

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica



“Rol de las células presentadoras de antígenos en el desarrollo de la respuesta inflamatoria: su modulación por neurotransmisores”

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
área Farmacia y Bioquímica, sub-área: Ciencias de la Salud

AUTOR: Lic. María Soledad Gori

DIRECTOR: Dra. Gabriela Salamone

CO-DIRECTOR: Dra. Mónica Vermeulen

CONSEJERO DE ESTUDIOS: Dra. Juliana Leoni

Laboratorio de CPA y Respuesta Inflamatoria
Instituto de Medicina Experimental (IMEX) - CONICET
Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

2016

Esta tesis incluye parte de los contenidos de los siguientes trabajos publicados durante la realización de la misma:

Acetylcholine polarizes dendritic cells toward a Th2-promoting profile.

Gori S, Vermeulen M, Remes-Lenicov F, Jancic C, Scordo W, Ceballos A, Towstyka N, Geffner J and Salamone G. *Allergy*. 2016 May 3. doi: 10.1111/all.12926. [Epub ahead of print].

Inflammatory Mediators and Neuromodulators: Targeting in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease.

Gori S, Alcain JM, Salamone G, Vermeulen M. *Frontiers in Clinical Drug Research – Anti Allergy Agents*. Bentham Science Publishers. 2016; 2: 3–44. ISBN: 978-1-68108-160-1. DOI: 10.2174/97816810815951160201.

Papel dual de la linfopoyetina estromal tímica (TSLP): ¿Regulador homeostático o mediador pro-inflamatorio?.

Gori, María Soledad; Alcain, Julieta; Vermeulen, Mónica y Salamone, Gabriela. 2015. *Química Viva*, FCEyN, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar. 14 (3): 53-61.

Otras publicaciones en las cuales participé durante el período del doctorado:

Cholinergic Actions of Autoantibodies from Breast Cancer Patients on Dendritic Cells

Lombardi G, Salamone G, **Gori S**, Oroño M, Español A and Sales M. *J Clin Cell Immunol* (2015) 6:340. doi:10.4172/2155-9899.1000340

Acetylcholine contributes to control the physiological inflammatory response during the peri-implantation period.

Paparini D, **Gori S**, Grasso E, Scordo W, Calo G, Perez Leirós C, Ramhorst R* and Salamone G*. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015 Jun; 214 (2): 237-47. doi: 10.1111/apha.12494. Epub 2015 Apr 6.

Differential expression of the fractalkine chemokine receptor (CX3CR1) in human monocytes during differentiation.

Panek C, Ramos MV, Mejías MP, Abrey-Recalde MJ, Fernández-Brando R, **Gori MS**, Salamone G and Palermo M. Cellular & Molecular Immunology. 2014 Dec 15. doi: 10.1038/cmi.2014.116. Epub ahead of print.

Neutrophils suppress $\gamma\delta$ T-cell function.

Sabbione F, Gabelloni ML, Ernst G, **Gori MS**, Salamone G, Oleastro M, Trevani A, Geffner J and Jancic CC. Eur J Immunol. 2013 Nov 22. doi: 10.1002/eji.201343664.

Trophoblast cells induce a tolerogenic profile in dendritic cells.

Salamone G, Fraccaroli L, **Gori S**, Grasso E, Papparini D, Geffner J, Leirós CP, Ramhorst R. Hum Reprod. 2012 Sep; 27(9):2598-606.

Cholinergic modulation of dendritic cell function.

Salamone G, Lombardi G, **Gori S**, Nahmod K, Jancic C, Amaral MM, Vermeulen M, Español A, Sales ME and Geffner J.

J. Neuroimmunol. 2011; 236: 47-56.

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

ACh: Acetilcolina, del inglés *Acetylcholine*

AChE: Acetilcolinesterasa, del inglés *Acetylcholinesterase*

Ag: Antígeno

Alum: Aluminato de sodio

ARNm: ARN mensajero

ARs: Receptores adrenérgicos, del inglés *Adrenergic receptors*

AT: Atropina

BALF: Fluido de lavado bronqueoalveolar, del inglés *Bronchoalveolar lavage fluid*

BALT: Tejido linfoide asociado a bronquios, del inglés *Bronchus-associated lymphoid tissue*

BSA: Albúmina sérica bovina, del inglés *Bovine Serum Albumin*

CAs: Catecolaminas

CD: Células dendríticas

CDp: Célula dendrítica plasmacitoide

ChAT: Colina acetiltransferasa, del inglés *Choline Acetyltransferase*

ChT1: Transportador de colina 1, del inglés *Choline transporter 1*

CML: Cultivo mixto linfocitario

COMT: Catecol-O-metiltransferasa

CPA: Célula presentadora de Ag

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño, del inglés *Danger associated molecular patterns*

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

GM-CSF: Factor estimulante de colonia granulocítico-macrófago, del inglés *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GPCR: Receptor acoplado a proteína G, del inglés *G protein-coupled receptor*

H&E: Hematoxilina-Eosina

HAF: Células de alta autofluorescência, del inglés *High autofluorescence cells*

HLA: Ag leucocitario humano,

HPA: hipotalámico-pituitario-adrenal

IFM: Intensidad de fluorescencia media

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

LB: Linfocito B

LC: Célula de Langerhans

LFA-1: Del inglés, *Lymphocyte Function-associated Antigen 1*

LPS: Lipopolisacárido

LT: Linfocito T

mAChR: Receptor muscarínico, del inglés *muscarinic ACh receptor*

MAO: Monoamino oxidasa

MCP-1: Proteína quimioattractante de monocitos, del inglés *Monocyte chemoattractant protein-1*

MDC: Del inglés, *Macrophage-Derived Chemokine*

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad, *major histocompatibility complex*

MM: Mecamilamina

Mo: Monocitos

nAChR: Receptores nicotínicos, del inglés *nicotinic ACh receptor*

NE: Norepinefrina

NKT: Del inglés *Natural Killer T cells*

OCT: Del inglés, *Organic cation transporter*

OLS: Órganos linfoides secundarios

OVA: Ovalbúmina

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés *Pathogen associated molecular patterns*

PAS: Ácido periódico de Schiff

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica, del inglés *Peripheral blood mononuclear cells*

PBS: Buffer fosfato salino

PGE2: Prostaglandina E2

Poly I:C: Del inglés, *Polyinosinic-polycytidylic acid*

qRT-PCR: RT-PCR cuantitativa

RRPs: Receptores de reconocimiento de patrones

STAT: Del inglés, *Signal Transducer and Activator of Transcription*

SEM: *Standard error media* o error estándar

SNA: Sistema nervioso autónomo

SNC: Sistema nervioso central

TARC: Del inglés, *Thymus and activation-regulated chemokine*

TCR: Receptor de célula T, del inglés *T cell receptor*

Tfh: T folicular helper

TGF: Factor de crecimiento transformante, del inglés, *Transforming growth factor*

Th: T helper

TLR: Del inglés, *Toll-Like Receptors*

TNF: Factor de necrosis tumoral, del inglés *Tumor necrosis factor*

Treg: T regulatorios

TSLP: Del inglés, *Thymic Stromal Lymphopoietin*

TSLPR: Receptor de TSLP

VACHT: Transportador vesicular de ACh, del inglés *Vesicular Acetylcholine transporter*

RESUMEN

Diferentes avances en neurociencia e inmunología han determinado la interacción bidireccional entre los sistemas nervioso e inmune. La Acetilcolina (ACh) es el neurotransmisor de los nervios parasimpáticos ganglionares y post-ganglionares y mediador parácrino no-neuronal producido por diferentes tipos celulares, incluidas las células del sistema inmune. En lo relativo a la acción inmunomoduladora mediada por la ACh, la atención se ha concentrado mayormente en los procesos inflamatorios que ocurren en el tracto respiratorio, estableciéndose que tanto una producción incrementada de ACh, como una disfunción de los receptores que median su acción, participarían en la etiopatogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias, tales como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

El asma alérgico es considerado fundamentalmente una patología causada por una desregulación inmune y se encuentran asociados una serie de mecanismos relacionados: el desarrollo de un perfil T helper (Th)2 sobre los demás perfiles T, la hiperreactividad bronquial, la excesiva producción de secreciones mucosas y la remodelación estructural de la vías aéreas. Estos mecanismos tienen lugar debido a la participación de células inflamatorias, como los eosinófilos, mastocitos y linfocitos Th2 que son reclutadas a la mucosa respiratoria causando la inflamación crónica característica de la patología.

Las células dendríticas (CD) presentan un rol crucial en el inicio de esta patología, por ser las células que dirigen la respuesta inmune adaptativa. Se caracterizan por ser células presentadoras de antígeno profesionales que expresan una cualidad única: activar linfocitos T *naïve*; son ellas las que deciden el perfil particular en el que se diferenciarán las células T CD4⁺ al activarse: T helper (Th)1, Th2, Th17 o T regulatorio. Esta decisión depende, en última instancia, de la producción de citoquinas por las propias CD.

Nuestro grupo ha demostrado previamente, la presencia de un sistema colinérgico completo no neuronal en las CD. Las mismas presentan tanto la enzima que sintetiza ACh, como la que la degrada, colina acetiltransferasa (ChAT) y acetilcolinesterasa (AChE), respectivamente. Además, expresan los receptores nicotínicos (nAChR) y los muscarínicos (mAChR).

El objetivo de este trabajo fue evaluar si la ACh, a través de sus acciones inmunomodulatorias sobre las CD, impone y/o favorece un fenotipo promotor de la respuesta inflamatoria alérgica.

En principio nuestros resultados nos permitieron determinar que la ACh imprime en las CD un perfil promotor Th2, induciendo el incremento en la expresión de la molécula OX40L y la producción de quimoquinas tales como TARC (del inglés, *Thymus and activation-regulated chemokine*) y MDC (del inglés, *Macrophage-derived chemokine*), además del incremento en la producción de citoquinas características de este perfil como IL-4, IL-5, IL-13 y la disminución la relación T-bet/GATA3 en un cultivo alogeneico. Sorpresivamente, encontramos que además la ACh logró inhibir la polarización hacia el perfil Th1.

Nos preguntamos, entonces también si este fenotipo promotor podría ser exacerbado por citoquinas inductoras de un perfil Th2. En este sentido, el TSLP (del inglés, *Thymic stromal lymphopoietin*) ha despertado un gran interés al establecerse como una las principales moléculas inductoras del perfil inflamatorio característico de las patologías alérgicas. Las CD pre-incubadas con TSLP y luego expuestas a ACh favorecieron aún más la producción de citoquinas de perfil Th2 en un cultivo alogeneico. Por otra parte, incrementaron tanto la expresión de moléculas tales como OX40L, CD83 y HLA (del inglés, *Human leukocyte antigen*)-DR, como la producción del factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *Tumor necrosis factor*)- α y la interleuquina (IL)-8. Estos últimos efectos fueron mediados por los mAChR.

Finalmente, determinamos en un modelo murino de alergia pulmonar que la transferencia de CD tratadas con ACh (ACh-CD) al inicio del proceso alérgico, impuso cambios drásticos en la morfología y funcionalidad de las células epiteliales aéreas, al incrementar el reclutamiento de monocitos en el pulmón de los ratones instilados con ACh-CD. Este reclutamiento parecería depender de la producción de la quimioquina MCP-1 por las mismas.

En conclusión, nuestros resultados reflejan la relevancia y el impacto de la ACh sobre las CD imprimiendo un perfil Th2 que sería promotor de las respuestas inflamatorias crónicas. Estos resultados son relevantes para el mejor entendimiento de la fisiopatología del asma y el EPOC.

INTRODUCCIÓN	1
1. Fisiología de las células dendríticas y su participación en las patologías alérgicas.....	2
1. 1. Células dendríticas: “motor” y “cerebro” de la inmunidad adaptativa	2
1. 2. Origen, diferenciación y subpoblaciones de CD	4
1. 2. 1. CD inflamatorias	6
1. 3. Activación y maduración de las CD	8
1. 3. 1. Maduración de las CD	10
1. 4. Papel de las CD en la inducción de la respuesta inmune adaptativa frente a procesos infecciosos o injuria	12
1. 5. Participación de las CD en respuestas inflamatorias alérgicas de las vías aéreas	14
1. 5. 1. Producción de TSLP y expresión del TSLPR en las células inmunes	17
1. 5. 2. Modulación de las CD por TSLP	18
2. Diálogo entre el sistema nervioso y el sistema inmune: Neuroinmunomodulación .	21
2. 1. Control de la respuesta inmune por el SNA simpático o adrenérgico	23
2. 2. Control de la respuesta inmune por el SNA parasimpático o colinérgico.....	24
2. 2. 1. Sistema colinérgico neuronal	25
2. 2. 1. 1. nAChR	26
2. 2. 1. 2. mAChR	27
2. 2. 1. 3. Vía colinérgica anti-inflamatoria	29
2. 2. 2. Sistema colinérgico no-neuronal	30
2. 2. 3. Relevancia del sistema colinérgico en la fisiopatología de diferentes enfermedades	32
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	36
OBJETIVO GENERAL.....	37
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
1. Resguardos Éticos	39
2. Reactivos Generales	39
3. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica o PBMC	39
4. Aislamiento de Mo CD14 ⁺ a partir de PBMC	40

5. Obtención de CD a partir de diferenciación de Mo CD14 ⁺	40
6. Aislamiento de CD CD1c (BDCA-1) ⁺ a partir de PBMC	42
7. Aislamiento de LT CD4 ⁺ naïve a partir de PBMC.....	42
8. Cultivos mixtos linfocitarios.....	43
9. RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)	44
9. 1. Extracción de ARN total	44
9. 2. Síntesis de ADN copia (ADNc)	44
9. 3. Amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (Real Time-PCR)	45
10. Ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en murinos	46
10. 1. Animales.....	47
10. 2. Aislamiento de precursores de médula ósea de ratones BALB/c	47
10. 3. Obtención de CD murinas por diferenciación de precursores de médula ósea	47
10. 4. Obtención de esplenocitos murinos.....	48
10. 5. Cultivo mixto linfocitario murino	49
10. 6. Modelo murino de génesis de respuesta inflamatoria alérgica pulmonar	49
10. 6. 1. Diseño experimental	49
10. 6. 2. Evaluación de nivel de Ab IgE OVA-específicos en suero	50
10. 6. 3. Procesamiento de los pulmones	51
10. 6. 3. 1. Análisis histopatológico	51
10. 6. 3. 2. Obtención de suspensiones celulares de pulmón	51
11. Citometría de flujo	51
11. 1. Inmunofluorescencia de superficie directa	52
11. 2. Inmunofluorescencia de superficie indirecta	52
11. 3. Inmunofluorescencia intracitoplasmática directa	53
11. 4. Evaluación de la apoptosis celular por unión de Anexina V	53
12. Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos celulares por ELISA.....	54
13. Análisis estadístico	54
RESULTADOS.....	56
1. ACh induce la polarización de las CD hacia un perfil promotor de respuesta Th2	57

1. 1. ACh promueve cambios fenotípicos asociados a una respuesta Th2 en las CD .	57
1. 2. ACh aumenta la capacidad estimuladora de las CD promoviendo un perfil de respuesta tipo Th2	58
2. ACh favorece la polarización de las CD hacia un perfil promotor de Th2 inducido por TSLP	62
2. 1. La inducción del fenotipo promotor de perfil Th2 que genera el TSLP en las CD es favorecida por la ACh	63
2. 2. Implicancia de los receptores colinérgicos y el receptor de TSLP en la respuesta mediada por ACh y TSLP en las CD.....	66
2. 3. ACh incrementa la capacidad de las TSLP-CD de inducir una respuesta inmune de tipo Th2 inflamatoria	69
3. NE modula el fenotipo de las CD y favorece parcialmente los efectos inducidos por el TSLP	71
3. 1. NE promueve la expresión de la molécula OX40L en las CD	72
3. 2. NE promueve la expresión de moléculas co-estimuladoras sobre las CD, sin favorecer la inducción de las mismas por TSLP	73
3. 3. NE favorece la producción de citoquinas pro-inflamatorias en CD estimuladas con TSLP.....	74
4. ACh activa a las CD murinas y participa en el desarrollo de procesos inflamatorios alérgicos	75
4. 1. ACh aumenta la expresión de MHC II sobre las CD y su capacidad estimuladora en un cultivo alogeneico	75
4. 2. Las CD tratadas con ACh favorecen la génesis de un proceso inflamatorio alérgico pulmonar (modelo in vivo).....	77
DISCUSIÓN.....	84
CONCLUSIONES.....	99
BIBLIOGRAFÍA	101

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos, el sistema inmune y el sistema neuroendócrino han llevado a cabo la regulación de la homeostasis del organismo, manteniendo un intrincado diálogo que se ha ido expandiendo a lo largo de la evolución. Células de cada uno de los sistemas presentan los elementos necesarios para poder comunicarse uno con el otro: neurotransmisores, citoquinas, hormonas y los receptores para todos ellos. El conocimiento de esta neuroinmunomodulación es crucial para poder entender el trasfondo de los desórdenes del sistema inmunológico, como las reacciones de hipersensibilidad y las respuestas autoinmunes.

La presencia de un sistema colinérgico completo en una gran variedad de tipos celulares no neuronales, así como su presencia en una gran diversidad de especies, plantea la posibilidad de que el mismo constituya un sistema primordial en la fisiología celular, y por consiguiente en el mantenimiento de la homeostasis de diferentes tejidos, proceso que ha estado sujeto a la evolución de las especies (1–4).

1. Fisiología de las células dendríticas y su participación en las patologías alérgicas

1. 1. Células dendríticas: “motor” y “cerebro” de la inmunidad adaptativa

Han pasado 40 años ya desde la primera vez que se identificó a las células dendríticas (CD) en el bazo murino por Steinman y Cohn, quienes lograron diferenciarlas de los macrófagos debido a su exclusiva morfología: células móviles de morfología estrellada, que constantemente retraían y extendían sus proyecciones asumiendo una amplia variedad de formas ramificadas; de allí que las denominaron con el término “dendrítica” (5). Los mismos autores también, en trabajos subsecuentes, observaron que estas células expresaban altos niveles de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) de clase II y la integrina CD11c, y que se distinguían por su capacidad de migrar a los órganos linfoides secundarios (OLS) y por poseer una capacidad superior para estimular a los linfocitos T (LT) en un cultivo alogeneico (6,7). Por esta razón, en las últimas décadas fue aumentando su relevancia, siendo actualmente las células primordiales en el inicio y orientación de la respuesta adaptativa.

Aún años después de este hallazgo crucial, continúa profundizándose el conocimiento de las CD, describiéndose cada vez más características, perfiles y funcionalidades de estas células, las cuales fueron responsables de un cambio de paradigma en el campo de la Inmunología.

