye en ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>*. Un mecanismo de su participación en dicho proceso es la sobreproducción de IL-12/23p40, lo que conduce a los programas Th1 y Th17. La función anti-inflamatoria de la ruta TNF/TNFRp55 en CD podría contribuir a la protección contra ARe durante la resolución de la infección bacteriana. Además, posibles blancos a este circuito regulador podrían representar una opción para controlar la artritis crónica.

*Conclusiones*

A partir de la hipótesis planteada en esta tesis doctoral y del trabajo de investigación desarrollado en base a los objetivos propuestos se pudo concluir que:

- ❖ Mediante el estudio a nivel sistémico, esplenocitos obtenidos de ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* luego del inicio de la artritis (día 14 post-infección con Ye) fueron más susceptibles a una respuesta inflamatoria que esplenocitos obtenidos de los ratones WT, demostrado por la secreción de niveles elevados de IL-12/23p40, IFN- $\gamma$  e IL-17A.
- ❖ A diferencia de esplenocitos *TNFRp55<sup>-/-</sup>*, esplenocitos provenientes de ratones WT infectados con Ye presentaron una respuesta más regulada que sus correspondientes controles en respuesta al estímulo con LPS. Esto permitió demostrar la participación de IL-10 en la regulación mediada por TNFRp55.
- ❖ Las CDs representaron una fuente importante en la producción de IL-12/23p40, en ratones *TNFRp55<sup>-/-</sup>* infectados demostrada por la mayor frecuencia en CD IL-12/23p40<sup>+</sup>.
- ❖ Dentro de las vías MAPKs, JNK podría mediar la sobre-producción de IL-12/23p40 en condiciones de deficiencia en TNFRp55. En menor medida p38 podría estar implicada en tiempos tardíos.
- ❖ El método estandarizado de expansión de CDs *in vivo* resultó adecuado para obtener y purificar CDs con un alto rendimiento en ambos grupos de ratones.

- ❖ CD<sub>s</sub> *TNFRp55*<sup>-/-</sup> aisladas mediante el método de expansión, produjeron mayores niveles de IL-12/23p40 frente al estímulo *in vitro* con Ye, las cuales, mediante co-cultivo con linfocitos T CD4<sup>+</sup>, promovieron los programas Th1 y Th17.
- ❖ El inhibidor de ambos receptores de TNF (Etanercept) redujo la secreción de IL-12/23p40 tanto en CD<sub>s</sub> WT como *TNFRp55*<sup>-/-</sup> estimuladas con LPS, lo que sugiere que el segundo receptor de TNF, TNFRp75, participa en la producción de IL-12/23p40 en las condiciones experimentales utilizadas.
- ❖ TNFh ejerció un efecto regulador sobre la secreción de IL-12/23p40 en CD WT estimuladas con LPS, y un efecto inductor de IL-10. Estos efectos no se observaron en CD *TNFRp55*<sup>-/-</sup>. Esta conclusión se corroboró con la utilización del inhibidor específico de la ruta TNF-TNFRp55 (CAY10500) el cual bloqueó el efecto regulador de TNFh sobre IL-12/23p40.
- ❖ Se caracterizaron y estandarizaron las condiciones necesarias para el cultivo de la línea celular JAWS II, las cuales permitirán realizar un estudio molecular más profundo relacionado con la regulación de IL-12/23p40
- ❖ Los resultados experimentales contribuyen al conocimiento de un circuito anti-inflamatorio mediado por TNFRp55 en CD en el modelo experimental planteado en este trabajo. Estas células pueden considerarse como un nuevo blanco en el tratamiento de ARE.