Las CD constituyen una población celular heterogénea que presenta la capacidad de captar, procesar y presentar antígenos (Ag) a los LT, características propias de las células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales. A su vez, las CD poseen una gran cualidad que las diferencia del resto: son las únicas capaces de activar a un LT *naïve* y orientar el curso de la inmunidad adaptativa. Presentan además, una característica sobresaliente: su plasticidad. Dependiendo de las señales que perciban en el tejido inflamado, activarán a los LT *naïve* en un perfil particular con sesgos fenotípicos y funcionales, propios y distintivos: T helper (Th) 1, Th2, Th17, T folicular helper (Tfh) o T regulatorio (Treg) (8–11). Evidencias de las últimas décadas demuestran que las CD, además de ser críticas en la respuesta inmune adaptativa contra Ag foráneos, juegan un papel crucial en la inducción y mantenimiento de la tolerancia periférica, una respuesta dirigida a eliminar a las células T autorreactivas que han egresado del timo y circulan en la periferia (12–14).

Dentro de las denominadas CD, existen dos poblaciones principales, bien definidas y con funciones y orígenes diferentes, las CD mieloides o convencionales y las CD plasmacitoides (CDp). Estas últimas, cumplen un rol crítico en la inmunidad anti-viral al responder ante los Ag virales con una alta producción de interferón (IFN) de tipo I; mientras que las mieloides son las responsables de iniciar la respuesta inmune adaptativa a partir de la activación de los LT *naïve* (8,12). Sobre estas últimas se focaliza este trabajo, y de ahora en adelante, las nombraremos como CD.

Pueden determinarse cuatro etapas en el desarrollo de las CD (10): (a) progenitores de médula ósea; (b) precursores de CD que migran por sangre periférica y linfa hacia tejidos linfoides y no linfoides, y que al reconocer patógenos, liberan citoquinas proinflamatorias; (c) CD inmaduras residentes de los tejidos con alta capacidad endocítica y fagocítica; y (d) CD maduras presentes en los OLS, que expresan altos niveles de moléculas co-estimuladoras para mediar la presentación antigénica.

1. 2. Origen, diferenciación y subpoblaciones de CD

Tanto en la especie humana como en la murina, las CD se originan a partir de progenitores mieloides de médula ósea en respuesta a factores de crecimiento y de diferenciación como el Factor estimulante de colonia granulocítico-macrófago (GM-CSF, del inglés *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) y el ligando de Flt3 (del inglés, *FMS-like tyrosine kinase-3*), compartiendo la mayor parte de su ontogenia, aún no completamente definida, con los monocitos (Mo)/macrófagos (6,15) (figura 1). A diferencia de las CDp, las CD no culminan su diferenciación en la médula ósea, sino que en condiciones no inflamatorias, precursores inmediatos de las CD migran desde la médula ósea por el torrente sanguíneo hacia tejidos y OLS, donde darán las distintas subpoblaciones de CD, luego de un paso final de diferenciación *in situ* (16,17). Recientemente, se han caracterizado ciertos precursores inmediatos para distintas subpoblaciones de CD, sin embargo, cómo es regulado el proceso de reclutamiento y diferenciación bajo condiciones homeostáticas (“*steady state*”) o inflamatorias, no está aún del todo definido (6,12,18).

Las diferentes subpoblaciones de CD pueden distinguirse mediante la expresión de marcadores de superficie específicos y de sus propiedades funcionales (8,10,12). Si bien esto podría sugerir algún tipo de especialización en el control de la respuesta a la infección o injuria (19), aún no ha sido establecido con claridad hasta qué punto las diferencias fenotípicas y funcionales reflejan distintos estadios de diferenciación, activación, maduración y/o diferentes orígenes o linajes.

Las CD comprenden un conjunto de diversas subpoblaciones, localizadas tanto en los tejidos linfoides como en los no-linfoides (sangre, piel, mucosas y diferentes órganos, como hígado, riñón y pulmón). A grandes rasgos, según su localización, las CD pueden clasificarse en residentes de órganos linfoides, las cuales se caracterizan por permanecer en estos órganos durante todo su ciclo de vida y en condiciones homeostáticas son fenotípicamente inmaduras; residentes de órganos no linfoides, relacionadas por su origen y fenotipo con las anteriores; y las CD migratorias, que se caracterizan por su fenotipo maduro al migrar a los OLS, lo cual hacen constitutivamente y aún más, bajo condiciones inflamatorias.

En humanos, se han identificado también diversas subpoblaciones de CD, incluyendo las CD residentes de órganos linfoides y las CD migratorias (20). En sangre periférica, han sido reportados dos *subsets* principales de CD y uno de CDp. Dentro de las CD, una subpoblación presenta el fenotipo CD11c/BDCA-1⁺ y la otra CD141/BDCA-3⁺ (16,17,21). Esta última es la menos frecuente, constituyendo sólo el 5-10%, mientras que el 90-95% restante se distribuye en partes iguales en las otras dos subpoblaciones (21,22). Estos *subsets* de CD se han encontrado también en OLS y en órganos no linfoides como pulmón, piel, hígado e intestino (16,21). Actualmente, se considera que las CD de sangre periférica son los precursores inmediatos de las CD presentes en los tejidos que se encuentran en tránsito. A pesar de compartir algunas propiedades con estas últimas como la secreción de citoquinas, la rápida maduración y la activación de una respuesta T al ser activadas *in vitro*, claras evidencias apoyan el concepto de que las CD de sangre periférica no se encuentran en un completo estado de diferenciación, ya que conservan marcadores fenotípicos de precursores y no muestran respuestas madurativas a citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *Tumor necrosis factor*)- α , presentando una menor eficiencia para polarizar la respuesta T en comparación a su contraparte en tejidos. Además, presentan la capacidad de proliferar, la cual no es observada en las CD terminalmente diferenciadas como las CD de tejidos y CDp (16,17,21,22).

Particularmente en el pulmón, bajo condiciones homeostáticas, podemos encontrar al menos tres subpoblaciones de CD, que se diferencian por sus niveles de expresión de los marcadores CD11c/CD11b, así como también encontramos CDp. En condiciones inflamatorias, cualquiera de estas poblaciones de CD puede encontrarse en el compartimiento alveolar, lo que dificulta su estudio en fluido del lavado bronquioalveolar (BALF, del inglés *Bronchoalveolar lavage fluid*). Además, en la luz del alvéolo se encuentran los macrófagos alveolares que también expresan el marcador CD11c, pero sin embargo, se los suele distinguir por su alta autofluorescencia (23,24). En el humano, se reportó la presencia de CD con el mismo fenotipo de las CD de sangre periférica tanto en BALF como en biopsias, y se consideran la contraparte de las CD pulmonares descritas en ratón (23).

En los últimos años, se ha definido una nueva subpoblación de CD migratorias, presente sólo en estado inflamatorio, denominadas CD inflamatorias, y han sido identificadas en tejidos inflamados de diversas patologías como dermatitis atópica, psoriasis, artritis reumatoidea (20), así como en modelos inflamatorios de asma alérgico (25).

1. 2. 1. CD inflamatorias

Los Mo se diferencian en la médula ósea a partir de progenitores mieloides y egresan al torrente sanguíneo, donde permanecen (vida media de 3 días) hasta que son reclutados a compartimientos extravasculares no solo en procesos inflamatorios, sino también en condiciones fisiológicas, a fin de mantener el sistema monocítico (18). Inicialmente, se describió al Mo como el precursor de los macrófagos, siendo el elemento clave para la generación y renovación del sistema fagocítico mononuclear, al tener la capacidad de diferenciarse en distintos tipos de macrófagos tejido-específicos. Más recientemente, se ha demostrado que también poseen la capacidad de diferenciarse a CD, y al contrario de lo que se creía, esto no sería exclusivamente bajo condiciones inflamatorias (26,27). Respecto a esto último, como mencionamos anteriormente, se ha demostrado que a pesar de que gran parte de las subpoblaciones de CD del organismo, en condiciones homeostáticas, se diferencian de precursores de CD de médula ósea, algunas subpoblaciones de CD migratorias como las células de Langerhans (LC), CD dérmicas y CD intersticiales de la mucosa intestinal, respiratoria y genital, derivan de Mo (20,26,28–30). No obstante, la participación del Mo en la generación de CD en condiciones homeostáticas, aún permanece controvertido (21,23). Teniendo en cuenta esto, sólo se consideran CD inflamatorias, a las CD que se generan durante la inflamación, las cuales derivan de Mo que se diferencian en el sitio inflamado (20).

El reclutamiento de los Mo desde la sangre al tejido inflamado es guiado tanto por quimioquinas como por productos de clivaje del sistema de complemento, péptidos bacterianos y defensinas, y se produce rápidamente dentro de las 6 h del comienzo de la infección y/o la presencia del Ag (12,31). Como las demás CD migratorias, las CD inflamatorias una vez activadas son células que migran a los OLS y que pueden activar

tanto a LT CD4⁺ como CD8⁺, así como también a LT efectores y de memoria en el sitio de inflamación. Interesantemente, estas CD derivadas de Mo también demostraron, tanto *in vitro* como *in vivo*, tener la capacidad de presentar Ag no replicativos en el contexto de MHC de clase I a LT CD8⁺, por el mecanismo de presentación cruzada, lo cual fue un hito en el desarrollo de terapias basadas en inoculación de CD pulsadas con Ag (7,31).

En la especie murina, los Mo pueden clasificarse en dos grandes grupos, los Gr1⁺/Ly6C⁺ y los GR1⁻/Ly6C⁻. Los primeros son CCR2⁺ (receptor de la quimioquina CCL2 o proteína quimioattractante de Mo, MCP-1, del inglés *Monocyte chemoattractant protein-1*) y CX₃CR1^{bajo} (receptor de la quimioquina CX₃CL1 o fractalkina) y se los consideran “Mo inflamatorios” (28,32), mientras que los segundos son negativos para todos los marcadores nombrados y CX₃CR1^{alto}; estos últimos representan solo el 15-20% de los Mo en circulación y se los denominan “Mo residentes” (20,26–28). En condiciones homeostáticas, los Mo Ly6C⁺ se diferencian en Mo Ly6C⁻, generando una población con nivel intermedio de Ly6C que es reclutada a los tejidos periféricos (27,32). Se ha propuesto que los Mo Ly6C⁻ circulan por el torrente sanguíneo y colonizan los tejidos periféricos no inflamados de manera CX₃CR1-dependiente, para diferenciarse principalmente en macrófagos, y en menor medida en CD; mientras que en un ambiente inflamatorio, los Mo Ly6C⁺, células de vida media corta, son activamente reclutados a los tejidos inflamados vía CCR2 y se diferenciarán a CD inflamatorias (18,27,28). Asimismo, se ha reportado que las LC se renuevan en condiciones homeostáticas a partir de precursores residentes derivados de Mo Gr1⁻, pero que, cuando en condiciones inflamatorias estas emigran a los OLS, los precursores que repoblarán la piel son del tipo Gr1⁺/Ly6C^{alto}. Sin embargo, reportes recientes sugieren que los Mo Ly6C⁻ también podrían participar en la generación de las CD inflamatorias, aunque esto permanece controvertido (18,26).

Se ha establecido que tanto los Mo Gr1⁺/Ly6C^{alto} como los Mo GR1⁻/Ly6C⁻ poseen su contraparte en humanos, siendo los primeros equivalentes a los Mo CD14^{alto}/CD16⁻, los llamados “clásicos”, y los segundos equivalentes a los Mo CD14^{bajo}/CD16⁺, los “no clásicos” (21,26,28). Esta última población es muy pequeña en los individuos sanos y muestra una considerable heterogeneidad (33). Está aceptado que dentro de la

población monocítica, los CD16⁺ son los Mo más inflamatorios, debido a sus similitudes fenotípicas con los Mo inflamatorios murinos, y su alta expresión de CCR2 y mieloperoxidasa (32).

Hace ya 20 años, Sallusto y Lanzavecchia han demostrado la capacidad de los Mo de diferenciarse a CD en ensayos *in vitro*, en presencia de GM-CSF e interleuquina (IL)-4 (28,31,34). Años después, mediante modelos *in vivo* de procesos inflamatorios inducidos por infección, se confirmó esta capacidad de diferenciación de los Mo, al observarse que éstos podían diferenciarse a CD en la dermis inflamada, las cuales subsecuentemente migrarían a los OLS (35,36). Aunque poco se sabe de los factores que dirigen la diferenciación de Mo a CD inflamatorias, se ha sugerido que *in vivo*, se encuentra sujeta a un balance complejo de factores de crecimiento, estímulos inflamatorios y componentes de los patógenos, y se ha observado que puede ser inhibida con altas concentraciones de agonistas de receptores tipo Toll (TLR, del inglés *Toll-like receptor*), como el Lipopolisacárido (LPS) (20,26). Aún no se ha descrito la presencia de un factor de transcripción esencial en el origen de las CD inflamatorias, sin embargo, el factor de transcripción de linaje específico de CD, *ZBTB46*, se encontró expresado tanto las CD derivadas de Mo *in vitro* como las inflamatorias generadas *in vivo*, y en su contraparte humana. Las CD inflamatorias humanas, tanto las aisladas de tejidos inflamados de diversas patologías como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (23), dermatitis atópica, artritis reumatoidea (20), así como las derivadas de Mo *in vitro* mediante GM-CSF+IL-4, mostraron un transcriptoma diferente al de las CD convencionales, lo que permitió asegurar que las CD inflamatorias son un subtipo distintivo de CD, con mayor similitud a los Mo respecto a los precursores de dendríticas convencionales.

1. 3. Activación y maduración de las CD

A partir de la señalización de los estímulos presentes en un ambiente inflamatorio, las CD pueden activarse, y alterar su fenotipo al aumentar sus moléculas co-estimuladoras y al producir citoquinas pro-inflamatorias. El reconocimiento de estos estímulos, ya sean patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *Pathogen*

associated molecular patterns), citoquinas inflamatorias y/u otras señales de estrés, puede conducir finalmente a la maduración de las CD (12) (figura 1).

Las CD maduras lo son tanto fenotípica como funcionalmente, lo que determina que las mismas sean capaces de activar células T *naïve*, es decir, generar una respuesta inmune primaria. Además de los microorganismos, existen otras fuentes de estímulos madurativos no microbianos, como ocurre en las respuestas autoinmunes, algunas reacciones de hipersensibilidad, como las alergias y la dermatitis por contacto, entre otras (31).

Mientras que en otros tipos celulares la inmadurez se asocia con carencia de funcionalidad, este término aplicado a las CD posee una connotación diferente. Las CD inmaduras se ubican en tejidos periféricos, particularmente, en la interfase con el medio externo, como piel y mucosas. Cumplen allí dos tareas centrales: a) endocitar el Ag y procesarlo, y b) decodificar las propiedades del proceso infeccioso en curso, de modo que adquieren la información requerida para activar luego una respuesta inmune apropiada (8,12,31).

Las CD responden a diferentes tipos de señales, como el reconocimiento directo de patógenos a través de receptores de reconocimiento de patrones (RRPs) y/o sensando las señales resultantes del proceso inflamatorio de forma indirecta a través de citoquinas pro-inflamatorias, componentes celulares internos u otras señales de estrés, respuestas inmunes específicas en curso (7). Los RRP son capaces de reconocer PAMPs así como señales indicativas de daño o estrés tisular, llamados DAMPs (del inglés *Danger associated molecular patterns*); dependiendo la familia pueden mediar, además, la internalización del Ag. Se han reportado, además, otros receptores de superficie en las CD: receptores de citoquinas y quimioquinas, receptores de complemento, receptores de la familia del TNF, receptores del fragmento Fc (RFc) de las inmunoglobulinas (Ig) y sensores de muerte celular (7). En conjunto, estos receptores pueden mediar la activación de las CD y/o la endocitosis del Ag, y “poner en marcha” un conjunto dramático de cambios en su fisiología que conducirán a la maduración de las mismas (8,12).

Otras propiedades influyen en que las CD sean las CPA profesionales más potentes y únicas para activar una respuesta primaria. Por un lado, la extraordinaria capacidad

para capturar Ag particulados y solubles, mediante fagocitosis mediada por receptor y macropinocitosis, respectivamente (7). Por otro, la disposición que tienen en las mucosas y en la piel, donde forman verdaderas redes celulares “alertas” al ingreso de microorganismos o a la presencia DAMPs, proyectando sus dendritas hacia la luz o superficie del epitelio. Y por último, como se mencionó anteriormente, la rapidez con la que sus precursores se reclutan y se diferencian en el tejido inflamado (8,12).

Las CD inmaduras poseen dos vías de procesamiento antigénico para la posterior presentación a los LT CD4⁺ y CD8⁺. En el caso de los primeros, deben reconocer el Ag en el contexto de moléculas de MHC II, y se presentan, principalmente, Ag internalizados o proteínas de membrana mediante la vía exógena o endocítica que involucra la formación de un fagolisosoma donde el Ag es cortado por proteasas presentes en el mismo y los péptidos resultantes se unen a la molécula presentadora (7,8). En cambio, los LT CD8⁺ deben reconocer al Ag en el contexto de moléculas de MHC I, y se presentan principalmente, Ag presentes en el citosol mediante la vía endógena o biosintética; donde los mismos son cortados por una unidad multicatalítica o proteosoma, y luego unidos a las moléculas presentadoras en el retículo endoplásmico (7,8). Además, normalmente, los Ag exógenos pueden presentarse por MHC I a LT CD8⁺, mecanismo conocido como presentación cruzada o cross-presentación, así como Ag endógenos pueden hacerlo por MHC II a LT CD4⁺ (7,8). El mecanismo de presentación cruzada es fundamental para activar respuestas T CD8⁺, frente a Ag que no infectan a las CD; siendo relevante tanto para la respuesta anti-viral como antitumoral.

1. 3. 1. Maduración de las CD

La interacción de determinados RRP con PAMPs, la endocitosis de Ag, así como la acción de citoquinas y/o quimioquinas sobre las CD en el foco inflamatorio, generan la activación de las CD y la inducción de su migración a los OLS por vía linfática, proceso que demora entre 24 a 48 h durante el cual completa su maduración, donde activará al LT *naïve* en el área paracortical (figura 1). La maduración implica un número de eventos que acontecen en forma gradual y coordinada, a medida que las CD migran hacia los OLS (8,12,31,37,38):

- ✓ Aumento en la expresión del receptor de las quimioquinas CCL19 y CCL21 (CCR7) dirigiendo la migración de las CD hacia el ganglio linfático drenante.
- ✓ Disminución de su capacidad de captura y procesamiento del Ag, favoreciendo la presentación de aquellos Ag capturados en la periferia.
- ✓ Incremento en la expresión de moléculas co-estimuladoras CD80/CD86 así como de CD40 y LFA (del inglés, *Lymphocyte function-associated antigen*)-1 favoreciendo su capacidad de activar LT *naïve*.
- ✓ Aumento en la expresión de complejos péptido antigénico/MHC. Este incremento es secundario no solo a una mayor síntesis de MHC, sino fundamentalmente, a una redistribución de estas moléculas desde las vesículas a la superficie celular.
- ✓ Síntesis de *nov*o y secreción de citoquinas y quimioquinas particulares, cuyo patrón particular dependerá del tipo de RRP activado en las CD en el propio seno del tejido afectado.

Por último, es necesario mencionar que no todas las CD encontradas en los OLS son células maduras, ya que una proporción de las mismas migra sin haber activado sus RRP, expresando un fenotipo relativamente inmaduro, caracterizado por la expresión de niveles bajos o moderados de MHC y de moléculas co-estimuladoras. A estas CD que presentan péptidos propios o derivados de cuerpos apoptóticos internalizados en condiciones anti-inflamatorias (7), se las denominó tolerogénicas debido a su rol clave en la inducción de la tolerancia periférica, al silenciar los clones autorreactivos y/o frenar la respuesta inmune cuando la infección se ha resuelto, mediante anergia clonal e inducción de Treg (8,13).

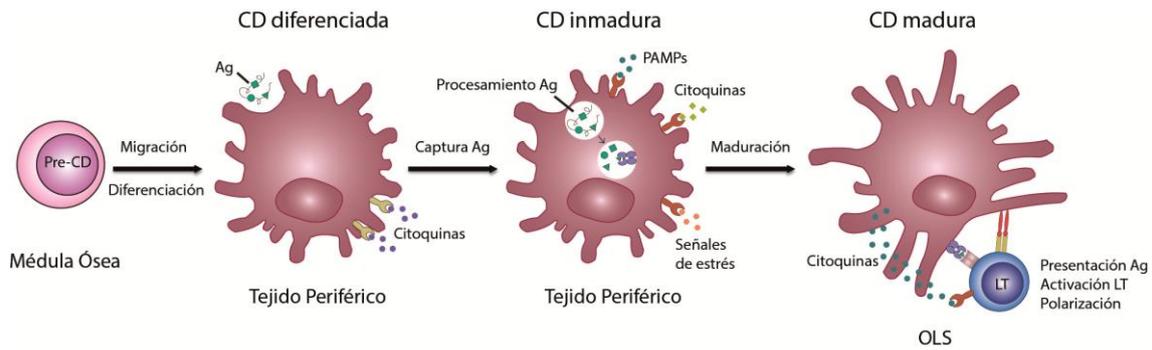


Figura 1. Ciclo de vida de las CD. El ciclo de vida de las CD transcurre a través de diferentes etapas que se describen en el texto y se resumen en la figura. Pre-CD: precursor de CD en sangre periférica.

1. 4. Papel de las CD en la inducción de la respuesta inmune adaptativa frente a procesos infecciosos o injuria

Como mencionamos previamente, las CD son CPA profesionales que expresan la cualidad única de activar a los LT *naïve*; son el “motor” y el “cerebro” de la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, la relevancia de las CD en la respuesta inmune no guarda sólo relación con su capacidad de activar una respuesta primaria T. Son ellas las que orientan el perfil particular en el que se diferenciarán las células T CD4⁺ al activarse: Th1, Th2, Th17, Tfh o Treg. Esta decisión depende, en última instancia, de la producción de citoquinas por las propias CD, principalmente, o de las producidas por otras células activadas en el área T. La producción de IL-12p70 favorecerá la diferenciación de las células T CD4⁺ en un perfil Th1; en cambio, en su ausencia y presencia de IL-4, producida por células NKT (del inglés **Natural Killer T**), mastocitos y basófilos, se promoverá la diferenciación hacia un perfil Th2. La producción de IL-1, IL-6 e IL-23 promoverá la diferenciación de las células T CD4⁺ en un perfil Th17, mientras que la producción de IL-21 e interacción de alta afinidad con el LT *naïve* derivará en un perfil Tfh. Por último, la producción de IL-10 junto al factor de crecimiento transformante o TGF (del inglés, **Transforming growth factor**)-β, promoverá la diferenciación del LT CD4⁺ en un perfil Treg (8–11) (figura 2).

Cada uno de estos perfiles pondrá en juego diferentes mecanismos inmunes. Brevemente, las células Th1 promoverán la activación del macrófago mediante la producción de IFN-γ, mientras que las células Th2 promoverán mediante la producción de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, la producción, movilización y activación de eosinófilos, la producción de anticuerpos (Ab, del inglés **Antibody**) IgE y la activación de los

mastocitos. Las células Tfh colaborarán con los linfocitos B, permitiéndoles su posterior diferenciación en plasmocitos productores de Ab. Las células Th17 promoverán la producción, movilización y activación de neutrófilos mediante la producción de IL-17 e IL-21 y 22, mientras que las células Treg mediarán la supresión de los diferentes mecanismos efectores propios de la inmunidad adaptativa mediante la producción de IL-10, TGF- β e interacciones célula-célula (8) (figura 2).

Actualmente, se considera que es el particular set de receptores activados de las CD en presencia de un proceso inflamatorio, el que determinará el patrón de citoquinas producidas por las mismas en los OLS, lo que definirá el perfil en el que se diferenciarán los LT CD4⁺ activados, que en definitiva será el necesario para resolver la inflamación (8,10,12,39). No obstante, otros estímulos sentidos por las CD inmaduras en la periferia, diferentes a los PAMPs y DAMPs, podrían también ejercer un papel modulador sobre el perfil de citoquinas producido por las CD (10,12,39).

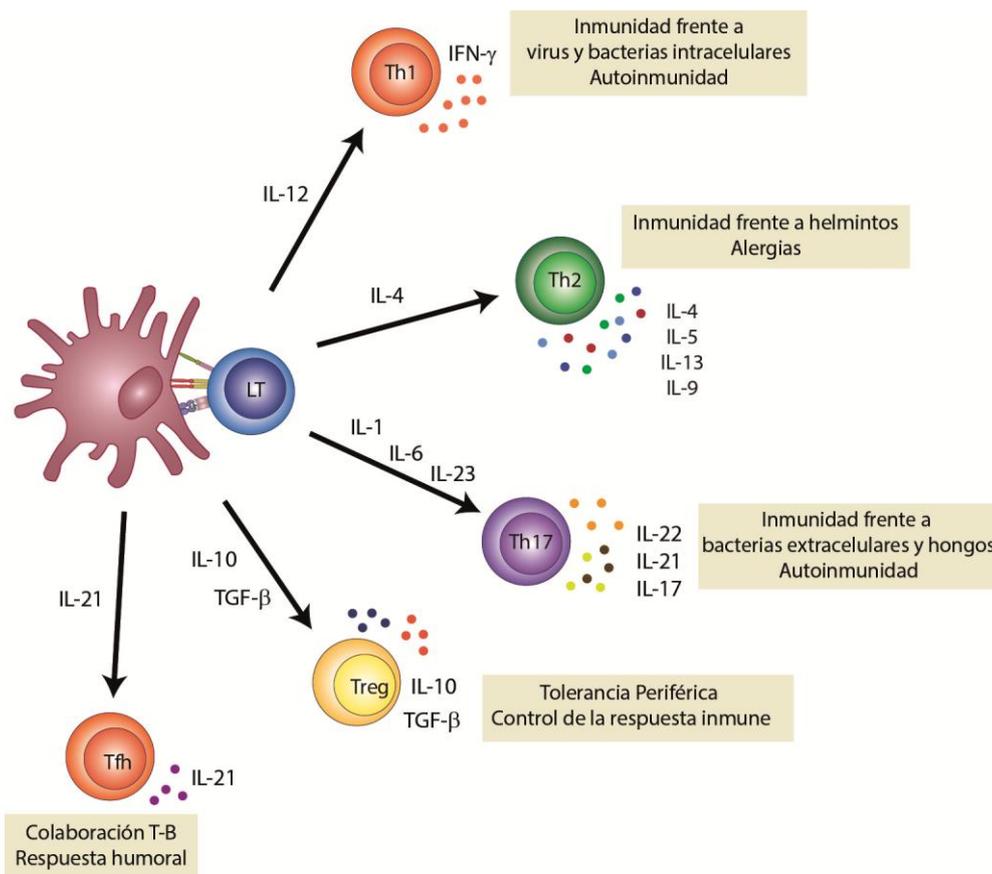


Figura 2. Plasticidad en la respuesta T CD4⁺. Se indican en la figura las citoquinas responsables de inducir la diferenciación de los diferentes perfiles funcionales propios de los linfocitos T CD4⁺, las citoquinas producidas por cada uno de ellos y su incumbencia en la inmunidad anti-infecciosa y en el desarrollo de fenómenos de hipersensibilidad y autoinmunidad. Adaptado de (8).

1. 5. Participación de las CD en respuestas inflamatorias alérgicas de las vías aéreas

Siendo un órgano que presenta comunicación con el exterior, el pulmón se encuentra continuamente expuesto a estímulos del medio ambiente como microbios, alérgenos, contaminación ambiental, entre otros, posibles amenazas para el huésped. No en vano, contiene una elaborada red de CD que le permiten reconocer estas señales.

Los alérgenos son Ag ambientales inoocuos que selectivamente evocan una respuesta inmune de tipo Th2 en los individuos atópicos (individuos predispuestos genéticamente a desarrollar respuestas inmunes inflamatorias ante estos Ag), conducente a la producción de Ab IgE. En los individuos no atópicos, la exposición a los alérgenos suele inducir la producción de bajos tenores de IgG que no conducen a ninguna manifestación patológica (8).

Las enfermedades alérgicas como la rinitis, la dermatitis atópica, la alergia alimentaria y el asma, pertenecen a las reacciones de Hipersensibilidad de tipo I, y todas estas presentan un origen común y tres etapas (8,40,41) (figura 3):

1. Sensibilización: implica la inducción de una respuesta Th2 que mediante la producción de IL-4 e IL-13 facilita la producción de IgE alérgeno-específica, la cual se unirá a los RFcε1 (receptores de IgE de alta afinidad) de los mastocitos (figura 3A).
2. Fase efectora temprana: Minutos después de una nueva exposición al alérgeno, comienza la fase temprana en la cual el mismo se une a las IgE del mastocito entrecruzando sus RFcε1, lo cual genera su activación y la liberación de los mediadores almacenados en sus gránulos, como la histamina, y los producidos *de novo*, como la prostaglandina D2 y el leucotrieno C4, que en conjunto mediarán las manifestaciones clínicas propias de esta fase (figura 3B).
3. Fase efectora tardía: Los mastocitos también liberarán quimioquinas y citoquinas orquestando el desarrollo de una respuesta inflamatoria local generada luego de horas o días post-re-exposición, que involucra la activación de las células presentes en el lugar y el reclutamiento de otros tipos celulares. Entre las primeras, se destacan las propias células epiteliales, las musculares,

los macrófagos y las células Th2; y entre las células reclutadas, principalmente los eosinófilos. Todas estas incrementarán el proceso inflamatorio (figura 3B).

En el caso de que el proceso se vuelva crónico, como en el asma, ante la re-exposición del alérgeno se desatará una respuesta rápida con elementos de la fase tardía, ya que, en este caso, el alérgeno impactará sobre un tejido comprometido seriamente en su estructura y funcionalidad, a causa de la hiperreactividad bronquial y producción excesiva de moco por las células mucosectoras (*goblet cells*) (8,40,41) (figura 3).

En los últimos años se ha reportado la participación de otras células en los procesos alérgicos y respuestas Th2 como las células NKT, los linfocitos de la inmunidad innata tipo 2 (ILCs2) y un subtipo de células T CD8⁺ llamadas Tc2. Las primeras inducen la producción de IL-33 por el epitelio, citoquina que favorece el perfil Th2, y las otras dos poblaciones producen citoquinas de este perfil (40).

Para que ocurran las diferentes etapas del proceso alérgico, es necesaria la inducción de una respuesta de inmunidad adaptativa polarizada hacia un perfil Th2 (8). Razón por la cual no sorprende que las CD desarrollen un rol clave en la inducción de estas patologías. En el asma, así como en los demás procesos alérgicos, las CD son las encargadas de iniciar y mantener las respuestas celulares de tipo Th2 hacia alérgenos internalizados (24) (figura 3). Son las responsables de endocitar al alérgeno y presentarlo a los linfocitos T CD4 *naïve* en el ganglio drenante (42). Sin embargo, la activación de la misma, dependerá también de las señales presentes en el foco inflamatorio, ya sean propias del Ag o generadas por otras células.

Hasta hace algunos años, el epitelio se consideraba solo una barrera física; sin embargo, actualmente se conoce el papel central que cumple en el control de la función de las CD pulmonares (41). En respuesta al daño o al estrés, las células epiteliales liberan múltiples citoquinas, entre ellas IL-33, GM-CSF, IL-1, IL-25 y TSLP (del inglés, *Thymic stromal lymphopoietin*), que controlarán el desarrollo de la inmunidad adaptativa hacia un perfil Th2 (41,43) (figura 3). Además, tanto IL-33 como TSLP, son capaces de promover la activación de los eosinófilos y mastocitos, en forma sinérgica con los RFcε1 (8,44).

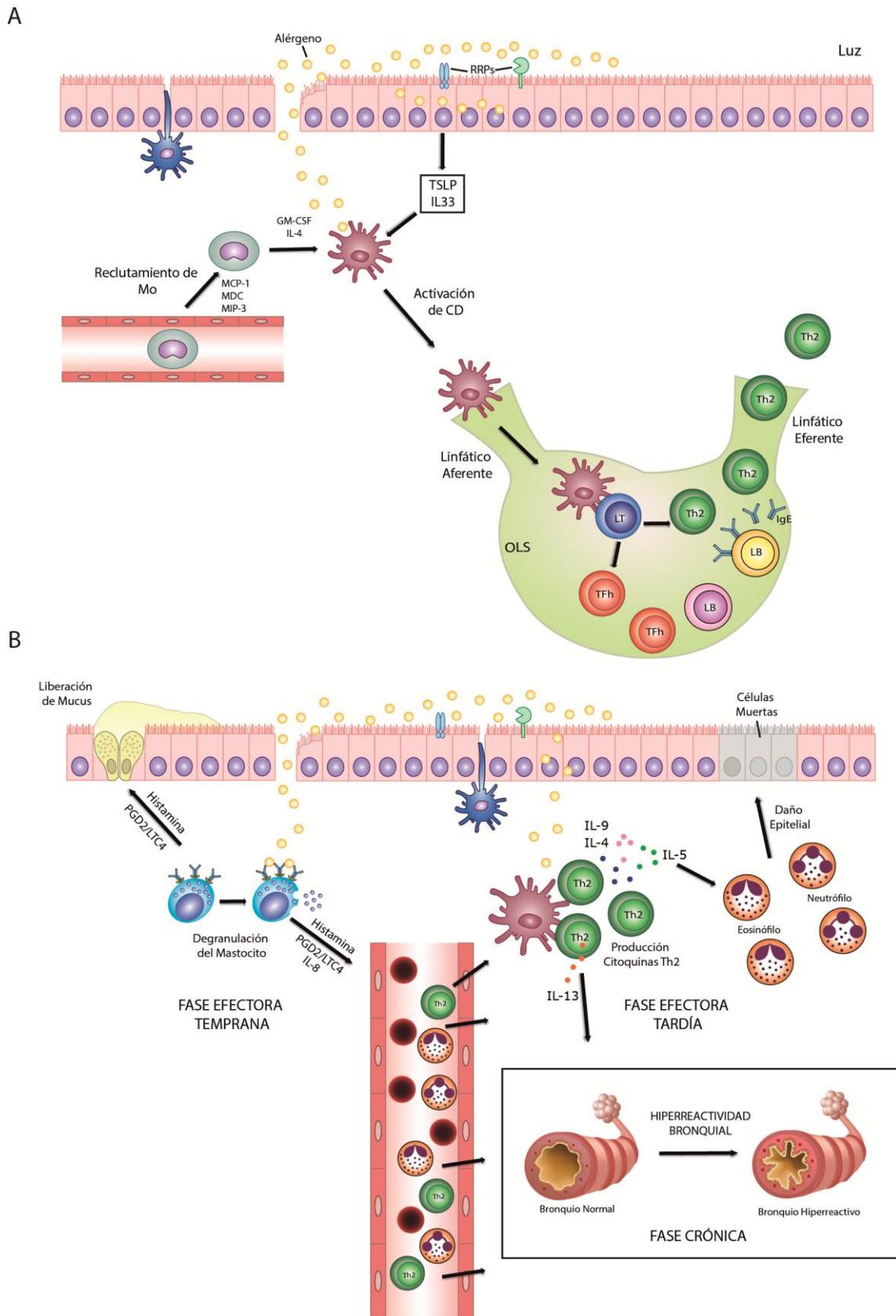


Figura 3. Distintas etapas del proceso alérgico: Fase de sensibilización (**A**), fase efectora temprana y tardía (**B**). Explicación en el texto. Modificado de (23,41)

1. 5. 1. Producción de TSLP y expresión del TSLPR en las células inmunes

El TSLP ha tenido un gran auge en los últimos años, habiendo sido implicado en el desarrollo de diferentes enfermedades alérgicas como el asma (45–48), la dermatitis atópica (49,50), y la rinitis (51,52). Más recientemente, se ha involucrado en el desarrollo de otras patologías no alérgicas como la fibrosis, la artritis reumatoidea y el cáncer (53). Interesantemente, también se ha descrito su función crítica en el mantenimiento de la homeostasis en las mucosas, como la intestinal, evitando respuestas autoinmunes y/o una inflamación exacerbada (54,55).

La función del TSLP en el humano y en el ratón es pleiotrópica, siendo el principal efecto la regulación de la activación, diferenciación y homeostasis de las células T, generado a través de la activación de las CD (55,56). El TSLP es una citoquina perteneciente a la familia de IL-2, que fue originalmente identificada como un factor promotor de crecimiento de células B inmaduras (57) y de progenitores T (58), producido por células estromales tímicas murinas, de allí su nombre. En el 2001, Reche y colaboradores demostraron la expresión de esta citoquina en células epiteliales activadas de pulmón, piel e intestino, principalmente (59). El receptor funcional del TSLP (TSLPR) es un complejo heterodimérico formado por la cadena α del receptor de IL-7 (IL-7R α) y otra cadena del receptor de TSLP propiamente dicho. Esta última cadena es miembro de la familia del receptor hematopoyético y se une con baja afinidad al TSLP; en cambio, combinada con la cadena del receptor de IL-7 α no sólo es más afín sino que es capaz de activar la traducción de señal vía STAT (del inglés, *Signal transducer and activator of transcription*) 3 y STAT5 (60).

Diversas células de la inmunidad innata y adaptativa presentan el TSLPR, tales como las células epiteliales, CD, Mo, macrófagos, mastocitos, basófilos, eosinófilos, LT y LB (54,61). Por otro lado, se han identificado diferentes fuentes de TSLP incluyendo células epiteliales, fibroblastos, células musculares lisas, estromales, queratinocitos, mastocitos y basófilos activados (54,61). Recientemente, Kashyap y colaboradores han descrito que las CD y los Mo humanos también pueden expresar el ARNm (ARN mensajero) de TSLP (62).