*Referencias  
Bibliográficas*

1. Carter, J.D. and A.P. Hudson, *Reactive arthritis: clinical aspects and medical management*. Rheum Dis Clin North Am, 2009. **35**(1): p. 21-44.
2. Sieper, J., J. Braun, and G.H. Kingsley, *Report on the Fourth International Workshop on Reactive Arthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(4): p. 720-34.
3. Misra, R. and L. Gupta, *Epidemiology: Time to revisit the concept of reactive arthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2017. **13**(6): p. 327-328.
4. Schmitt, S.K., *Reactive Arthritis*. Infect Dis Clin North Am, 2017. **31**(2): p. 265-277.
5. Selmi, C. and M.E. Gershwin, *Diagnosis and classification of reactive arthritis*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(4-5): p. 546-9.
6. Rihl, M., et al., *Infection and musculoskeletal conditions: Reactive arthritis*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2006. **20**(6): p. 1119-37.
7. Colmegna, I., R. Cuchacovich, and L.R. Espinoza, *HLA-B27-associated reactive arthritis: pathogenetic and clinical considerations*. Clin Microbiol Rev, 2004. **17**(2): p. 348-69.
8. Sieper, J., *Pathogenesis of reactive arthritis*. Curr Rheumatol Rep, 2001. **3**(5): p. 412-8.
9. Kim, P.S., T.L. Klausmeier, and D.P. Orr, *Reactive arthritis: a review*. J Adolesc Health, 2009. **44**(4): p. 309-15.
10. Brakenhoff, L.K., et al., *The joint—gut axis in inflammatory bowel diseases*. Journal of Crohn's and Colitis, 2010. **4**(3): p. 257-268.
11. Stavropoulos, P.G., et al., *Reactive arthritis*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2015. **29**(3): p. 415-24.
12. Morris, D. and R.D. Inman, *Reactive arthritis: developments and challenges in diagnosis and treatment*. Curr Rheumatol Rep, 2012. **14**(5): p. 390-4.
13. Barber, C.E., et al., *Antibiotics for treatment of reactive arthritis: a systematic review and metaanalysis*. J Rheumatol, 2013. **40**(6): p. 916-28.
14. Brinster, A., et al., *Anti-TNF treatment of reactive arthritis. A monocentric experience*. Joint Bone Spine, 2017. **84**(2): p. 237-238.
15. Sibia, J. and F.X. Limbach, *Reactive arthritis or chronic infectious arthritis?* Ann Rheum Dis, 2002. **61**(7): p. 580-7.
16. Bottone, E.J., *Yersinia enterocolitica: the charisma continues*. Clinical microbiology reviews, 1997. **10**(2): p. 257-276.

17. Pfaller, M.A. and J.H. Jorgensen, *Manual of clinical microbiology*. 2015, ASM press.
18. Reuter, S., et al., *Parallel independent evolution of pathogenicity within the genus Yersinia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(18): p. 6768-6773.
19. Tobback, E., et al., *Yersinia ruckeri infections in salmonid fish*. Journal of fish diseases, 2007. **30**(5): p. 257-268.
20. Hurst, M.R., et al., *The main virulence determinant of Yersinia entomophaga MH96 is a broad-host-range toxin complex active against insects*. Journal of bacteriology, 2011. **193**(8): p. 1966-1980.
21. Padmanabhan, R., et al., *Genomics and metagenomics in medical microbiology*. Journal of microbiological methods, 2013. **95**(3): p. 415-424.
22. Hall, M., et al., *Use of whole-genus genome sequence data to develop a multilocus sequence typing tool that accurately identifies Yersinia isolates to the species and subspecies levels*. Journal of clinical microbiology, 2015. **53**(1): p. 35-42.
23. McNally, A., et al., *'Add, stir and reduce': Yersinia spp. as model bacteria for pathogen evolution*. Nature reviews. Microbiology, 2016. **14**(3): p. 177.
24. Fàbrega, A. and J. Vila, *Yersinia enterocolitica: pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance*. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 2012. **30**(1): p. 24-32.
25. Batzilla, J., J. Heesemann, and A. Rakin, *The pathogenic potential of Yersinia enterocolitica IA*. International Journal of Medical Microbiology, 2011. **301**(7): p. 556-561.
26. Tennant, S.M., T.H. Grant, and R.M. Robins-Browne, *Pathogenicity of Yersinia enterocolitica biotype IA*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2003. **38**(2): p. 127-137.
27. Carniel, E., *The Yersinia high-pathogenicity island: an iron-uptake island*. Microbes and infection, 2001. **3**(7): p. 561-569.
28. Yan, L., W. Nie, and H. Lv, *Metabolic phenotyping of the Yersinia high-pathogenicity island that regulates central carbon metabolism*. Analyst, 2015. **140**(10): p. 3356-3361.
29. Wren, B.W., *The yersiniae—a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens*. Nature Reviews Microbiology, 2003. **1**(1): p. 55-64.