Se ha demostrado que la producción de TSLP puede ser inducida por diversos estímulos exógenos como alérgenos, trauma, exposición a ligandos de TLR y a citoquinas pro-inflamatorias y derivadas de Th2 (63). Los factores que regulan negativamente la expresión de TSLP no se conocen aún en profundidad, aunque ya se ha demostrado que el IFN- γ , el TGF- β y la IL-17 suprimen la liberación de TSLP por los queratinocitos humanos estimulados por poly I:C (del inglés, *Polyinosinic-polycytidylic acid*), un ligando viral de TLR3. Sin embargo, factores reguladores de la inflamación derivada de Th2, como IL-10, TGF- β o IFN- γ , no muestran un efecto inhibitorio sobre la liberación de TSLP en explantes humanos de piel estimulados con citoquinas Th2 pro-inflamatorias (63). A partir de técnicas inmunohistoquímicas en muestras de piel de pacientes con dermatitis atópica (respuesta Th2), dermatitis por contacto (respuesta Th1) y lupus eritematoso (respuesta autoinmune), Soumelis y colaboradores (49) han reportado la expresión selectiva del TSLP en queratinocitos propios de las secciones lesionadas de las muestras de pacientes con dermatitis atópica, siendo indetectable la expresión en las secciones de piel normal de estos pacientes y en las muestras de las otras dos patologías analizadas. Actualmente, se sugiere el uso del TSLP y su receptor como biomarcador del asma (64,65) y dermatitis atópica (66), así como *targets* o blancos para el tratamiento de las mismas (43,67).

1. 5. 2. Modulación de las CD por TSLP

El TSLP derivado del epitelio activado, imprime en las CD un fenotipo característico que polariza a los LT CD4⁺ *naïve* hacia un perfil Th2 particular llamado “Th2 inflamatorio”, caracterizado principalmente por una producción elevada de TNF- α y nula de IL-10, además de las típicas citoquinas del perfil: IL-5, IL-4, IL-13, IL-9 (44). Además de tener efectos sobre otras células inmunes, el TSLP actúa directamente sobre las células T, promoviendo su supervivencia y proliferación en respuesta a la activación del TCR (TCR, del inglés, *T cell receptor*) (36) (figura 4).

No obstante, los efectos del TSLP sobre las CD varían dependiendo del subtipo involucrado; la activación con TSLP tanto de las CD de la mucosa intestinal como de las deciduales presentes en la interfase materno-fetal, inducen un perfil Treg mediado por TGF- β e IL-10 (68,69). También se ha reportado la relevancia del TSLP sobre las CD

tímicas para la diferenciación de LT CD4⁺ en Treg naturales (70). Esto demuestra un rol dual del TSLP en la fisiología de las CD, siendo estrictamente regulado por el microambiente, incluyendo el nivel de expresión de la citoquina presente en el mismo, y el subtipo celular involucrado, lo cual condiciona a un perfil de respuesta anti- o pro-inflamatorio (55).

Similar a lo observado en las CD expuestas a diferentes estímulos activadores, como el CD40 ligando (CD40L) y ligandos del TLR4 (LPS), el TSLP incrementa fuertemente la expresión de las moléculas estimuladoras HLA (del inglés, *Human leukocyte antigen*)-DR (MHC II), CD40, CD80, CD86, CD83, y OX40L, tanto en las CD derivadas de Mo como en las CD de sangre periférica (49,71,72). Sin embargo, a diferencia de los estímulos madurativos antes nombrados, el TSLP no induce sobre las CD la producción de ningún miembro de la familia de IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27), ni de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6, IFN-I e IFN- γ ; así como tampoco induce la producción de IL-4 ni IL-13, ni de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (47,73).

Ito y colaboradores (74) han demostrado que el TSLP, a diferencia de otros estímulos madurativos como poly I:C, induce la expresión de la molécula OX40L sobre las CD aisladas de sangre periférica, así como luego fue reportado lo mismo en CD derivadas de Mo, por Guo y su grupo (71). Esta molécula co-estimuladora, perteneciente a la súperfamilia del TNF, ha sido implicada en la interacción entre LB y LT, CD y LT, y la iniciación de la respuesta Th2 (74), independientemente de IL-4, mediante su interacción con OX40 expresado en células T *naïve* activadas (72). La polarización hacia una respuesta Th2 inflamatoria, con producción de TNF- α , fue inhibida completamente en el co-cultivo entre CD tratadas con TSLP y LT CD4⁺ *naïve* en presencia de Ab bloqueante para OX40L (74); esto también resultó así cuando se adicionó IL-12 exógena, lo que además polarizó la respuesta hacia un perfil Th1, demostrando que esta citoquina es dominante sobre OX40L. Esto último permite entender por qué también se ha visto involucrada esta molécula en la inducción de un perfil Th1 propio de respuestas autoinmunes (44,74,75).

A partir de estos resultados, Liu (44) ha propuesto que las CD estimuladas con TSLP crean un microambiente permisivo para la respuesta Th2 inflamatoria: 1) induciendo la expresión de OX40L, que al interactuar con su receptor OX40 en el LT, desencadena la

producción de IL-4 por el mismo, y esto a su vez genera la activación del factor de transcripción que define el perfil Th2, GATA3; y 2) al no inducir la síntesis de citoquinas relacionadas al perfil Th1, es decir, en ausencia de IL-12.

De acuerdo con lo anterior, cabe notar que la señal que gatilla el inicio de la respuesta Th2 es la inducción de OX40L sobre las CD mediada por TSLP y la interacción de este con su receptor en los LT CD4⁺ *naïve*, y no lo es la presencia de IL-4 como se creía inicialmente. La presencia de IL-4 sí es crítica para potenciar la respuesta y mantenerla una vez que ya ha sido gatillada (74). Sumado a esto, Seshasayee y colaboradores (76) observaron que el tratamiento de ratones con Ab bloqueante para OX40L inhibió sustancialmente la respuesta inflamatoria generada por TSLP en pulmón y piel, incluyendo la infiltración de células Th2, la secreción de citoquinas y la producción de IgE, así como también inhibió la inducción de la respuesta Th2 en un modelo de asma en ratones y primates no humanos. Por todo esto, se ha propuesto a las moléculas OX40L-OX40 como *blancos* terapéuticos en diferentes patologías inflamatorias (72,77).

Por otro lado, las CD estimuladas con TSLP producen altos niveles de quimioquinas asociadas a las respuestas alérgicas como eotaxina-2 e IL-8, las que reclutan a eosinófilos y neutrófilos, respectivamente, así como CCL17 o TARC (del inglés, *Thymus and activation-regulated chemokine*) y CCL22 o MDC (del inglés, *Macrophage-derived chemokine*), las cuales favorecen el reclutamiento de células Th2 hacia los sitios inflamatorios (78).

En resumen, el TSLP producido por las células epiteliales activadas podría rápidamente inducir una respuesta inflamatoria alérgica que constaría de dos fases: la innata, donde participan los mastocitos, las células NKT y las CD, mediante la producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias; y la adaptativa, cuyas protagonistas son las células Th2 inflamatorias generadas por las TSLP-CD (figura 4) (44).

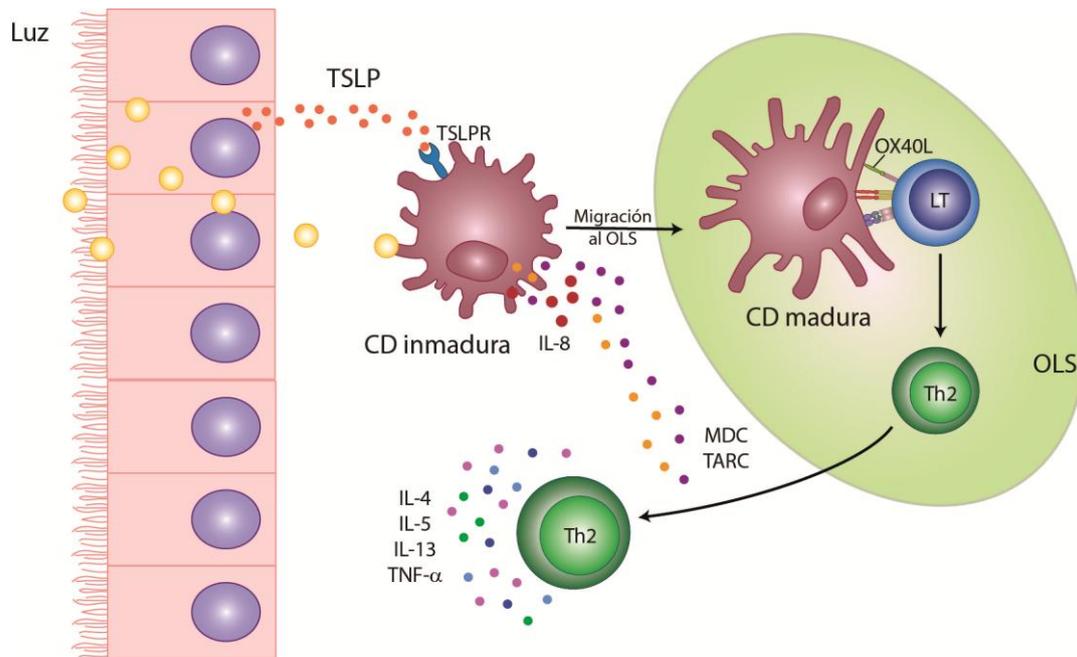


Figura 4. Efectos del TSLP sobre las CD en un proceso alérgico. El esquema representa los efectos del TSLP liberado por el epitelio en respuesta al alérgeno, el cual activa a las CD inmaduras. Por su parte, las CD activadas producen IL-8 que favorece el reclutamiento de los neutrófilos, así como TARC y MDC. Al llegar al OLS, las CD maduras, mediante la expresión de la molécula OX40L, logran la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ *naïve* hacia un perfil Th2 Inflamatorio que será reclutado por las quimioquinas MDC y TARC, producidas por las propias CD estimuladas con TSLP, hacia el tejido inflamado y producirán allí las citoquinas características del perfil: IL-4, IL-5, IL-13 y TNF α . Adaptado de (47).

2. Diálogo entre el sistema nervioso y el sistema inmune: Neuroinmunomodulación

En los animales superiores, la homeostasis se encuentra regulada por tres sistemas interrelacionados: el sistema nervioso, el inmune y el endócrino. En la actualidad es aceptado que la comunicación existente entre estos permite que el sistema nervioso central (SNC) reciba información de la periferia, y que frente a estímulos que superen un determinado umbral, responda adecuadamente con el fin de mantener la homeostasis del organismo (79). Estos sistemas se encuentran conectados tanto anatómicamente como funcionalmente; desde un estado febril al estrés, la influencia de un sistema sobre el otro se hace presente a fin de resolver la infección o la injuria, logrando la eliminación del estado de alerta o peligro (80). Tanto es así, que se ha reportado la presencia de receptores para IL-1, IL-6 y TNF- α en el SNC, citoquinas proinflamatorias secretadas en el estado febril que pueden cruzar la barrera hematoencefálica, así como también de RRs como el TLR4 (80,81).

Recién hace pocos años ha cobrado real importancia la relación entre los sistemas nervioso e inmune, ya que clásicamente se consideraban sistemas individuales, totalmente independientes, que cumplían cada uno su exclusiva función. En los primeros estudios realizados, se consideró que este diálogo era unidireccional en el sentido “de neuroendócrino hacia inmune”, debido a la inervación observada de los OLS por el sistema nervioso autónomo (SNA) (81). Luego, se comprobó que ambos sistemas mantienen una intrincada comunicación bidireccional, mediante la liberación endócrina y parácrina de hormonas, citoquinas y neuromediadores (79,80).

En este aspecto, en la actualidad está claro que la base de esta comunicación está en el lenguaje común existente entre los sistemas. Las evidencias experimentales acumuladas hasta la actualidad, indican que, a) las células del sistema inmune, endócrino y nervioso, expresan receptores para citoquinas, hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos; b) productos de origen inmune o neuroendócrino, coexisten en tejidos linfoides, endócrinos y neurales; c) mediadores endócrinos y neurales pueden afectar al sistema inmune; y d) mediadores inmunes pueden afectar al sistema endócrino y al sistema nervioso (82,83).

El SNC puede controlar al sistema inmune mediante tres vías: sistémica, regional y local (81). En reglas generales, el sistema nervioso periférico es la primera línea de defensa en los sitios inflamados a través de la liberación de neuropéptidos que generalmente incrementan la respuesta inflamatoria; sin embargo, a nivel regional, por lo general la inhiben, a través de la inervación de los órganos linfoides (84–88). Finalmente, el sistema neuroendócrino controla la inflamación a nivel sistémico, mediante la liberación de glucocorticoides vía eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) (81,83).

El SNA, que se encarga de regular las funciones viscerales del organismo de manera involuntaria, se divide en sistema nervioso simpático y sistema nervioso parasimpático. Estos dos sistemas tienen bases anatómicas y funcionales diferentes, pero ambos se tratan de fibras preganglionares mielinizadas que hacen conexiones sinápticas en centros denominados ganglios, con fibras postganglionares no mielinizadas las cuales inervan a los órganos efectores. La mayor parte de los órganos se encuentran

inervados por fibras provenientes de ambas divisiones del SNA y la respuesta es usualmente opuesta, aunque, en algunas circunstancias, puede ser semejante (87).

2. 1. Control de la respuesta inmune por el SNA simpático o adrenérgico

El sistema nervioso simpático es la rama con más eferencias del SNA, y sus fibras postganglionares, mayormente son noradrenérgicas, es decir, liberan norepinefrina (NE). Este neurotransmisor, junto con la epinefrina liberada por la médula adrenal al torrente circulatorio, se denominan catecolaminas (CAs), y son los principales productos del sistema simpático. Este sistema es el encargado de dirigir la respuesta adaptativa al estrés; en presencia de estresores físicos o psicológicos, el eje simpático-adrenal y el eje HPA se activan y liberan CAs y glucocorticoides con el objetivo de recuperar la homeostasis perdida. Ejemplo de estresores físicos son las citoquinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6 y TNF- α , ya que estimulan la respuesta al estrés (87). Como cualquier estresor, generan la liberación sistémica de epinefrina y de glucocorticoides desde la glándula adrenal, y la secreción de NE a nivel regional, como por ejemplo en los órganos linfoides, así como localmente en el sitio inflamado.

Aunque muchos órganos reciban inervación de ambas divisiones del SNA, es común que una predomine sobre la otra. Los órganos linfoides reciben principalmente fibras simpáticas, las cuales liberan NE en región perivascular y parenquimal de los mismos, regulando el tráfico y la funcionalidad de las células inmunes, así como también su desarrollo en el caso de los órganos linfoides primarios (87,89). No obstante, se ha reportado interacción neuroinmune en otros tejidos no linfoides, como por ejemplo, la piel y el pulmón (83).

Se ha demostrado la presencia de un sistema adrenérgico no neuronal en las células inmunes, con expresión de enzimas que degradan las CAs, MAO (**M**onoamino oxidasa) y COMT (**C**atecol-**O**-metiltransferasa), así como receptores adrenérgicos (ARs, del inglés *adrenergic receptors*) y maquinaria para la síntesis de las mismas. Se ha reportado que la expresión de los diferentes elementos puede ser modulada por la activación celular (83,90–92).

Los ARs son receptores de siete pasos transmembrana acoplados a proteína G (GPCR, del inglés *G protein-coupled receptor*) y pueden dividirse en dos grupos principales: los

α y los β , los cuales a su vez se dividen en α_1 , α_2 , β_1 , β_2 y β_3 , cada uno de ellos tiene a su vez, más de un subtipo. Se ha reportado que la NE y la epinefrina activan estos ARs presentes en CD, Mo, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos, siendo predominantes los β_2 . Se considera que la respuesta al estímulo adrenérgico depende del AR involucrado, del estado de diferenciación y de la activación de la célula inmune, así como de la presencia del Ag y su naturaleza (83,87).

La estimulación con NE sobre los LT CD4⁺ *naïve* incrementa la diferenciación hacia células Th1; no obstante, inhibe sus funciones cuando se encuentra terminalmente diferenciada. Esto puede relacionarse con las variaciones en la expresión de los ARs en los diferentes estados; los β_2 se observan aumentados en las CD maduras con LPS, así como en las células diferenciadas a Th1, mientras que se encuentran disminuidos en las diferenciadas a Th2 (83).

La evidencia acumulada hasta el momento sugiere que la NE podría influenciar la presentación antigénica, activación, proliferación y diferenciación de las células T, debido a la presencia de ARs en las células involucradas en estos procesos, y al hecho de que la inervación simpática se encuentre restringida al área paracortical tanto en bazo como en ganglios (93).

En resumen, se ha sugerido que el rol del sistema simpático sobre la inmunidad innata es limitar la respuesta inflamatoria hacia patógenos, modulando el tipo y la potencia de la respuesta adaptativa. Una regulación anormal de estos mecanismos puede contribuir a desórdenes como infecciones crónicas y patologías autoinmunes o alérgicas; de hecho, en condiciones de estrés o ansiedad, eventos en los que la actividad simpática se ve incrementada, estos desórdenes se encuentran exacerbados (88).

2. 2. Control de la respuesta inmune por el SNA parasimpático o colinérgico

El sistema nervioso parasimpático inerva múltiples órganos y juega un importante rol en regular un conjunto diverso de funciones fisiológicas como la frecuencia cardíaca, la secreción hormonal, la peristalsis gastrointestinal, la digestión, la inflamación y la función inmune (94). La acetilcolina (ACh, del inglés *Acetylcholine*) es el neurotransmisor por excelencia de este sistema. No obstante, las fibras

preganglionares del sistema simpático así como algunas fibras posganglionares del mismo, como las que inervan las glándulas sudoríparas y algunos vasos sanguíneos que riegan la musculatura esquelética, también son colinérgicas. Por último, la ACh es el neurotransmisor implicado en la unión neuromuscular.

2. 2. 1. Sistema colinérgico neuronal

En las terminales nerviosas, la ACh es sintetizada a partir de colina y acetil coenzima A en una reacción catalizada por la colina acetiltransferasa (ChAT, del inglés ***Choline acetyltransferase***). La colina es incorporada a la célula gracias a la acción de un transportador de colina de alta afinidad (ChT1, del inglés ***Choline transporter 1***). Una vez sintetizada es transportada dentro de vesículas sinápticas por el transportador de ACh vesicular (VAcHT, del inglés ***Vesicular Acetylcholine transporter***) hasta ser exocitada, luego de la despolarización de la membrana presináptica (1,95) (figura 5).