30. Wauters, G., K. Kandolo, and M. Janssens, *Revised biogrouping scheme of Yersinia enterocolitica*. Contributions to microbiology and immunology, 1987. **9**: p. 14-21.
31. Lahuerta, A., et al., *Zoonoses in the European Union: origin, distribution and dynamics: the EFSA-ECDC summary report 2009*. Eurosurveillance (Online Edition), 2011. **16**(13): p. 5-8.
32. Shayegani, M., et al., *Microbiology of a major foodborne outbreak of gastroenteritis caused by Yersinia enterocolitica serogroup O: 8*. Journal of Clinical Microbiology, 1983. **17**(1): p. 35-40.
33. Ackers, M.-L., et al., *An outbreak of Yersinia enterocolitica O: 8 infections associated with pasteurized milk*. The Journal of infectious diseases, 2000. **181**(5): p. 1834-1837.
34. Batzilla, J., *Complete genome sequence of Yersinia enterocolitica subspecies palearctica serotype O: 3: Identification of novel virulence-associated genes and evolutionary aspects*. 2012.
35. Eiguer, T., et al., *Initial isolation and characterization of Yersinia enterocolitica in human feces in Argentina*. Revista Argentina de microbiología, 1987. **19**(2): p. 71-76.
36. Paz, M., et al., *Analysis of a Yersinia enterocolitica isolated from human diarrheic feces in Argentina*. Revista Argentina de microbiología, 2003. **36**(4): p. 164-169.
37. Cortes, P., et al., *Yersinia enterocolitica in the fecal material from 6 pediatric patients in the city of Córdoba*. Revista Argentina de microbiología, 2010. **42**(1): p. 79.
38. Favier, G.I., M.E. Escudero, and A.M.S. de GUZMÁN, *Genotypic and phenotypic characteristics of Yersinia enterocolitica isolated from the surface of chicken eggshells obtained in Argentina*. Journal of food protection, 2005. **68**(9): p. 1812-1815.
39. Estrada, C.S.L., et al., *Detection of Yersinia spp. in meat products by enrichment culture, immunomagnetic separation and nested PCR*. Food microbiology, 2012. **30**(1): p. 157-163.
40. Lucero-Estrada, C.S., et al., *Evaluation of the pathogenic potential, antimicrobial susceptibility, and genomic relations of Yersinia enterocolitica*



- strains from food and human origin*. Canadian journal of microbiology, 2015. **61**(11): p. 851-860.
41. Drummond, N., et al., *Yersinia enterocolitica: a brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges, and the pork production chain*. Foodborne pathogens and disease, 2012. **9**(3): p. 179-189.
  42. Longenberger, A., et al., *Yersinia enterocolitica infections associated with improperly pasteurized milk products: southwest Pennsylvania, March–August, 2011*. Epidemiology & Infection, 2014. **142**(8): p. 1640-1650.
  43. Gupta, V., et al., *Detection of Yersinia enterocolitica in food: an overview*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2015. **34**(4): p. 641-650.
  44. Rahman, A., et al., *Yersinia enterocolitica: Epidemiological studies and outbreaks*. Journal of pathogens, 2011. **2011**.
  45. Abdel-Haq, N.M., et al., *Yersinia enterocolitica infection in children*. The Pediatric infectious disease journal, 2000. **19**(10): p. 954-958.
  46. Rosner, B.M., K. Stark, and D. Werber, *Epidemiology of reported Yersinia enterocolitica infections in Germany, 2001-2008*. BMC public health, 2010. **10**(1): p. 337.
  47. Galindo, C.L., et al., *Pathogenesis of Y. enterocolitica and Y. pseudotuberculosis in human yersiniosis*. Journal of pathogens, 2011. **2011**.
  48. Isberg, R., *Uptake of enteropathogenic Yersinia by mammalian cells*, in *Bacterial Invasiveness*. 1996, Springer. p. 1-24.
  49. Schaake, J., et al., *Human and animal isolates of Yersinia enterocolitica show significant serotype-specific colonization and host-specific immune defense properties*. Infection and immunity, 2013: p. IAI. 00572-13.
  50. de Koning-Ward, T.F. and R.M. Robins-Browne, *A novel mechanism of urease regulation in Yersinia enterocolitica*. FEMS microbiology letters, 1997. **147**(2): p. 221-226.
  51. O'loughlin, E., et al., *Clinical, morphological, and biochemical alterations in acute intestinal yersiniosis*. Pediatric research, 1986. **20**(7): p. 602-608.
  52. Uliczka, F., et al., *Unique cell adhesion and invasion properties of Yersinia enterocolitica O: 3, the most frequent cause of human yersiniosis*. PLoS pathogens, 2011. **7**(7): p. e1002117.

53. Chauhan, N., et al., *Yersinia adhesins: an arsenal for infection*. PROTEOMICS-Clinical Applications, 2016. **10**(9-10): p. 949-963.
54. Isberg, R.R. and J.M. Leong, *Multiple  $\beta 1$  chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells*. Cell, 1990. **60**(5): p. 861-871.
55. Palumbo, R.N. and C. Wang, *Bacterial invasin: structure, function, and implication for targeted oral gene delivery*. Current drug delivery, 2006. **3**(1): p. 47-53.
56. Gillenius, E. and C.F. Urban, *The adhesive protein invasin of Yersinia pseudotuberculosis induces neutrophil extracellular traps via  $\beta 1$  integrins*. Microbes and infection, 2015. **17**(5): p. 327-336.
57. Yang, Y. and R. Isberg, *Cellular internalization in the absence of invasin expression is promoted by the Yersinia pseudotuberculosis yadA product*. Infection and immunity, 1993. **61**(9): p. 3907-3913.
58. Mühlenkamp, M., et al., *Yersinia adhesin A (YadA)—beauty & beast*. International Journal of Medical Microbiology, 2015. **305**(2): p. 252-258.
59. Pierson, D.E. and S. Falkow, *The ail gene of Yersinia enterocolitica has a role in the ability of the organism to survive serum killing*. Infection and immunity, 1993. **61**(5): p. 1846-1852.
60. Atkinson, S. and P. Williams, *Yersinia virulence factors—a sophisticated arsenal for combating host defences*. F1000Research, 2016. **5**.
61. Wershil, B.K. and G.T. Furuta, *4. Gastrointestinal mucosal immunity*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2008. **121**(2): p. S380-S383.
62. Gnanasekaran, G., et al., *Genomic Insights and Its Comparative Analysis with Yersinia enterocolitica Reveals the Potential Virulence Determinants and Further Pathogenicity for Foodborne Outbreaks*. Journal of microbiology and biotechnology, 2017. **27**(2): p. 262-270.
63. Di Genaro, M.S., et al., *Attenuated Yersinia enterocolitica mutant strains exhibit differential virulence in cytokine-deficient mice: implications for the development of novel live carrier vaccines*. Infection and immunity, 2003. **71**(4): p. 1804-1812.
64. Balada-Llasat, J.-M. and J. Meccas, *Yersinia has a tropism for B and T cell zones of lymph nodes that is independent of the type III secretion system*. PLoS pathogens, 2006. **2**(9): p. e86.

65. Autenrieth, I.B., et al., *Immune responses to Yersinia enterocolitica in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon*. Infection and immunity, 1994. **62**(6): p. 2590-2599.
66. Valentin-Weigand, P., J. Heesemann, and P. Dersch, *Unique virulence properties of Yersinia enterocolitica O: 3—an emerging zoonotic pathogen using pigs as preferred reservoir host*. International Journal of Medical Microbiology, 2014. **304**(7): p. 824-834.
67. Białas, N., et al., *Bacterial cell surface structures in Yersinia enterocolitica*. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis, 2012. **60**(3): p. 199-209.
68. Broz, P., et al., *Function and molecular architecture of the Yersinia injectisome tip complex*. Molecular microbiology, 2007. **65**(5): p. 1311-1320.
69. Mueller, C.A., et al., *The V-antigen of Yersinia forms a distinct structure at the tip of injectisome needles*. Science, 2005. **310**(5748): p. 674-676.
70. Håkansson, S., et al., *YopB and YopD constitute a novel class of Yersinia Yop proteins*. Infection and immunity, 1993. **61**(1): p. 71-80.
71. Grosdent, N., et al., *Role of Yops and adhesins in resistance of Yersinia enterocolitica to phagocytosis*. Infection and immunity, 2002. **70**(8): p. 4165-4176.
72. Cantwell, A.M., S.S. Bubeck, and P.H. Dube, *YopH inhibits early pro-inflammatory cytokine responses during plague pneumonia*. BMC immunology, 2010. **11**(1): p. 29.
73. Andor, A., et al., *YopE of Yersinia, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells*. Cellular microbiology, 2001. **3**(5): p. 301-310.
74. Schmidt, G., *Yersinia enterocolitica outer protein T (YopT)*. European journal of cell biology, 2011. **90**(11): p. 955-958.
75. Lee, W.L., J.M. Grimes, and R.C. Robinson, *Yersinia effector YopO uses actin as bait to phosphorylate proteins that regulate actin polymerization*. Nature structural & molecular biology, 2015. **22**(3): p. 248-255.
76. Tamilvanan, T. and W. Hopper, *Biologically Active Ligands for Yersinia Outer Protein H (YopH): Feature Based Pharmacophore Screening, Docking and Molecular Dynamics Studies*. Combinatorial chemistry & high throughput screening, 2014. **17**(7): p. 579-595.