El tiempo en el cual la ACh puede ejercer su acción en el espacio presináptico y otros compartimientos es muy limitado, ya que es rápidamente degradada, principalmente, por la enzima acetilcolinesterasa (AChE, del inglés ***Acetylcholinesterase***), presente en la membrana pre y postsináptica (figura 5); a diferencia de las CAs que exclusivamente terminan su efecto por la recaptación de las mismas mediada por sus receptores (96). Esta enzima es encontrada en la mayoría de los tejidos y fluidos, existiendo diversas isoformas (83).

La acción biológica de la ACh es mediada por dos grupos de receptores: los nicotínicos (nAChR, del inglés ***nicotinic Acetylcholine receptor***) y los muscarínicos (mAChR, del inglés ***muscarinic Acetylcholine receptor***). El primero es un receptor ionotrópico, el mismo se encuentra acoplado directamente a un canal iónico; mientras que los mAChR son metabotrópicos, los cuales desencadenan una cascada de acontecimientos químicos que concluye en la apertura de canales iónicos vecinos. Estos receptores poseen una amplia distribución tisular y pueden modular diferentes funciones dependiendo del subtipo particular de receptor que se active (97,98) (figura 5).

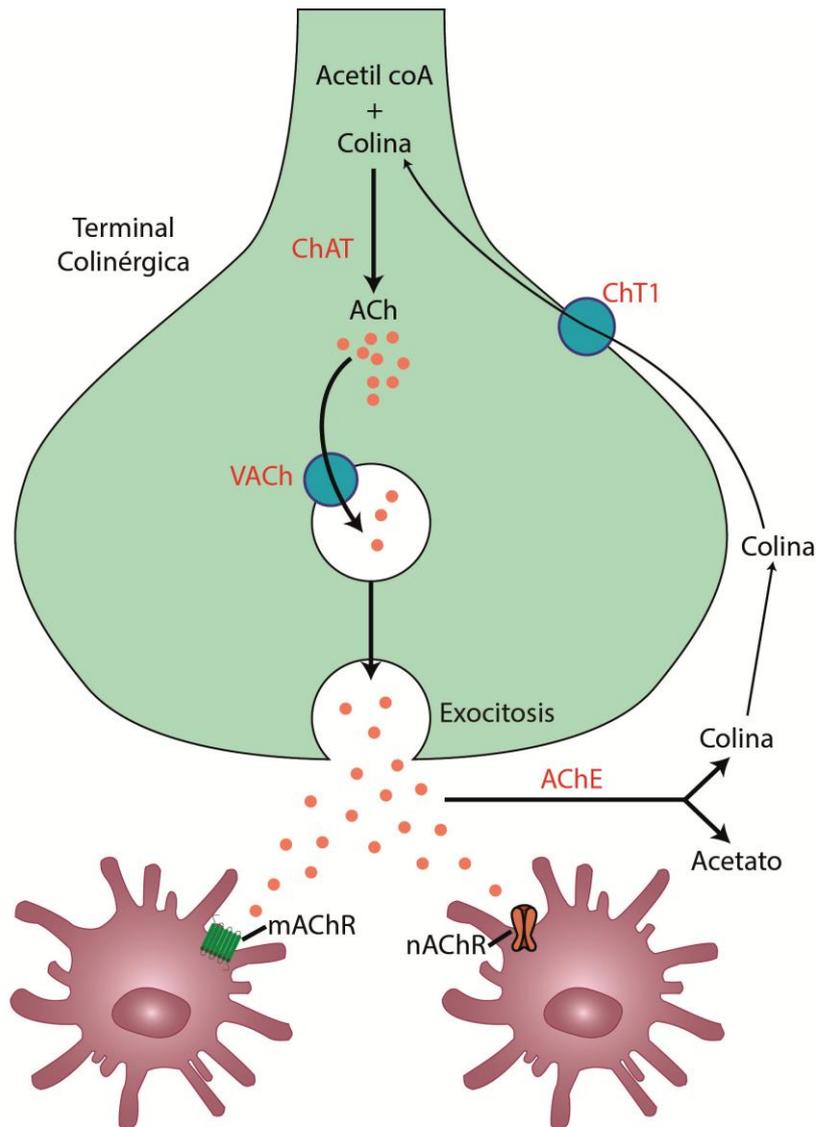


Figura 5. Síntesis, transporte y degradación de ACh en una terminal nerviosa e interacción con mAChR y nAChR en las CD. Explicación en el texto. Modificado de (99).

2. 2. 1. 1. nAChR

Los nAChR forman parte de la súperfamilia de receptores de tipo Cys-loop, una de las tres que conforman los receptores de canales iónicos regulados por ligandos (“*ligand-gated ion channels*”). Estos canales iónicos son proteínas transmembrana que pueden encontrarse en diferentes estados conformacionales. Una vez que se une la ACh, el canal iónico se abre permitiendo el ingreso de iones Na^+ y Ca^{2+} , lo que cambia el potencial de membrana, llevando a una rápida respuesta celular. La re-estimulación constante del receptor puede conducir a un estado de desensibilización (98,100).

Los nAChR son los involucrados en las sinapsis entre las neuronas pre y posganglionares de los sistemas simpático y parasimpático, y también en las membranas de fibras musculares esqueléticas en la unión neuromuscular. El nAChR está conformado por 5 subunidades (pentámero), que a su vez contienen 4 dominios transmembrana y una porción extracelular muy alargada. El pentámero debe poseer como mínimo dos subunidades α , cada una de las cuales une una molécula de ACh (98,100) (figura 6).

Los nAChR pueden ser subdivididos a su vez, en 3 familias: a) los musculares que se unen a ligandos tales como nicotina y α -bungarotoxina y están formados por 2 subunidades α en combinación con 4 posibles subunidades más: β , δ y γ , o ϵ ; b) los neuronales homoméricos que están formados únicamente por subunidades $\alpha 7$ o $\alpha 8$; y c) los neuronales heteroméricos que están formados tanto por subunidades α como β , y se diferencian con el anterior principalmente en que estos no unen α -bungarotoxina mientras que los homoméricos si lo hacen (figura 6). Existe además, una gran diversidad en la estructura de los nAChR; al día de hoy, se han descrito 10 cadenas α ($\alpha 1$ - $\alpha 10$) y 4 cadenas β ($\beta 1$ - $\beta 4$) diferentes (83), generando múltiples combinaciones posibles, es decir, múltiples receptores con propiedades diferentes (98,100,101).

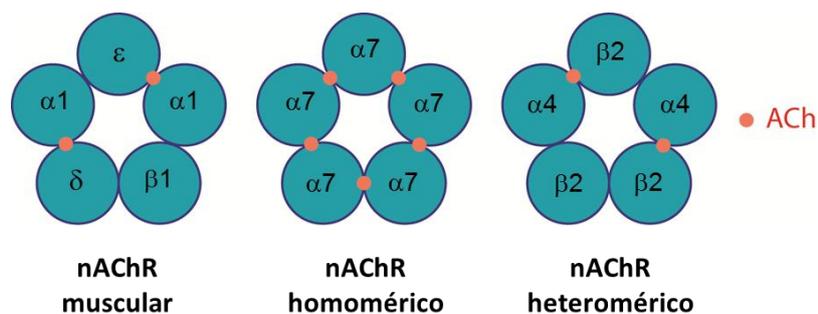


Figura 6. Diferentes estructuras y subunidades de los nAChR. Explicación en el texto.

2. 2. 1. 2. mAChR

Los mAChR pertenecen a la súperfamilia de GPCR: están formados por una subunidad que posee 7 dominios transmembrana y una porción citoplasmática muy prolongada con 16 dominios (figura 7). Se han descrito 5 subtipos de mAChR que se denominan de M1 a M5. Los mAChR median respuestas relativamente lentas (100 a 250 ms de

duración) y, dependiendo del subtipo de receptor que se active pueden mediar acciones estimuladoras (M1, M3 y M5) o inhibitorias (M2 y M4), debido a que se encuentran acoplados a diferentes subunidades de la proteína G, que actúan como segundos mensajeros, iniciando las vías de transducción de señales implicadas, que finalizan con el incremento de Ca^{2+} intracelular o el descenso de AMPc, respectivamente (40,101).

Los mAChR se encuentran en todas las células efectoras estimuladas por las neuronas posganglionares del sistema nervioso parasimpático, así como en las estimuladas por las neuronas colinérgicas posganglionares del sistema nervioso simpático. Por lo tanto, se encuentran ampliamente distribuidos en tejidos periféricos; mientras que en el SNC, los mAChR están presentes en terminales sinápticas, regulando la liberación de neurotransmisores (autorreceptores), junto con heteroreceptores α -adrenérgicos (94,101).

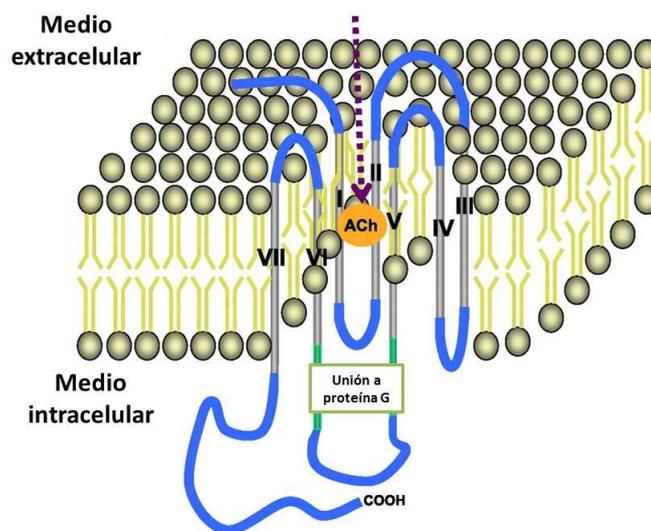


Figura 7. Estructura del mAChR. Se encuentra compuesto por 7 dominios transmembrana (gris) conectados por 3 bucles intracelulares y extracelulares (azul). La unión a la proteína G está ubicada en la unión del tercer bucle intracelular y el sexto dominio transmembrana (verde). El sitio de unión a ACh está localizado entre los dominios transmembrana (naranja). Adaptado de (102).

A diferencia de los nAChR que son más rápidos para activarse y generalmente excitatorios, los mAChR, son más lentos, y pueden ser excitatorios o inhibitorios. Los antagonistas de los primeros son el curare y la mecamilamina (MM), y el agonista más

importante, la nicotina; mientras que los mAChR son bloqueados por la atropina (AT) y estimulados por la muscarina y pilocarpina (98,103).

2. 2. 1. 3. Vía colinérgica anti-inflamatoria

Tracey y colaboradores (104) han reportado la existencia de un mecanismo reflejo inmunomodulatorio mediado por el nervio vago, capaz de controlar la respuesta inmune de forma efectiva, al cual llamaron “reflejo inflamatorio”. Las vías aferentes del nervio vago detectan la presencia de componentes inflamatorios, que comunican la información al SNC, volviendo el impulso por la rama eferente del nervio vago y culminando en la inhibición de la activación del macrófago esplénico. Esta vía eferente, llamada “vía colinérgica anti-inflamatoria” se caracteriza por la inhibición de la liberación de mediadores proinflamatorios, tales como TNF- α , IL-1 β , IL-18 e IL-6, producidos por macrófagos estimulados por endotoxinas bacterianas (86,104,105). Esta vía colinérgica anti-inflamatoria media sus efectos a través del reclutamiento y activación de la vía Jak2/STAT3 por la subunidad nicotínica $\alpha 7$ y a través de la inhibición de la activación y translocación nuclear del factor transcripcional NF- κ B (105) (figura 8).

Inicialmente, se creía que el nervio vago eferente inervaba directamente al bazo, donde la ACh liberada se unía a los macrófagos, a través del $\alpha 7$ -nAChR. Sin embargo, se ha demostrado que no existe la presencia de inervación vagal directa en los OLS. Rosas Ballina y Tracey (106) propusieron, entonces, que la inervación vagal induce estimulación de la vía simpática mediante interacción de las mismas en el ganglio mesentérico, lo que induce la liberación de NE en la terminal nerviosa del bazo. En este escenario, la NE liberada se uniría a los $\beta 2$ -ARs de los LT de memoria los cuales realmente serían la fuente de ACh esplénica, y la ACh liberada por los mismos finalmente se uniría al macrófago vía $\alpha 7$ -nAChR (figura 8). Consistente con esta idea, se ha observado un aumento de nivel de ACh seguido de la estimulación eléctrica de los nervios eferentes esplénicos. En contraste, Bratton y colaboradores, demostraron que no existe una interacción simpático-vagal en el ganglio mesentérico, por lo cual más estudios son necesarios (83,94).

La estimulación del nervio vago eferente ha mostrado inhibir la activación de macrófagos en modelos murinos de endotoxemia, peritonitis y shock séptico. En este mismo sentido, se ha demostrado el rol inmunomodulatorio de la vía colinérgica a través del $\alpha 7$ -nAChR en un modelo de injuria pulmonar aguda inducida por sepsis (107). Por otro lado, esta vía modula el sistema inmune presente en el intestino, el cual a diferencia del bazo, sí recibe inervación vagal directa y la estimulación eléctrica del mismo resulta en la liberación de ACh, la cual se une a los $\alpha 7$ -nAChR de los macrófagos presentes en la pared intestinal (94).

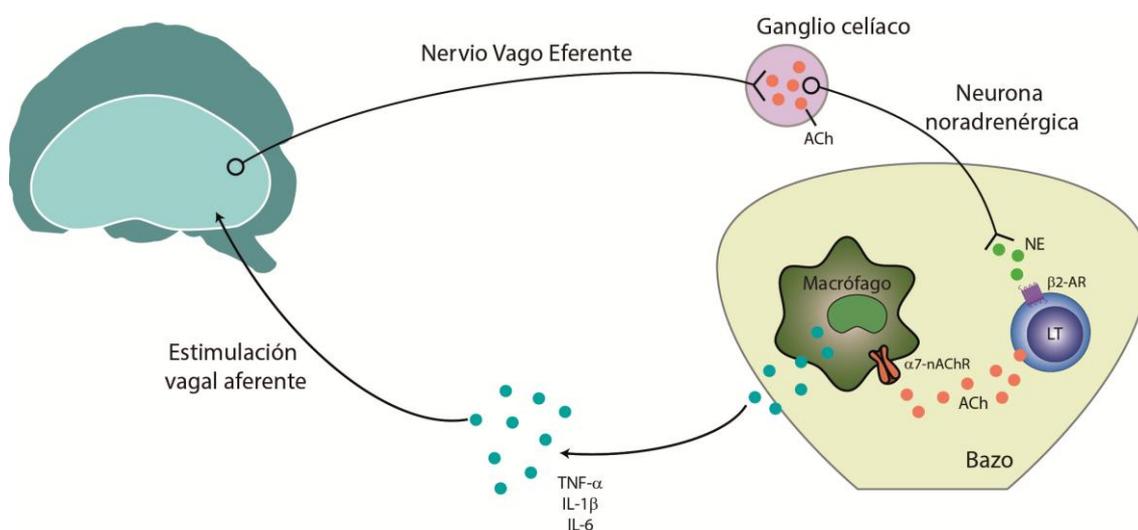


Figura 8. El reflejo inflamatorio y la vía colinérgica anti-inflamatoria. Explicación en el texto. Modificado de (105).

2. 2. 2. Sistema colinérgico no-neuronal

En los últimos años, se ha establecido que la ACh excede su papel como principal neurotransmisor del sistema nervioso parasimpático. Más aún, parecería que la ACh se encuentra involucrada en la regulación local de numerosas funciones celulares, en una amplia variedad de sistemas no-neuronales, no solamente en el sistema inmune (1). En humanos, tanto ACh como ChAT han sido detectadas en: a) células epiteliales (de los tractos respiratorio, gastrointestinal, urogenital y en la epidermis); b) células mesoteliales (pleura y pericardio); c) células endoteliales; d) células musculares; e) células del sistema inmune: células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *Peripheral blood mononuclear cells*), macrófagos alveolares, CD; y f) células trofoblásticas de placenta (1,101,108,109).

La amplia distribución tisular de ChAT en células no-neuronales suele estar acompañada por la presencia de colinesterasas y un patrón de expresión diferencial de nAChR y/o mAChR. A su vez, Wessler y colaboradores han detectado la presencia de transportadores de cationes orgánicos (OCT, del inglés *Organic cation transporter*) en células no neuronales productoras de ACh, y han sugerido que permitirían la exocitosis del neurotransmisor en las células mismas (1–4).

Dentro del sistema inmune, la expresión de un sistema colinérgico no neuronal fue ampliamente demostrada en linfocitos (96,110–112). Los mismos expresan la mayoría de los componentes encontrados en el sistema nervioso, incluyendo ACh, ChAT, ChT1, mAChR, nAChR y AChE.

La estimulación de los linfocitos T y B con ACh u otro agonista de los mAChR induce su proliferación, al incrementar el Ca^{2+} intracelular, aumentando la expresión del factor de transcripción c-fos, la producción de IL-2 y la transducción de señales de la misma. Además, incrementa la síntesis de óxido nítrico, determinando la implicancia de los mAChR en los efectos citotóxicos de los LT. Estas funciones probablemente sean mediadas por los mAChR M1, M3 y M5 (96,112). La estimulación aguda de los nAChR con ACh o nicotina causa un incremento en el flujo transiente de Ca^{2+} , probablemente a través del $\alpha 7$ -nAChR. Por el contrario, la estimulación crónica de los nAChR (como ocurre en los individuos fumadores) suprime la proliferación y actividad de las células T al disminuir la expresión de los mismos (96).

En las células inmunes se ha descrito la presencia de determinados subtipos de receptores colinérgicos, aunque los resultados aún permanecen controvertidos. Los LT expresan M4 y M5, mientras que M1, M2 (96) y el M3 (113) pueden variar entre individuos, mientras que en macrófagos se ha descrito la presencia de M2 y M3, con diferencias en su expresión dependiendo del nivel de activación de los mismos (114,115). En cuanto a los nAChR, se ha reportado la presencia de $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ en linfocitos siendo variable la expresión entre los individuos, así como una mayor expresión de $\alpha 7$ en linfocitos estimulados con nicotina (96,116,117). Por otro lado, mientras que en los macrófagos se observó la presencia de $\alpha 7$, $\alpha 4$, $\alpha 1$ y $\alpha 10$, en las CD inflamatorias se ha reportado la expresión de $\alpha 7$ y, al igual que en linfocitos y Mo,

este receptor se encontró aumentado al estimular con nicotina, de manera dosis-dependiente (105,118–120).

Los receptores colinérgicos presentan variabilidad inter-individual en su expresión en las diferentes células inmunes, y se ha sugerido que esto estaría sujeto a factores genéticos y/o ambientales. En este último caso, se ha propuesto la implicancia de la modulación de $\alpha 7$ por la exposición al tabaco (120).