77. Bose, R., et al., *Mitogen-activated protein kinase-dependent interleukin-1 $\alpha$  intracrine signaling is modulated by YopP during Yersinia enterocolitica infection*. Infection and immunity, 2012. **80**(1): p. 289-297.
78. Höfling, S., et al., *Current activities of the Yersinia effector protein YopM*. International Journal of Medical Microbiology, 2015. **305**(3): p. 424-432.
79. Cornelis, G., *Yersinia pathogenicity factors*, in *Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals*. 1994, Springer. p. 243-263.
80. Dhar, M.S. and J.S. Viridi, *Strategies used by Yersinia enterocolitica to evade killing by the host: thinking beyond Yops*. Microbes and infection, 2014. **16**(2): p. 87-95.
81. Rath, P.C. and B.B. Aggarwal, *TNF-induced signaling in apoptosis*. Journal of clinical immunology, 1999. **19**(6): p. 350-364.
82. Hayashi, K., et al., *A systems biology approach to suppress TNF-induced proinflammatory gene expressions*. Cell Communication and Signaling, 2013. **11**(1): p. 84.
83. Hirata, N., et al., *Dendritic cell-derived TNF- $\alpha$  is responsible for development of IL-10-producing CD4<sup>+</sup> T cells*. Cellular immunology, 2010. **261**(1): p. 37-41.
84. Yrlid, U. and M.J. Wick, *Antigen presentation capacity and cytokine production by murine splenic dendritic cell subsets upon Salmonella encounter*. The Journal of Immunology, 2002. **169**(1): p. 108-116.
85. Tracey, D., et al., *Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review*. Pharmacology & therapeutics, 2008. **117**(2): p. 244-279.
86. Zhang, B.-B., et al., *Association between TNF  $\alpha$  gene polymorphisms and the risk of duodenal ulcer: a meta-analysis*. Plos one, 2013. **8**(2): p. e57167.
87. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
88. Elahi, M.M., et al., *Tumor necrosis factor alpha- 308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2009. **1792**(3): p. 163-172.
89. Barbara, J.A., X. van Ostade, and A.F. Lopez, *Tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ): The good, the bad and potentially very effective*. Immunology & Cell Biology, 1996. **74**(5).

90. Tsukamoto, K., et al., *A highly polymorphic CA repeat marker at the human tumor necrosis factor alpha (TNFA $\alpha$ ) locus*. Journal of human genetics, 1998. **43**(4): p. 278-279.
91. Tartaglia, L.A. and D.V. Goeddel, *Two TNF receptors*. Immunology today, 1992. **13**(5): p. 151-153.
92. Grell, M., et al., *The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor*. Cell, 1995. **83**(5): p. 793-802.
93. Brenner, D., H. Blaser, and T.W. Mak, *Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die*. Nature reviews. Immunology, 2015. **15**(6): p. 362.
94. Haas, T.L., et al., *Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction*. Molecular cell, 2009. **36**(5): p. 831-844.
95. Rahighi, S., et al., *Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF- $\kappa$ B activation*. Cell, 2009. **136**(6): p. 1098-1109.
96. Aggarwal, B.B., S.C. Gupta, and J.H. Kim, *Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: twenty-five years later, a golden journey*. Blood, 2011: p. blood-2011-04-325225.
97. Linkermann, A. and D.R. Green, *Necroptosis*. New England Journal of Medicine, 2014. **370**(5): p. 455-465.
98. Chan, F.K.-M., N.F. Luz, and K. Moriwaki, *Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation*. Annual review of immunology, 2015. **33**: p. 79-106.
99. Kalliolias, G.D. and L.B. Ivashkiv, *TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies*. Nature reviews. Rheumatology, 2016. **12**(1): p. 49.
100. Liu, Z.-g., *Molecular mechanism of TNF signaling and beyond*. Cell research, 2005. **15**(1): p. 24.
101. Tseng, W.-Y., et al., *TNFR signalling and its clinical implications*. Cytokine, 2016.
102. Liu, J., et al., *TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination*. Nature medicine, 1998. **4**(1): p. 78-83.
103. Braumüller, H., et al., *T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence*. Nature, 2013. **494**(7437): p. 361.

104. Park, S.H., et al., *Tumor necrosis factor induces GSK3 kinase-mediated cross-tolerance to endotoxin in macrophages*. *Nature immunology*, 2011. **12**(7): p. 607-615.
105. Probert, L., *TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects*. *Neuroscience*, 2015. **302**: p. 2-22.
106. Bradley, J., *TNF-mediated inflammatory disease*. *The Journal of pathology*, 2008. **214**(2): p. 149-160.
107. Group, T.L.M.S.S. and T.U.o.B.C.M.M.A. Group, *TNF neutralization in MS: Results of a randomized, placebo-controlled multicenter study*. *Neurology*, 1999. **53**(3): p. 457.
108. Kollias, G. *TNF pathophysiology in murine models of chronic inflammation and autoimmunity*. in *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2005. Elsevier.
109. Fiorentino, D.F., *The yin and yang of TNF- $\alpha$  inhibition*. *Archives of dermatology*, 2007. **143**(2): p. 233-236.
110. Bashyam, H., *Interleukin-12: A master regulator*. *Journal of Experimental Medicine*, 2007. **204**(5): p. 969-969.
111. Behzadi, P., E. Behzadi, and R. Ranjbar, *IL-12 family cytokines: General characteristics, pathogenic microorganisms, receptors, and signalling pathways*. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 2016. **63**(1): p. 1-25.
112. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity*. *Nature reviews. Immunology*, 2003. **3**(2): p. 133.
113. Cooper, A.M. and S.A. Khader, *IL-12p40: an inherently agonistic cytokine*. *Trends in immunology*, 2007. **28**(1): p. 33-38.
114. Zundler, S. and M.F. Neurath, *Interleukin-12: Functional activities and implications for disease*. *Cytokine & growth factor reviews*, 2015. **26**(5): p. 559-568.
115. Becker, C., S. Wirtz, and M.F. Neurath, *Stepwise regulation of TH1 responses in autoimmunity: IL-12-related cytokines and their receptors*. *Inflammatory bowel diseases*, 2005. **11**(8): p. 755-764.
116. Takeda, A., et al., *Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment*. *The Journal of Immunology*, 2003. **170**(10): p. 4886-4890.