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha reportado la presencia de un sistema colinérgico completo en las CD humanas, con presencia de M3, M4 y M5, y las enzimas AChE y ChAT. Observamos, además, que la presencia de carbacol, análogo farmacológico de la ACh, durante la diferenciación de las CD demostró incrementar notoriamente la producción de TNF- α e IL-8 y la expresión de HLA-DR y CD86, todos efectos mediados por los mAChR. Este agonista colinérgico también logró activar a las CD ya diferenciadas, al aumentar la producción de TNF- α , la expresión de HLA-DR y su capacidad estimulatoria en un cultivo alogeneico, pero no en las CD maduras, en las cuales estos parámetros gatillados por el LPS fueron inhibidos por el carbacol, observándose lo mismo en la producción de IL-12. Observamos resultados similares con la ACh (109).

Asimismo, hemos reportado un nuevo rol de la ACh no neuronal, sintetizada por células trofoblásticas: la modulación de la migración y activación de las CPA, como Mo y CD, favoreciendo un perfil de respuesta inmunosupresora que contribuye al mantenimiento de la homeostasis en la interfase materno-fetal (108).

Estas observaciones sugieren que la ACh es capaz de ejercer un complejo efecto inmunomodulador sobre las CD, cuya calidad depende fuertemente de su particular microambiente.

2. 2. 3. Relevancia del sistema colinérgico en la fisiopatología de diferentes enfermedades

Los diversos componentes del sistema colinérgico como ACh, ChAT, ChT1, VACHT, AChE y n- y/o mAChR, estarían implicados en el desarrollo de numerosas patologías. Considerando que los diferentes subtipos de n- y mAChR pueden actuar en forma

sinérgica o antagónica entre sí, cambios en el patrón de expresión de dichos receptores podría dañar la fina sintonía de efectos celulares mediados por ellos (1).

El impacto de la respuesta inflamatoria sobre el sistema colinérgico no neuronal y viceversa parecería estar regulado de una manera muy compleja, y aún es pobremente entendido. Respecto a la acción inmunomodulatoria de la ACh, la atención se ha centrado mayormente en los procesos inflamatorios que ocurren en el tracto respiratorio, participando en la etiopatogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias, tales como el asma y el EPOC (101,99,121).

El asma es un trastorno inflamatorio crónico asociado a las vías aéreas, caracterizado por la hiperreactividad del árbol respiratorio. Como explicamos anteriormente, esta forma de asma se desarrolla como resultado de una respuesta inflamatoria exacerbada a alérgenos, común en individuos genéticamente susceptibles o atópicos (122).

El asma alérgico es considerado fundamentalmente una patología causada por una desregulación inmune y se encuentran asociados una serie de mecanismos relacionados: el desarrollo de un perfil Th2 sobre los demás perfiles, la hiperreactividad bronquial, la excesiva producción de secreciones mucosas y la remodelación estructural de las vías aéreas (8,40). Estos mecanismos tienen lugar debido a la participación de células inflamatorias, como los eosinófilos, mastocitos y linfocitos Th2 que son reclutadas a la mucosa respiratoria causando una inflamación crónica. La remodelación estructural de las vías aéreas se observa en los casos graves y se caracteriza por presencia de engrosamiento de la membrana basal, hiperplasia e hipertrofia del músculo liso con descamado de la capa de células epiteliales (123).

Recientemente, se ha observado una disminución de la población de Treg en las vías aéreas de asmáticos, sin verse afectados en sangre periférica; sin embargo, aún sigue siendo un tema de debate su participación en la inflamación alérgica (124).

En los últimos años, se han realizado estudios que demuestran una asociación directa entre las fibras nerviosas y las células inmunes, a nivel de las vías aéreas. La proximidad anatómica permitiría a las células inmunes responder a los neurotransmisores y a la inversa, mediadores liberados por las células inmunes podrían influir en la actividad de los nervios (125). Además, se ha demostrado que el

tono vagal se encuentra incrementado en procesos inflamatorios que comprometen la vía respiratoria (121).

Numerosas evidencias demostraron que la ACh incrementa la producción de secreciones mucosas y la broncoconstricción al estimular la contracción de las células musculares lisas, y recientemente, se ha descrito que podría jugar un rol esencial en la regulación de los mecanismos que conducen a la remodelación estructural de las vías aéreas durante el desarrollo de procesos inflamatorios crónicos (121,126). Se ha demostrado en pacientes con dermatitis atópica y asma, que la producción de la ACh, al igual que la del TSLP (49), se encuentra incrementada en el tejido (65). Por otro lado, se ha observado que la alteración de los receptores inhibitorios como el M2 que autoregula la liberación de la ACh de la célula, conlleva a un incremento en la actividad del reflejo de broncoconstricción en respuesta a estímulos inhalados y contribuye a la hiperreactividad bronquial inducida por alérgenos (127).

Los fármacos anticolinérgicos son ampliamente utilizados, principalmente en el EPOC, para prevenir la broncoconstricción y reducir la secreción mucosa, así como también disminuir la infiltración neutrofílica y la remodelación aérea (127–129). Se asume que estos efectos protectivos implican la capacidad que tienen estos fármacos de prevenir la interacción de la ACh con los mAChR expresados por las células musculares lisas o las células epiteliales de las vías aéreas (130–133). Estos hallazgos indican que la ACh, actuando sobre los mAChR, principalmente el M3, podría contribuir a la etiopatogénesis del asma y del EPOC (121,127).

Ahora bien, actualmente comienza a tomar otra relevancia el papel de la ACh en el curso de estos procesos inflamatorios alérgicos, ya que se ha observado que la misma tendría un efecto quimiotáctico y activador de las células inflamatorias relacionadas al asma y al EPOC (127). Por lo tanto, la mejora observada en estas patologías por el uso de fármacos anticolinérgicos, podría deberse a otros efectos, quizás de tipo inmunomodulatorio, de los mismos que aún desconocemos.

Respecto a esto último, aún no han sido completamente definidos los blancos celulares responsables de las acciones inmunomodulatorias ejercidas por la ACh pero, sin embargo, existen algunas evidencias sobre la acción del sistema colinérgico en los LT de pacientes asmáticos. Se ha postulado que la presentación crónica de alérgenos

aumenta la expresión de mAChR en los LT, incrementando su susceptibilidad a las acciones moduladoras mediadas por ACh (99). A su vez, los LT activados provenientes de individuos asmáticos secretan más ACh en comparación con los provenientes de individuos sanos (134), y en adición a esto, se ha observado que la ACh promueve la supervivencia de estos LT activados (135) (figura 9).

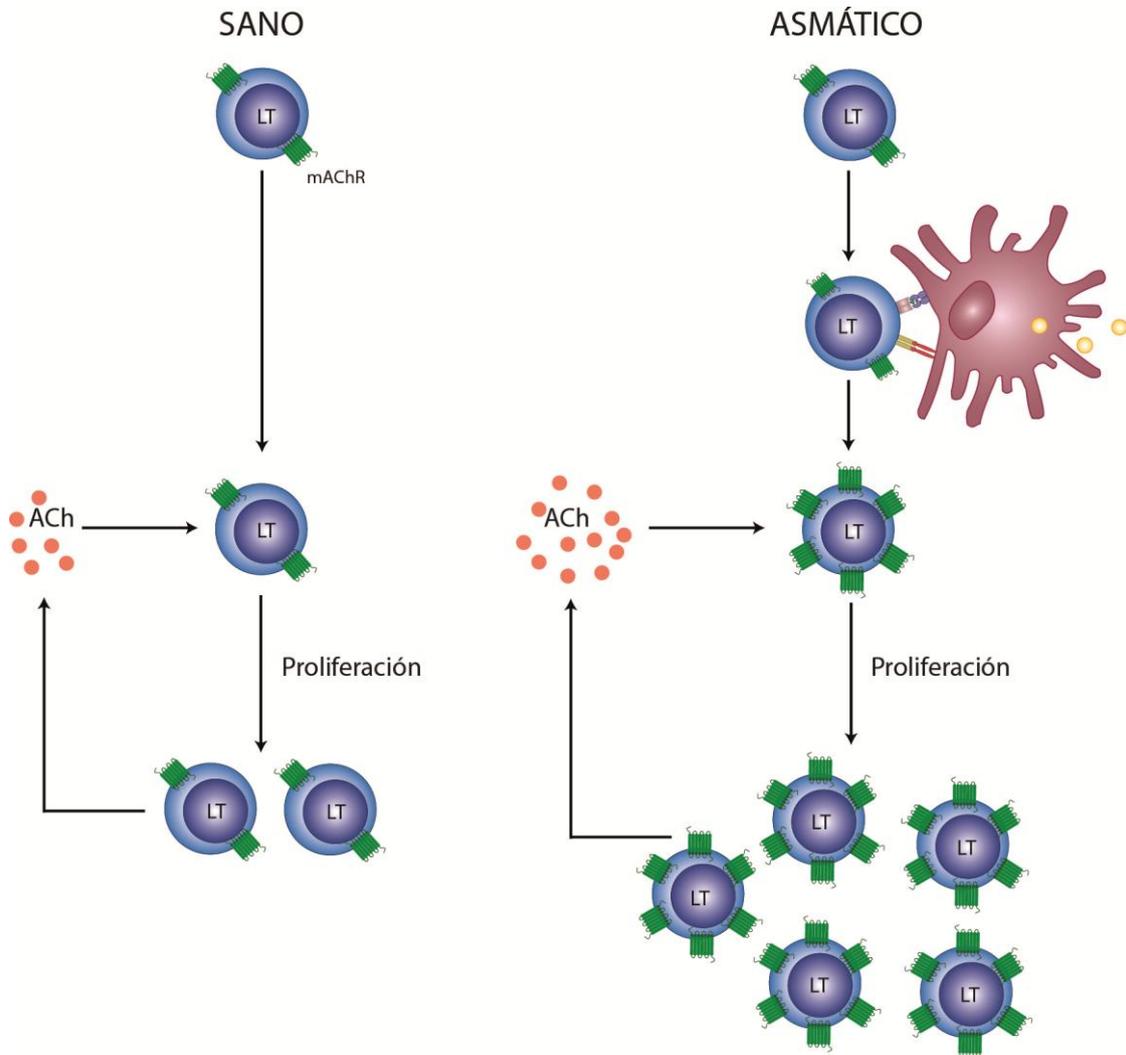


Figura 9. Acción del sistema colinérgico en los LT de pacientes asmáticos. Explicación en el texto. Modificado de (99).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En los últimos años, nuestro grupo ha adquirido una amplia experiencia en el estudio y caracterización de factores presentes en el microambiente inflamatorio capaces de modular la diferenciación y/o la activación de las CD (109,136–138). Recientemente, hemos determinado la presencia de un sistema colinérgico completo en las CD al observar la expresión de ChAT, AChE y mAChR, así como también hemos descrito la modulación de su fisiología celular inducida por la ACh, principal neurotransmisor del sistema parasimpático (109).

A pesar de su influencia en el desarrollo de las enfermedades inflamatorias respiratorias, aún no han sido completamente definidos los blancos celulares responsables de las acciones inmunomodulatorias ejercidas por la ACh. No existen trabajos previos en la literatura científica que evalúen el impacto de la ACh sobre la fisiología de las CD durante el desarrollo de procesos inflamatorios alérgicos. Por todo esto, nuestra **hipótesis de trabajo** es que la ACh participa en las patologías alérgicas desde el inicio de la respuesta adaptativa, al modular la funcionalidad de las CD y condicionar el perfil de respuesta Th2.

OBJETIVO GENERAL: Evaluar si la ACh, a través de sus acciones inmunomodulatorias sobre las CD, impone y/o favorece un fenotipo promotor de la respuesta inflamatoria alérgica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. *Evaluar la capacidad de la ACh de inducir la polarización de las CD hacia un perfil promotor de respuesta Th2*
2. *Analizar si la ACh es capaz de modular la polarización hacia un perfil Th2 determinado por la acción del TSLP sobre las CD.*
3. *Determinar si la acción inmunomodulatoria del sistema colinérgico sobre las CD es inducida también por el sistema noradrenérgico*
4. *Evaluar la capacidad de la ACh de regular la génesis de un proceso alérgico al interactuar sobre las CD.*

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Resguardos Éticos

Este trabajo cuenta con los avales de los Comités de Ética, Docencia y Bioseguridad del Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires. Los dadores voluntarios de sangre periférica fueron informados del propósito de este estudio y, previo a la extracción de la muestra, proporcionaron un consentimiento informado.

2. Reactivos Generales

Todos los reactivos utilizados estuvieron libres de endotoxinas. El medio RPMI-1640, el buffer fosfato salino (PBS), la penicilina/estreptomicina y el suero fetal bovino (SFB), el cual fue inactivado por calentamiento a 56° durante 30 min, fueron obtenidos de Gibco, Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA). La IL-4 recombinante humana (rh) y el GM-CSFrh fueron obtenidos de Miltenyi Biotec, mientras que la IL-12rh provino de PeproTech (Rocky Hill, CT, USA). La ACh, el carbacol, la norepinefrina (NE), la mecamilamina (MM) y la ovoalbúmina grado V (OVA) fueron obtenidas de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); mientras que la atropina (AT) proviene del Laboratorio Larjan (Bs.As., Argentina). El TSLP fue obtenido de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Las placas y microplacas de cultivo de poliestireno de 6 pocillos, de 96 pocillos fondo en U, y de 96 pocillos mitad de área para ELISA provienen de Greiner Bio One, GBO (Frickenhausen, Alemania).

3. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica o PBMC

Las muestras de sangre fueron obtenidas de dadores voluntarios sanos y no fumadores del Servicio de Medicina Transfusional del Hospital Italiano de Buenos Aires, a partir de *buffy coats*. Las mismas se separaron luego de la centrifugación de las bolsas de sangre entera. Las muestras de sangre fueron diluidas al medio con solución fisiológica estéril y se centrifugaron a 210 x g durante 15 min para descartar el plasma rico en plaquetas. Luego, se recompuso el volumen inicial de la muestra con solución fisiológica estéril y se sembró sobre una solución de Ficoll-Triyosom 1,077 g/cm³ (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Alemania) formando un sistema bifásico, el cual se centrifugó a 483

x g durante 30 min a 22°C. La interfase de PBMC (del inglés, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) resultante fue recolectada y luego de dos lavados con solución fisiológica estéril (483 x g durante 10 min a 4°C), se resuspendieron en medio RPMI para realizar el recuento celular. En todos los casos, el grado de contaminación con células polimorfonucleares fue menor al 5%.

4. Aislamiento de Mo CD14⁺ a partir de PBMC

Los PBMC fueron resuspendidos en buffer PBS suplementado con EDTA 2mM y 0,5% de BSA (del inglés, *Bovine Serum Albumin*), Buffer MACs de ahora en adelante. Posteriormente, los Mo fueron purificados por selección positiva mediante el empleo de perlas magnéticas acorde a las instrucciones del fabricante. Para lo cual, se incubaron con 10 µl del Ab monoclonal anti-CD14 acoplado a perlas magnéticas (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemania) por cada 1×10^7 de PBMC, durante 15 min a 4-8°C. Posteriormente, las células fueron lavadas con Buffer MACs, para eliminar el exceso de Ab. Se resuspendieron en el mismo buffer y se colocaron en una columna de separación magnética (Miltenyi Biotec) adosada a un imán y este a un soporte metálico, lo que permitió la retención de las células CD14⁺ y la elusión, por sucesivos lavados con el Buffer MACs, de las células negativas para dicho marcador. Luego, las células CD14⁺ fueron recuperadas al separar la columna del imán. Cuando fue necesario, los linfocitos totales eluidos de la columna de separación se recuperaron, se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 10% de suero AB humano inactivado por calor, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina (Medio SAB) a una concentración de 1×10^6 células/ml y fueron utilizados para ensayos de cultivo mixto linfocitario (CML).

Los Mo fueron lavaron y resuspendidos en Medio RPMI 1640 para llevar a cabo el recuento celular y pureza, la cual fue evaluada por citometría de flujo y fue mayor al 95%, en todos los casos.

5. Obtención de CD a partir de diferenciación de Mo CD14⁺

Los Mo purificados fueron cultivados en medio completo humano compuesto por RPMI 1640 suplementado con 10% de SBF, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de

estreptomycin, a una concentración de 1×10^6 células/ml en placas de 6 pocillos en presencia de IL-4rh (20 ng/ml) y GM-CSFrh (30 ng/ml) (Miltenyi Biotec) durante 5 días. El nivel de diferenciación fue confirmado por la presencia de CD1a, mediante inmunomarcación y citometría de flujo (figura 10).

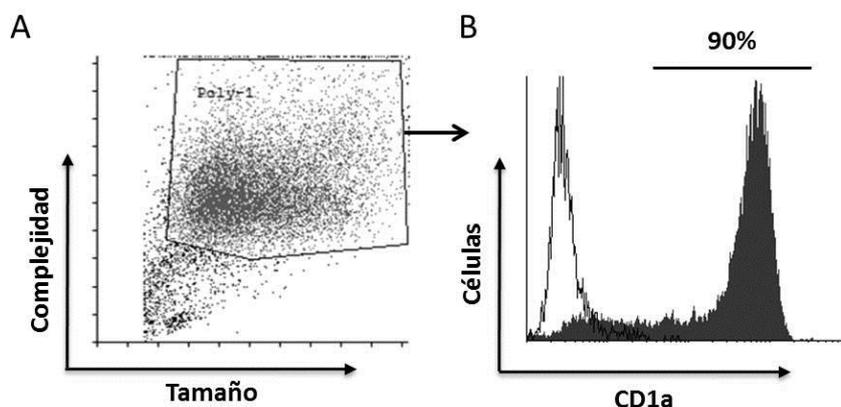


Figura 10. Fenotipo de CD derivadas de Mo CD1a⁺. Al día 5 de cultivo, las CD se lavaron y marcaron con Ab monoclonal anti-CD1a. (A) Se muestra un dot-plot representativo de tamaño/complejidad a partir del cual se seleccionó la población a evaluar, mientras que en (B) se muestra un histograma representativo donde se indica el % de células positivas para CD1a.

Las CD (1×10^6 células/ml) fueron cultivadas en presencia o ausencia de diferentes concentraciones del agonista colinérgico, ya sea ACh o carbacol (agonista farmacológico estable), según reportes previos del grupo (109). Dependiendo del ensayo, las CD fueron pre-tratadas o no con TSLP (15 ng/ml) 20 min antes del agregado de ACh al medio. Para los ensayos de bloqueo de receptores colinérgicos, previo a la incubación con TSLP y/o ACh, las CD fueron pre-tratadas por 30 min con los antagonistas colinérgicos no selectivos de los mAChR y de los nAChR, AT o MM, respectivamente. En todos los casos, las CD fueron cultivadas a una concentración de 1×10^6 /ml en placa de 96 pocillos fondo en U por 18 h en estufa de cultivo a 37°C con 5% de CO₂. Los sobrenadantes se recolectaron, fraccionaron y almacenaron a -70°C hasta su utilización, mientras que las células fueron resuspendidas en buffer de marcación e inmunomarcadas para determinar su fenotipo por citometría de flujo.

En el caso particular de los experimentos con NE, la pre-incubación con TSLP fue realizada durante 4 h para luego exponer las células a diferentes concentraciones de NE.

6. Aislamiento de CD CD1c (BDCA-1)⁺ a partir de PBMC

Las células CD1c (BDCA-1)⁺ se obtuvieron a partir de PBMC de sangre periférica, mediante selección positiva e indirecta con el *CD1c (BDCA-1)⁺ Dendritic Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec), según indicaciones del fabricante. Brevemente, se incuban los PBMC con bloqueante de los receptores para el fragmento Fc (FcR), Ab monoclonal anti-CD19 acoplado a perlas magnéticas y con el Ab monoclonal anti-CD1c (BDCA-1) biotinilado, por 15 min a 4-8°C en Buffer MACs. Luego se lavaron y las células B CD19⁺ se depletaron mediante pasaje por columna de separación. Este primer paso de separación magnética es importante ya que una subpoblación de células B son CD1c⁺. La elución de esta primer columna se centrifugó, se resuspendió en Buffer MACs y se incubó con Ab monoclonal anti-Biotina acoplado a perlas magnéticas (siempre utilizando 10 µl de Ab por 1x10⁷ de PBMC). Al pasar por la columna de separación, las células CD1c⁺ quedaron retenidas en la misma y fueron recuperadas al separar la columna del imán. Luego, se lavaron con Buffer MACs y se resuspendieron en medio completo para llevar a cabo el recuento celular, análisis de viabilidad y pureza. Esta última se determinó por inmunomarcación y citometría de flujo, mediante el uso de Ab monoclonales anti-CD14 y anti-CD1c (Miltenyi Biotec). La pureza obtenida fue mayor al 85%.

Los protocolos experimentales fueron realizados bajo las mismas condiciones que las CD derivadas de Mo.

7. Aislamiento de LT CD4⁺ naïve a partir de PBMC

Las células T CD4⁺ naïve fueron purificadas a partir de las PBMC mediante selección negativa con perlas magnéticas utilizando el *Naïve CD4⁺ T Cell Isolation Kit II* (Miltenyi Biotec), según recomendaciones del fabricante. Brevemente, se incubaron los PBMC con una mezcla de Ab monoclonales biotinilados dirigidos contra los siguientes antígenos: CD45RO, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD25, CD34, CD36, CD56, CD123, anti-TCRγ/δ, anti-HLA-DR, y CD235a (glicoforina A), para la depleción de células de memoria TCD4⁺ y células no TCD4⁺, por 5 min a 4-8°C en Buffer MACs. Luego, se adicionó Ab monoclonal anti-biotina acoplado a perlas magnéticas diluido en buffer MACs, por 10 min más a 4-8°C (siempre utilizando 10 µl de Ab por 1x10⁷ de PBMC). Se

lavaron las células y se realizó el pasaje por columna de separación; la elución fue recuperada ya que contenía a las células TCD4⁺ *naïve*. Se lavaron con Buffer MACs y se resuspendieron en Medio SAB a una concentración de 1×10^6 células/ml. La pureza se determinó por inmunomarcación y citometría de flujo, mediante el uso de Ab monoclonales anti-CD4 y anti-CD45RA (Miltenyi Biotec). En todos los casos, la pureza fue mayor al 95%.

8. Cultivos mixtos linfocitarios

Las CD (5×10^4 células/pocillo) fueron cultivadas por 18 h en presencia o ausencia de ACh/Carbacol 10^{-8} M. Luego, fueron lavadas y cultivadas solas o en presencia de linfocitos totales alogeneicos resuspendidos en Medio SAB (relación CD/linfocito = 1/5), en placas de 96 pocillos fondo en U por 5 días en estufa de cultivo a 37°C con 5% de CO₂.

La proliferación de los linfocitos alogeneicos se cuantificó mediante incorporación de timidina tritiada. Brevemente, al 4to día del CML, las células fueron pulsadas con timidina tritiada, 1 μ Ci/pocillo (actividad específica: 5 Ci/mM, DuPont, Wilmington, DE, USA) durante las últimas 16 h del co-cultivo, y finalmente cosechadas en papel de fibra de vidrio utilizando un cosechador semiautomático (Skatron Instruments). La radioactividad incorporada fue medida con un contador β automático de centelleo líquido (Perkin Elmer), para lo cual previamente se humedeció el papel de fibra de vidrio con el líquido de centelleo.

La producción de citoquinas de los diferentes perfiles T fue evaluada en los sobrenadantes de CML mediante ELISA o inmunomarcación intracitoplasmática y citometría de flujo.

En paralelo, en un set de cultivos, se agregó IL-12rh (10 ng/ml) en el Medio SAB de los linfocitos alogeneicos para luego evaluar a los 5 días, la producción de IFN- γ por ELISA y por inmunomarcación intracitoplasmática y citometría de flujo.

Para los ensayos donde las CD fueron pre-tratadas con TSLP, las CD (2×10^4 células/pocillo) fueron pre-tratadas o no con TSLP y 20 min después, se agregó o no ACh al cultivo y se incubaron por 18 h. Luego, fueron lavadas y cultivadas solas o en

presencia de LT CD4⁺ *naïve* alogeneicos resuspendidos en Medio SAB (relación CD/linfocito = 1/5), en placas de 96 pocillos fondo en U por 7 días en estufa de cultivo a 37°C con 5% de CO₂. El día 3 del cultivo, se reemplazó la mitad del volumen por Medio SAB fresco. Las últimas 6 h de cultivo, se re-estimularon las células con PMA (50 ng/ml, Sigma) e ionomicina (2 µg/ml, Sigma).

9. RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)

9. 1. Extracción de ARN total

El ARN total de CD así como el de los CML de linfocitos totales se extrajo usando el método de extracción por TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células, previa centrifugación, se resuspendieron en 1 ml de TRIzol (desde 1x10⁶ hasta 10x10⁶ células totales), se homogeneizaron y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Al descongelar, se homogeneizó nuevamente y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente (TA). Se agregaron 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 s y se incubó 3 min a TA, centrifugando luego a 12000 g por 15 min a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un eppendorf estéril y se agregaron 500 µl de isopropanol frío, se mezcló por inversión, se dejó incubar durante 10 min y se centrifugó a 12000 g por 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet de ARN se lavó dos veces con 1 ml de etanol 75%, centrifugando a 7500 g durante 5 min a 4°C, en cada lavado. Se descartó el sobrenadante, se dejó secar el pellet por 5 min a TA y se resuspendió en 20 µl de agua libre de ARNasas tratada con Dietilpirocarbonato (agua DEPC, Thermo Fisher Scientific). La concentración y pureza del ARN se midió por absorbancia con espectrofotómetro para ADN/ARN GeneQuant (Amersham Biosciences).

9. 2. Síntesis de ADN copia (ADNc)

Luego el ARN se retro-transcribió a ADNc usando Transcriptasa Reversa M-MLV (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los pasos fueron los siguientes: se realizó la mezcla de reacción conteniendo 2-3 µg de ARN total, 500 ng de *random hexamer primers* (Invitrogen), y agua DEPC hasta completar un volumen

final de 12 μ l. Luego, se calentó por 5 min a 65°C, y se llevó a hielo rápidamente. A continuación, se agregó a la mezcla Buffer M-MLV 1X (Invitrogen), DTT 10mM (Invitrogen), dNTPs 10 mM (Invitrogen) y 200 U de Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega), y se incubó 1 h a 42°C. Por último, se inactivó la reacción incubando la mezcla a 70° por 15 min. Las muestras de ADNc fueron mantenidas a -20°C hasta la realización de amplificación.

9. 3. Amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (Real Time-PCR)

Para el análisis de la expresión génica de *TSLPR* mediante qPCR se procedió a preparar la siguiente mezcla de reacción: 10 μ l de *SYBR Green PCR Select Master Mix* (Applied Biosystem), 2 μ l de QuantiTect Primer Assay QT01156176 (Qiagen, Cambridge, USA) o 250nM de *primers* del gen de referencia, 1 μ l de ADNc y el resto de agua DEPC hasta llegar a volumen final de 20 μ l. Las reacciones fueron llevadas a cabo en el ciclador ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 15 min seguido de 40 ciclos de 94°C por 15 s, 55°C por 27 s, y 72° por 33 s. En paralelo, se realizó la amplificación para el gen de referencia (gen *housekeeping*) *GAPDH*, con la siguientes secuencias: 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3' (forward) y 5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3' (reverse) (139).

Para el análisis de la expresión génica de *TBET*, *GATA3*, y *CHRNA7* (gen de la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico) mediante qPCR, también se utilizó el sistema *SYBR Green PCR Select Master Mix* (Applied Biosystem). Las condiciones de reacción en este caso fueron: 2,5 μ l de ADNc, 2X *SYBR Green PCR Select Master Mix* (Applied Biosystem) y 0,175 μ M de cada uno de los *primers* correspondientes (Tabla I), en un volumen final de 20 μ l. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 50°C 2 min y una de 2 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de 20 s a 95°C y 60 s a 60°C.

Los *primers* utilizados, tanto los diseñados para este trabajo de tesis como los citados por otros autores, amplifican más de un exón y/o su sitio blanco involucra a dos exones consecutivos. De esta manera se evita la amplificación de ADN genómico,

debido a una posible contaminación de la muestra de ARN con este otro ácido nucleico.

El nivel de expresión de los genes *target* *TSLPR*, *CHRNA7*, *TBET* y *GATA3* fueron cuantificados relativizando a la expresión del gen de referencia *GAPDH*, y los resultados fueron expresados en forma relativa a los niveles de las CD sin tratar, utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct \text{ gen } target - Ct \text{ gen } housekeeping$ (87).

Gen	Secuencia de los <i>primers</i> (5' → 3')	Secuencia de ARNm de referencia	Tamaño del producto	Ref
<i>TBET</i>	Fw: TACCCGGGGCCGCGTGAGGACTA Rv: CGGGTGGACGTACAGGCGGTTTC	NM_013351.1	318 pb	Bestach, 2015. (140)
<i>GATA3</i>	Fw: TGTGTGAACTGTGGGGCAACCTCG Rv: TTTTCGGTTTCTGGTCTGGATGCC	NM_002051.2	315 pb	Bestach, 2015. (140)
<i>CHRNA7</i>	Fw: AGAACCAAGTTTTAACCAACA Rv: TAGTGTGGAATGTGGCGTCAA	NM_000746.5	183 pb	Diseñados para este trabajo
<i>GAPDH</i>	Fw: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC Rv: GAAGATGGTGATGGGATTC	NM_002046.5	226 pb	Hu y col, 2004 (141)

Tabla 1. Secuencias de *primers* utilizadas para las reacciones de qPCR diseñadas mediante el uso del software online *Primer-BLAST*. *Fw:* Forward, *Rv:* Rewind. La columna Ref hace referencia al identificador del ADNc molde en la base de datos *RefSeq* del NIH (del inglés, *National Institutes of Health*).

En todos los casos, las muestras fueron medidas por duplicado y se realizaron controles negativos o NTC (*no template control*, agua DEPC). El ADNc sintetizado a partir de ARN total de CD tratadas con LPS (100 ng/ml, Sigma Aldrich) por 18 h fue utilizado como control positivo de la expresión del gen *TSLPR* (74).

Los productos de qPCR para el gen *TSLPR* (115pb) y *GAPDH* (250pb) fueron separados en un gel de 2% de agarosa con bromuro de etidio (Sigma Aldrich) y visualizados mediante un transiluminador UV. El marcador de peso molecular utilizado fue de 100pb-1000pb (Biodynamics).

10. Ensayos *in vitro* e *in vivo* en murinos

10. 1. Animales

Para el cuarto objetivo de esta tesis, se emplearon ratones hembras vírgenes BALB/c y C57BL/6 de 8 semanas de edad. Los ratones fueron criados y mantenidos en el bioterio del Instituto, de acuerdo a las normas establecidas por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH). Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de ética para el uso y manejo de animales de laboratorio del IMEX y se llevaron a cabo en estricta conformidad con las guías de la *Sociedad de Fisiología Americana (American Physiological Society's Guiding Principles for the Care and Use of Animals in Research)* y con las reglamentaciones aprobadas por autoridades locales. En todos los casos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

10. 2. Aislamiento de precursores de médula ósea de ratones BALB/c

Los precursores de médula ósea de ratones BALB/c fueron obtenidos según el método utilizado por Inaba y colaboradores (142), adaptado en nuestro laboratorio (138,143). Una vez sacrificado el ratón, en condiciones asépticas se removió quirúrgicamente el tejido muscular de los fémures y tibias y se procedió a cortar ambos extremos de cada hueso con un bisturí a fin de utilizar sólo las diáfisis. Los mismos se lavaron 2 veces con PBS y se transfirieron a una placa de Petri con medio fresco RPMI 1640. A continuación, se procedió a aislar la médula ósea, haciéndose fluir 1 ml de medio RPMI 1640 con una jeringa de 1 ml y una aguja de 21G a través del hueso, recogiendo la elusión en un tubo estéril. Las células fueron disgregadas a través de sucesivos pasajes por la aguja. A continuación, los glóbulos rojos fueron lisados con una solución de cloruro de amonio (NH_4Cl) 0,45 M por 1 min, llevándose luego a 10 ml con medio RPMI. Las células fueron lavadas y resuspendidas en 2 ml de medio RPMI para su recuento y evaluación de viabilidad.

10. 3. Obtención de CD murinas por diferenciación de precursores de médula ósea

Los precursores hematopoyéticos de médula ósea fueron resuspendidos a una concentración de 1×10^6 células/ml con medio completo murino, compuesto de RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, 50 U/ml de penicilina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina y β -mercaptoetanol $5,5 \times 10^{-5} \text{M}$ (Sigma-

Aldrich). Se agregó al medio completo un 20% de medio condicionado proveniente de la línea celular J588-GM productora de GM-CSF murino. Las células fueron cultivadas en placa de poliestireno de 6 pocillos por 9 días, realizando cada 48 h el recambio del medio completo de cultivo por medio fresco suplementado con 20% de factor proveniente de la línea J588-GM y pasando a una nueva placa las células en suspensión (138,143). Al noveno día de cultivo, las células no adherentes fueron recolectadas y se caracterizaron fenotípicamente. Las CD mostraron más de un 85% pureza siendo dobles positivas para CD11c y MHC II (IAd) (figura 11).

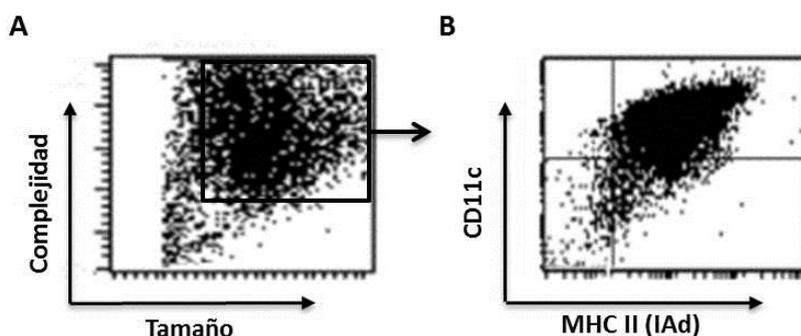


Figura 11. Fenotipo de CD derivadas de precursores de médula ósea. Al día 9 de cultivo, las CD se lavaron y marcaron con Ab monoclonal anti-CD11c y anti-MHC II (IAd). **(A)** Se muestra un dot-plot representativo de tamaño/complejidad a partir del cual se seleccionó la población a evaluar, mientras que en **(B)** se muestra un histograma representativo donde se indica el % de células dobles positivas.

Las CD (1×10^6 /ml) fueron incubadas en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de ACh en placa de 96 pocillos fondo en U por 18 h en estufa de cultivo a 37°C con 5% de CO_2 . Los sobrenadantes se recolectaron, fraccionaron y almacenaron a -70°C hasta su utilización, mientras que las células fueron resuspendidas en buffer de marcación e inmunomarcadas para determinar su fenotipo por citometría de flujo.

10. 4. Obtención de esplenocitos murinos

Luego de sacrificados los animales, se les practicó una incisión adecuada, que permitió acceder a la cavidad peritoneal y poner al descubierto el bazo, el cual se extrajo con pinzas y tijeras en condiciones asépticas. El bazo se disgregó con tijeras sobre una malla metálica, y en presencia de PBS 1X, obteniendo la suspensión celular en un tubo estéril mientras quedan retenidas en la malla los detritos celulares y restos de tejidos

Luego, la suspensión se centrifugó por 10 min a 483 x g a 4°C. Se contaron y se resuspendieron en medio completo murino a una concentración de 1×10^6 células/ml.

10. 5. Cultivo mixto linfocitario murino

Se incubaron CD tratadas o no con ACh 10^{-11} M (5×10^4 células/pocillo) por 18 h, se lavaron y se las enfrentó con esplenocitos alogeneicos aislados de bazo de ratones C57BL/6 (relación CD/esplenocito 1:5), en placas de 96 pocillos fondo en U por 5 días. Se determinó la proliferación mediante medición de la incorporación de timidina tritiada, como se explicó en el ítem 8 de Materiales y Métodos.

10. 6. Modelo murino de génesis de respuesta inflamatoria alérgica pulmonar

10. 6. 1. Diseño experimental

Se diseñó un modelo de alergia pulmonar para este trabajo de tesis, en el cual los ratones fueron sensibilizados y desafiados con OVA e inoculados con CD, a partir de protocolos descritos previamente con modificaciones propias (138,144,145). Brevemente, el día 0 del modelo, los ratones BALB/c vírgenes de tratamiento fueron instilados intranasalmente (i.n.) con CD (5×10^5 células/100 μ l de PBS), previamente tratadas o no con ACh 10^{-11} M por 18 h. En paralelo, a un grupo de ratones se lo instiló con PBS en lugar de CD. Unos minutos después de la instilación, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) con 20 μ g de una suspensión de OVA grado V (Sigma Aldrich) preparada en 2 mg de aluminato de sodio (OVA-Alum). Luego de 7 días, se los desafió con 50 μ l de solución PBS-3% OVA por ratón por instilación i.n., 3 veces a la semana (día 7, 9 y 11). El día 14, se procedió a anestésiar a los ratones con isoflurano para coleccionar muestras de sangre por punción del seno retro-orbital, necesarias para la medición de IgE en suero. A continuación, se sacrificaron los animales y se extrajeron los pulmones de los mismos para realizar el análisis histopatológico de los mismos y la evaluación de las poblaciones celulares por citometría de flujo en los diferentes tratamientos. En paralelo, un grupo de ratones recibió la inyección i.p. de OVA-Alum como los demás grupos, pero las instilaciones i.n. que recibieron fueron en todos los casos de PBS en lugar de OVA.