117. Mullen, A.C., et al., *Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection*. Science, 2001. **292**(5523): p. 1907-1910.
118. Croxford, A.L., P. Kulig, and B. Becher, *IL-12-and IL-23 in health and disease*. Cytokine & growth factor reviews, 2014. **25**(4): p. 415-421.
119. Teng, M.W., et al., *IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases*. Nature medicine, 2015. **21**(7): p. 719-729.
120. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice*. Journal of Experimental Medicine, 1973. **137**(5): p. 1142-1162.
121. Steinman, R.M. and M.D. Witmer, *Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1978. **75**(10): p. 5132-5136.
122. Nussenzweig, M., et al., *Studies of the cell surface of mouse dendritic cells and other leukocytes*. Journal of Experimental Medicine, 1981. **154**(1): p. 168-187.
123. Nussenzweig, M., et al., *A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982. **79**(1): p. 161-165.
124. Hume, D.A., *Macrophages as APC and the dendritic cell myth*. The Journal of Immunology, 2008. **181**(9): p. 5829-5835.
125. Schraml, B.U. and C.R. e Sousa, *Defining dendritic cells*. Current opinion in immunology, 2015. **32**: p. 13-20.
126. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245.
127. Steinman, R.M., *Decisions about dendritic cells: past, present, and future*. Annual review of immunology, 2012. **30**: p. 1-22.
128. Ferenbach, D. and J. Hughes, *Macrophages and dendritic cells: what is the difference?* Kidney international, 2008. **74**(1): p. 5-7.
129. Cosmi, L., et al., *T helper cells plasticity in inflammation*. Cytometry Part A, 2014. **85**(1): p. 36-42.
130. Caza, T. and S. Landas, *Functional and Phenotypic Plasticity of CD4*. BioMed research international, 2015. **2015**.
131. Delgoffe, G.M., et al., *The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment*. Immunity, 2009. **30**(6): p. 832-844.

132. Tripathi, S.K. and R. Lahesmaa, *Transcriptional and epigenetic regulation of T-helper lineage specification*. Immunological reviews, 2014. **261**(1): p. 62-83.
133. Di Genaro, M., et al., *Role of TNFRp55 in Yersinia enterocolitica O: 3-induced arthritis: triggering bacterial antigens and articular immune response*. Rheumatology, 2006. **46**(4): p. 590-596.
134. Di Genaro, M., et al., *Yersinia-triggered arthritis in IL-12p40-deficient mice: relevant antigens and local expression of Toll-like receptor mRNA*. Scandinavian journal of rheumatology, 2007. **36**(1): p. 28-35.
135. Eliçabe, R.J., et al., *Lack of TNFR p55 results in heightened expression of IFN- $\gamma$  and IL-17 during the development of reactive arthritis*. The Journal of Immunology, 2010. **185**(7): p. 4485-4495.
136. Cargnelutti, E., et al., *TNFRp55 controls regulatory T cell responses in Yersinia-induced reactive arthritis*. Immunology and cell biology, 2013. **91**(2): p. 159.
137. Truett, G., et al., *Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT)*. Biotechniques, 2000. **29**(1): p. 52, 54.
138. Maraskovsky, E., et al., *Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified*. Journal of Experimental Medicine, 1996. **184**(5): p. 1953-1962.
139. Lutz, M.B., et al., *An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow*. Journal of immunological methods, 1999. **223**(1): p. 77-92.
140. Monney, L., et al., *Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 536-541.
141. Kaye, J., et al., *Selective development of CD4<sup>+</sup> T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor*. Nature, 1989. **341**(6244): p. 746-749.
142. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(2): p. 133-146.
143. Volin, M.V. and S. Shahrara, *Role of TH-17 cells in rheumatic and other autoimmune diseases*. Rheumatology (Sunnyvale, Calif.), 2011. **1**(104).



144. Rojas, J.M., et al., *IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections*. Journal of immunology research, 2017. **2017**.
145. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(9): p. 745-756.
146. Hilkens, C.M., et al., *Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype*. Blood, 1997. **90**(5): p. 1920-1926.
147. Duvallet, E., et al., *Interleukin-23: a key cytokine in inflammatory diseases*. Annals of medicine, 2011. **43**(7): p. 503-511.
148. Ma, X., et al., *Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells*. F1000Research, 2015. **4**.
149. Zakharova, M. and H.K. Ziegler, *Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF- $\alpha$ : inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells*. The Journal of Immunology, 2005. **175**(8): p. 5024-5033.
150. Autenrieth, S.E., et al., *Immune evasion by Yersinia enterocolitica: differential targeting of dendritic cell subpopulations in vivo*. PLoS pathogens, 2010. **6**(11): p. e1001212.
151. Freer, G. and L. Rindi, *Intracellular cytokine detection by fluorescence-activated flow cytometry: basic principles and recent advances*. Methods, 2013. **61**(1): p. 30-38.
152. Eliçabe, R.J., et al., *TNFRp55 modulates IL-6 and nitric oxide responses following Yersinia lipopolysaccharide stimulation in peritoneal macrophages*. Immunobiology, 2011. **216**(12): p. 1322-1330.
153. Wahl, L.M. and P.D. Smith, *Isolation of monocyte/macrophage populations*. Current Protocols in Immunology, 1991.
154. Van Vugt, E., et al., *Morphological and functional characteristics of rat steady state peritoneal dendritic cells*. Immunobiology, 1991. **184**(1): p. 14-24.
155. Tartaglia, L.A., et al., *The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(20): p. 9292-9296.
156. Hennies, C., et al., *Selective expansion of merocytic dendritic cells and CD8DCs confers anti-tumour effect of Fms-like tyrosine kinase 3-ligand treatment in vivo*. Clinical & Experimental Immunology, 2011. **163**(3): p. 381-391.

157. O'Keeffe, M., et al., *Effects of administration of progenipoietin 1, Flt-3 ligand, granulocyte colony-stimulating factor, and pegylated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell subsets in mice*. Blood, 2002. **99**(6): p. 2122-2130.
158. Fleischmann, R., R. Stern, and I. Iqbal, *Etanercept—review of efficacy and safety after five years of clinical use*. Therapy, 2004. **1**(1): p. 11-23.
159. He, M.M., et al., *Small-molecule inhibition of TNF- $\alpha$* . Science, 2005. **310**(5750): p. 1022-1025.
160. MacKay, V.L. and E.E. Moore, *Immortalized dendritic cells*. 1997, Google Patents.
161. Zapala, L., et al., *Optimization of activation requirements of immature mouse dendritic JAWSII cells for in vivo application*. Oncology reports, 2011. **25**(3): p. 831-840.
162. Jiang, X., et al., *Characterization of murine dendritic cell line JAWS II and primary bone marrow-derived dendritic cells in Chlamydia muridarum antigen presentation and induction of protective immunity*. Infection and immunity, 2008. **76**(6): p. 2392-2401.
163. Elliott, M., et al., *Ustekinumab: lessons learned from targeting interleukin-12/23p40 in immune-mediated diseases*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2009. **1182**(1): p. 97-110.
164. Ma, X., *TNF- $\alpha$  and IL-12: a balancing act in macrophage functioning*. Microbes and Infection, 2001. **3**(2): p. 121-129.
165. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235.
166. Yu, M.B. and W.H. Langridge, *The function of myeloid dendritic cells in rheumatoid arthritis*. Rheumatology International, 2017: p. 1-9.
167. Erfurth, S.E., et al., *Yersinia enterocolitica induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells*. Infection and immunity, 2004. **72**(12): p. 7045-7054.
168. Autenrieth, S.E., et al., *Yersinia enterocolitica YopP inhibits MAP kinase-mediated antigen uptake in dendritic cells*. Cellular microbiology, 2007. **9**(2): p. 425-437.

169. Adkins, I., et al., *Y. enterocolitica* inhibits antigen degradation in dendritic cells. *Microbes and infection*, 2008. **10**(7): p. 798-806.
170. Trülsch, K., et al., *Yersinia outer protein P* inhibits CD8 T cell priming in the mouse infection model. *The Journal of Immunology*, 2005. **174**(7): p. 4244-4251.
171. Gröbner, S., et al., *Yersinia YopP-induced apoptotic cell death in murine dendritic cells is partially independent from action of caspases and exhibits necrosis-like features*. *Apoptosis*, 2006. **11**(11): p. 1959-1968.
172. Wright, P., L. Utriainen, and S. Milling, *Dendritic cells and regulatory T cells in spondyloarthritis*. *Current opinion in rheumatology*, 2013. **25**(4): p. 440-447.
173. Singh, R., A. Aggarwal, and R. Misra, *Th1/Th17 cytokine profiles in patients with reactive arthritis/undifferentiated spondyloarthropathy*. *The Journal of rheumatology*, 2007. **34**(11): p. 2285-2290.
174. Glatigny, S., et al., *Proinflammatory Th17 cells are expanded and induced by dendritic cells in spondylarthritis-prone HLA-B27-transgenic rats*. *Arthritis & Rheumatology*, 2012. **64**(1): p. 110-120.
175. Kim, E.K. and E.-J. Choi, *Compromised MAPK signaling in human diseases: an update*. *Archives of toxicology*, 2015. **89**(6): p. 867-882.
176. Han, Z., et al., *c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis*. *Journal of Clinical Investigation*, 2001. **108**(1): p. 73.
177. Schett, G., J. Zwerina, and G. Firestein, *The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in rheumatoid arthritis*. *Annals of the rheumatic diseases*, 2008. **67**(7): p. 909-916.
178. Thalhamer, T., M. McGrath, and M. Harnett, *MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation*. *Rheumatology*, 2008. **47**(4): p. 409-414.
179. Maynard, C.L. and C.T. Weaver, *Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation*. *Immunological reviews*, 2008. **226**(1): p. 219-233.
180. Liu, B., S.L. Tonkonogy, and R.B. Sartor, *Antigen-presenting cell production of IL-10 inhibits T-helper 1 and 17 cell responses and suppresses colitis in mice*. *Gastroenterology*, 2011. **141**(2): p. 653-662. e4.

181. Chaudhry, A., et al., *Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation*. Immunity, 2011. **34**(4): p. 566-578.
182. Williams-Skipp, C., et al., *Unmasking of a protective tumor necrosis factor receptor I-mediated signal in the collagen-induced arthritis model*. Arthritis & Rheumatology, 2009. **60**(2): p. 408-418.
183. Mildner, A. and S. Jung, *Development and function of dendritic cell subsets*. Immunity, 2014. **40**(5): p. 642-656.
184. Hey, Y.Y. and H.C. O'Neill, *Murine spleen contains a diversity of myeloid and dendritic cells distinct in antigen presenting function*. Journal of cellular and molecular medicine, 2012. **16**(11): p. 2611-2619.
185. Hochrein, H., et al., *Differential production of IL-12, IFN- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  by mouse dendritic cell subsets*. The Journal of Immunology, 2001. **166**(9): p. 5448-5455.
186. Na, Y.R., et al., *GM-CSF grown bone marrow derived cells are composed of phenotypically different dendritic cells and macrophages*. Molecules and cells, 2016. **39**(10): p. 734.
187. Ghosn, E.E.B., et al., *Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(6): p. 2568-2573.
188. Kojima, N., et al., *Development of peritoneal macrophage along a dendritic cell lineage in response to uptake of oligomannose-coated liposomes*. Cellular immunology, 2011. **271**(2): p. 335-341.
189. Jørgensen, T.N., C. Haase, and B. Michelsen, *Treatment of an Immortalized APC Cell Line with Both Cytokines and LPS Ensures Effective T-Cell Activation In Vitro*. Scandinavian journal of immunology, 2002. **56**(5): p. 492-503.
190. Pajtasz-Piasecka, E., et al., *Generation of anti-tumor response by JAWS II mouse dendritic cells transduced with murine interleukin 12 genes*. Oncology reports, 2007. **17**(5): p. 1249-1257.
191. Ssemakalu, C.C., et al., *The Effect of Solar Irradiated Vibrio cholerae on the Secretion of Pro-Inflammatory Cytokines and Chemokines by the JAWS II Dendritic Cell Line In Vitro*. PloS one, 2015. **10**(6): p. e0130190.

192. Ahmed, M.A.E., *Effect of glucocorticoids on surface IL-10 receptors and intracellular IL-10 in mouse splenocytes, thymocytes, monocytes, and dendritic cells: immunofluorescence, confocal microscopy, and electrophoresis study.* Egyptian Journal of Histology, 2012. **35**(2): p. 236-248.
193. Awasthi, S., et al., *A toll-like receptor-4-interacting surfactant protein-A-derived peptide suppresses tumor necrosis factor- $\alpha$  release from mouse JAWS II dendritic cells.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2011. **336**(3): p. 672-681.
194. Xu, Y., P. Darcy, and M. Kershaw, *Tumor-specific dendritic cells generated by genetic redirection of Toll-like receptor signaling against the tumor-associated antigen, erbB2.* Cancer gene therapy, 2007. **14**(9): p. 773.