Todos los grupos fueron sensibilizados i.p. con OVA-Alum a día 0. En resumen, los 4 grupos experimentales se describen a continuación:

- I. Grupo Control Sano: ratones instilados i.n. con PBS en lugar de CD y desafiados con PBS en lugar de OVA.
- II. Grupo PBS: ratones instilados i.n. con PBS en lugar de CD y desafiados con OVA.
- III. Grupo CD: ratones instilados i.n. con CD sin tratar y desafiados con OVA.
- IV. Grupo CD-ACh: ratones instilados i.n. con CD pretratadas con ACh y desafiados con OVA.

10. 6. 2. Evaluación de nivel de Ab IgE OVA-específicos en suero

Los animales fueron anestesiados con isofluorano para colectar muestras de sangre por punción del seno retro-orbital con capilar. Se incubaron las muestras de sangre a 37°C durante 1 h para permitir la retracción del coágulo, se centrifugaron a 483 x g por 15 min a 4°C, y se recuperó la fase superior perteneciente al suero de cada una de las muestras. Finalmente, los sueros se decomplementaron a 56⁰C por 20 min. Los sueros se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Los Ab IgE específicos para OVA fueron detectados usando el siguiente protocolo (138). Se incubaron placas por 16 h con 1 µg/ml de OVA en buffer carbonato de sodio (pH 9.5, Sigma-Aldrich). Las placas fueron lavadas 5 veces con Tween-20 al 0,05% en PBS (Buffer de lavado) y bloqueadas con PBS+SFB 10% (Buffer de bloqueo) por 1 h a TA. Diluciones del suero fueron agregadas y luego de 2 h las placas fueron lavadas 5 veces con Buffer de lavado, agregando finalmente una dilución apropiada de Ab monoclonal de detección biotinilado (rat anti-mouse IgE, BD Biosciences) por 1 h. Luego, las placas se lavaron nuevamente y se incubaron con estreptoavidina-peroxidasa (SAv-HRP, e-Biosciences) por 30 min. Se lavaron por última vez 7 veces y se agregó el sustrato cromogénico 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, Thermo Fisher Scientific), frenándose la reacción colorimétrica con solución STOP (H₂SO₄ 2N). La absorbancia fue medida a 450nm en un lector de ELISA. Los controles negativos incluyeron pocillos con todos los reactivos reemplazando las muestras de suero por Buffer de bloqueo.

10. 6. 3. Procesamiento de los pulmones

10. 6. 3. 1. Análisis histopatológico

Se aislaron los pulmones de los ratones sacrificados, se lavaron 3 veces con PBS 1X y se mantuvieron en medio RPMI 1640 en placa de Petri. Se separaron muestras de cada tratamiento para realizar el estudio histopatológico de los mismos, llevado a cabo por el Servicio de Patología del Centro de Estudios Oncológicos (CEO) perteneciente a la Academia Nacional de Medicina. Los pulmones fueron fijados en formol 4% por 24 h, incluidos en parafina y procesados en forma automática. El análisis histopatológico se realizó sobre secciones de 4 μm de espesor coloreadas con Hematoxilina-Eosina (H-E) y con técnica del Ácido Periódico de Schiff (PAS) para mucopolisacáridos. El procesamiento del material, así como los cortes y coloraciones estuvieron a cargo del Servicio de Patología del CEO que también colaboró en la interpretación de los resultados y la toma de imágenes con microscopio Zeiss Axiolab.

10. 6. 3. 2. Obtención de suspensiones celulares de pulmón

Luego de haber separado las muestras para el análisis histopatológico, con el tejido restante, se procedió a disgregar mecánicamente el tejido en pequeñas piezas con tijera de punta curva y se perfundieron con una solución de colagenasa tipo I (250 U/ml; Roche, Bs.As., Argentina) - DNasa I (50 U/ml; Invitrogen), durante 40 min en estufa de cultivo a 37°C con 5% de CO₂, como se describe en reportes previos del grupo (138). Al final de la reacción, se frenó la misma con la adición de PBS 1X suplementado con 5% de SFB. Luego, la suspensión se filtró con malla metálica estéril para retener los detritos celulares y restos de tejido, recuperando las células en un tubo, al cual, luego, se le adicionó PBS 1X y se centrifugó por 10 min a 483 x g a 4°C. Se resuspendieron las células en medio RPMI 1640, para realizar la inmunofenotipificación de las mismas.

11. Citometría de flujo

Las células cultivadas bajo los distintos tratamientos fueron recuperadas y lavadas con PBS-EDTA 2mM-BSA 0,5% (Buffer de marcación) a TA. Los *pellets* celulares obtenidos se resuspendieron y se incubaron con los Ab monoclonales correspondientes según la

marcación. Todos los experimentos fueron evaluados empleando un citómetro de flujo de 3 colores FacScalibur (BD Biosciences) y se adquirieron entre 10.000 y 50.000 eventos. Los datos fueron analizados empleando el software CellQuest (BD Biosciences) y se expresaron como porcentaje de células positivas o intensidad de fluorescencia media (IFM), según correspondiera, realizando los debidos controles para determinar en cada caso el cuadrante o punto de corte.

11. 1. Inmunofluorescencia de superficie directa

Las células se incubaron con concentraciones saturantes de Ab monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) durante 30 min a 4°C y en oscuridad. Se realizaron marcaciones simples o dobles según se indica en el ensayo. Para caracterizar el fenotipo de las células humanas estudiadas se utilizaron Ab monoclonal anti-humano dirigidos contra: CD1a, CD14, CD86, HLA-DR, CD83, OX40L, CD19, CD4 (BD Biosciences) y CD1c, CD45RA (Miltenyi Biotec). En los controles negativos, los Ab monoclonales fueron reemplazados por los correspondientes controles de isotipo: IgG1, IgG2a/b (BD Biosciences).

El fenotipo de las células murinas estudiadas fue caracterizado mediante el empleo de Ab monoclonales anti-ratón, conjugados a FITC o PE, dirigidos contra: CD11c, CD11b, CD40, CD86, MHC II IA^d, B220, GR-1 (BD Biosciences). En los controles negativos, los Ab monoclonales fueron reemplazados por los correspondientes controles de isotipo: IgG1, IgG2a/b (BD Biosciences).

Posteriormente, las células se lavaron con Buffer de marcación y se fijaron con PFA 1% para luego adquirirlas por el citómetro de flujo.

11. 2. Inmunofluorescencia de superficie indirecta

Previo a la marcación de los receptores muscarínicos, las células se fijaron con PFA 3% para evitar la internalización de los mismos. Se lavaron 2 veces con PBS-Glicina 0,1M y se incubaron con concentraciones saturantes de Ab policlona de cabra o de conejo dirigidos contra M1, M2, M3 (cabra), M4 y M5 (conejo), durante 30 min a 4°C (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania). Las células se lavaron con buffer de marcación y se incubaron con concentraciones saturantes de Ab secundario policlona

anti IgG de cabra o de conejo, según correspondiera, conjugado a FITC/PE (Sigma-Aldrich), durante 30 min a 4°C y en oscuridad. En los controles negativos, las células fueron incubadas solo con el Ab secundario correspondiente. Posteriormente, las células se lavaron con Buffer de marcación y se fijaron con PFA 1% para luego adquirirlas por el citómetro de flujo.

11. 3. Inmunofluorescencia intracitoplasmática directa

Para la detección de citoquinas intracitoplasmáticas, las células se incubaron con Brefeldina A (10 µg/ml, GolgiPlug, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) durante las últimas 4 h de cultivo, para promover la acumulación intracitoplasmática de proteínas por inhibición del transporte proteico. Luego de realizar la marcación de superficie con Ab monoclonal anti-CD4 FITC (Biolegend), cuando correspondió, las células se fijaron con Solución A del kit Fix and Perm (Dako, Agilent Technologies, Dinamarca) por 15 min a TA a oscuridad, para luego lavarse 2 veces con PBS-Glicina 0,1M e incubarse con la solución permeabilizadora (Solución B) por 15 min a TA y a oscuridad. Luego, se agregó el Ab monoclonal anti IL-13 o anti IFN-γ PE (Biolegend) a la muestra y se incubó a 4°C por 30 min más, en presencia de la solución B. Luego se lavaron las células con Buffer de marcación y se fijaron con PFA 1% para luego adquirirlas por el citómetro de flujo. En paralelo, se realizó el control de isotipo correspondiente.

11. 4. Evaluación de la apoptosis celular por unión de Anexina V

Se utilizó el método de la Anexina V - Ioduro de Propidio (IP) para evaluar la muerte celular por apoptosis. El ensayo consistió en la unión de la Anexina V-FITC a los residuos de fosfatidilserina, que se encuentran en la membrana externa de las células apoptóticas. Asimismo, para evaluar la integridad celular se utilizó IP, un colorante que solo ingresa a las células que han perdido la integridad de su membrana. Brevemente, las células fueron marcadas con Anexina V-FITC (1µg/ml en buffer de pegado comercial, Immunotools) por 20 min a 4°C y en oscuridad. Al finalizar el tiempo de incubación, se agregó el IP (3 µg/ml) e inmediatamente se adquirieron las muestras en el citómetro de flujo. Los resultados se expresan como células positivas para Anexina V-FITC.

12. Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos celulares por ELISA

Las citoquinas humanas fueron evaluadas utilizando los siguientes kits comerciales: TNF- α (e-Bioscience), IL-8, IL-2, IL-5, IL-12p70, IL-10, IL-6, IFN- γ (BD Biosciences), IL-5 e IL-17 (Biolegend), MDC (CCL22) y TARC (CCL17) (R&D Systems), e IL-4 (Immunttools, Friesoythe, Alemania), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Las citoquinas murinas fueron evaluadas utilizando los siguientes kits comerciales: TNF- α , MCP-1 (e-Biosciences), IL-12p70, e IL-10 (BD Biosciences), según las condiciones de los fabricantes.

Brevemente, las placas de 96 pocillos de mitad de área para ELISA se incubaron con el Ab monoclonal de captura en Buffer de pegado (Carbonato de sodio pH 9.5 o PBS pH 7.2, según el kit) por 16 h a 4°C. Las placas fueron lavadas 5 veces con Tween-20 al 0,05% en PBS (Buffer de lavado) y bloqueadas con PBS+SFB 10% (Buffer de bloqueo) por 1 h a TA. Las muestras fueron agregadas y luego de 2 h, las placas fueron lavadas 5 veces con Buffer de lavado, agregando finalmente el Ab monoclonal de detección biotinilado por 1 h. Luego, las placas se lavaron nuevamente y se incubaron con estreptoavidina-peroxidasa (SAv-HRP) por 30 m. Se lavaron las placas por última vez 7 veces y se agregó el sustrato cromogénico TMB Ultra, frenándose la reacción colorimétrica con solución STOP (H_2SO_4 2N) dentro de los 20 min. La absorbancia fue medida a 450nm con corrección de 550nm en un lector de ELISA. Los controles negativos incluyeron pocillos con todos los reactivos reemplazando las muestras de suero por Buffer de bloqueo. Paralelamente, se realizaron curvas de concentración conocida de la citoquina evaluada (curva estándar) para determinar los pg/ml de las muestras.

13. Análisis estadístico

El nivel de significancia estadística entre dos grupos fue determinado usando los tests no paramétricos Mann-Whitney U para muestras no pareadas y Wilcoxon test para muestras pareadas. Para comparar tres o más grupos, el nivel de significancia fue determinado usando el test no paramétrico Kruskal-Wallis para múltiples comparaciones con post-test de Dunn's para muestras no pareadas o el test de

Friedman para muestras pareadas. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativamente diferentes. Se utilizó el software GraphPad Prism 6 (GraphPad software Inc) para realizar todas las pruebas estadísticas.

RESULTADOS

En los últimos años, se ha establecido que la ACh participa activamente en la etiopatogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias, tales como el asma y el EPOC, en las cuales, la respuesta inflamatoria y la remodelación de las vías aéreas son los blancos terapéuticos característicos de estas patologías (127). Prueba de ello, es el uso de anticolinérgicos en las mismas, siendo la primera línea de tratamiento en el EPOC (127). En ambas patologías, así como también en la dermatitis atópica, se demostró la liberación exacerbada de ACh y/o la disfunción de sus receptores en los tejidos implicados (50,121,127,146). Más allá de esto, existen evidencias recientes de que las células residentes e inflamatorias que controlan la inflamación y la remodelación de las vías aéreas, presentan un sistema colinérgico no-neuronal y que los anticolinérgicos reducen la respuesta inflamatoria en estas patologías (1,109,147–149). Todo esto sugiere que la ACh podría ejercer acciones inmunomodulatorias que favorecerían el desarrollo de estas patologías inflamatorias.

1. ACh induce la polarización de las CD hacia un perfil promotor de respuesta Th2

Por todo lo mencionado, y habiendo demostrado previamente la presencia de un sistema colinérgico no neuronal en las CD capaz de modular su fisiología (109), nos propusimos determinar la capacidad de la ACh, al interactuar sobre las CD, de modular la génesis de una respuesta inflamatoria de etiología Th2.

1. 1. ACh promueve cambios fenotípicos asociados a una respuesta Th2 en las CD

En los últimos años, se ha descrito el rol clave que ejerce la molécula OX40L al favorecer las respuestas Th2 en las patologías alérgicas como el asma y la dermatitis atópica, entre otras (44,74). Teniendo en cuenta esto, evaluamos en primer lugar, si la ACh y su análogo el carbacol, podrían ser capaces de inducir sobre las CD la expresión de esta molécula. En base a nuestros resultados previos (109), utilizamos la concentración 10^{-8} M de ACh/carbacol para estimular a las CD por 18 h y como se observa en la figura 12A y B, tanto las CD tratadas con ACh (ACh-CD) como las CD tratadas con carbacol (Carb-CD) incrementaron la expresión de OX40L.

A partir de este resultado, nos preguntamos entonces, si la ACh además podría modular la producción de las quimioquinas TARC (CCL17) y MDC (CCL22), las cuales se

encuentran aumentadas en las patologías alérgicas favoreciendo el reclutamiento continuo de células Th2 al foco inflamatorio (44,56). En la figura 12C y D, se puede observar que la ACh aumenta significativamente la producción de ambas quimioquinas.

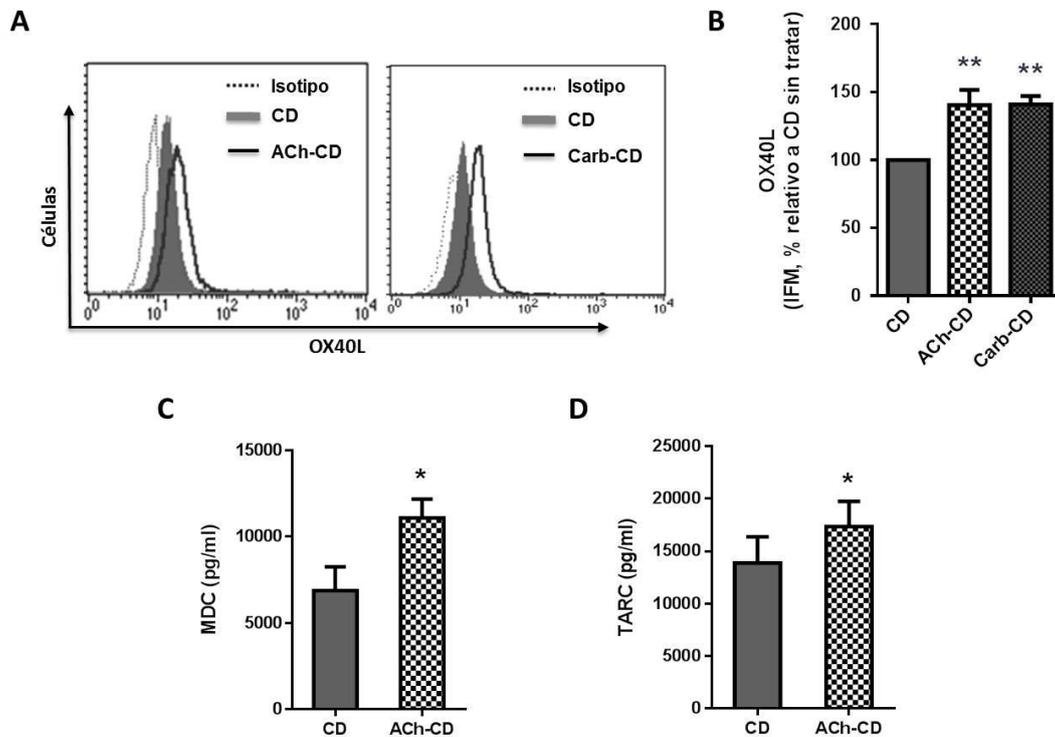


Figura 12. ACh promueve cambios fenotípicos asociados a una respuesta Th2 en las CD. (A-C) Se cultivaron CD (1×10^6 /ml) por 18 h con o sin ACh/carbacol (10^{-8} M) y la expresión de OX40L fue evaluada mediante citometría de flujo **(A y B)**, mientras que la producción de las quimioquinas MDC y TARC fue medida por ELISA, media \pm SEM (del inglés, *Standard error media*), $n=8$ **(C y D)**. En **(A)** se muestran histogramas representativos de $n=8$, mientras que en **(B)** se muestra la media \pm SEM de intensidad de fluorescencia media (IFM) expresada como porcentaje relativo a CD sin tratar ($n=8$), asignándole un valor arbitrario de 100% a las CD no tratadas. * $p<0.05$ y ** $p<0.01$ vs CD sin tratar.

1. 2. ACh aumenta la capacidad estimuladora de las CD promoviendo un perfil de respuesta tipo Th2

Teniendo en cuenta que la ACh induce la expresión de OX40L y en base a nuestros resultados previos (109), donde demostramos que es capaz de incrementar la expresión de HLA-DR y moléculas co-estimuladoras en las CD, nos propusimos evaluar la capacidad de las CD tratada con ACh de estimular una respuesta inmune adaptativa. Para esto realizamos ensayos de CML en los cuales, primero, tratamos o no a las CD con los agonistas colinérgicos, y luego las enfrentamos a linfocitos alogéneos por 5

días. Como se puede observar en la figura 13, el tratamiento con ambos agonistas colinérgicos aumentó la capacidad estimuladora de las CD resultando en un incremento en la proliferación de células T (figura 13A) y en la estimulación de la producción de IL-2 (figura 13B). Al evaluar la producción de las citoquinas TNF- α , IL-10, e IFN- γ (figuras 13C-E), no encontramos diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que la producción de IL-17A fue indetectable (dato no mostrado). Por el contrario, interesantemente, el tratamiento de las CD con ACh aumentó significativamente la producción de IL-5, IL-4 y el número de células T CD4⁺ productoras de IL13⁺ en el CML (figura 13F, G, I). En concordancia con estos resultados, al evaluar el balance entre los perfiles Th1/Th2 mediante la expresión de sus factores de transcripción, observamos que la relación Tbet/GATA3 (Th1/Th2) fue significativamente menor en los cultivos de CD tratadas con ACh comparado con los CML de CD no tratadas (figura 13H).

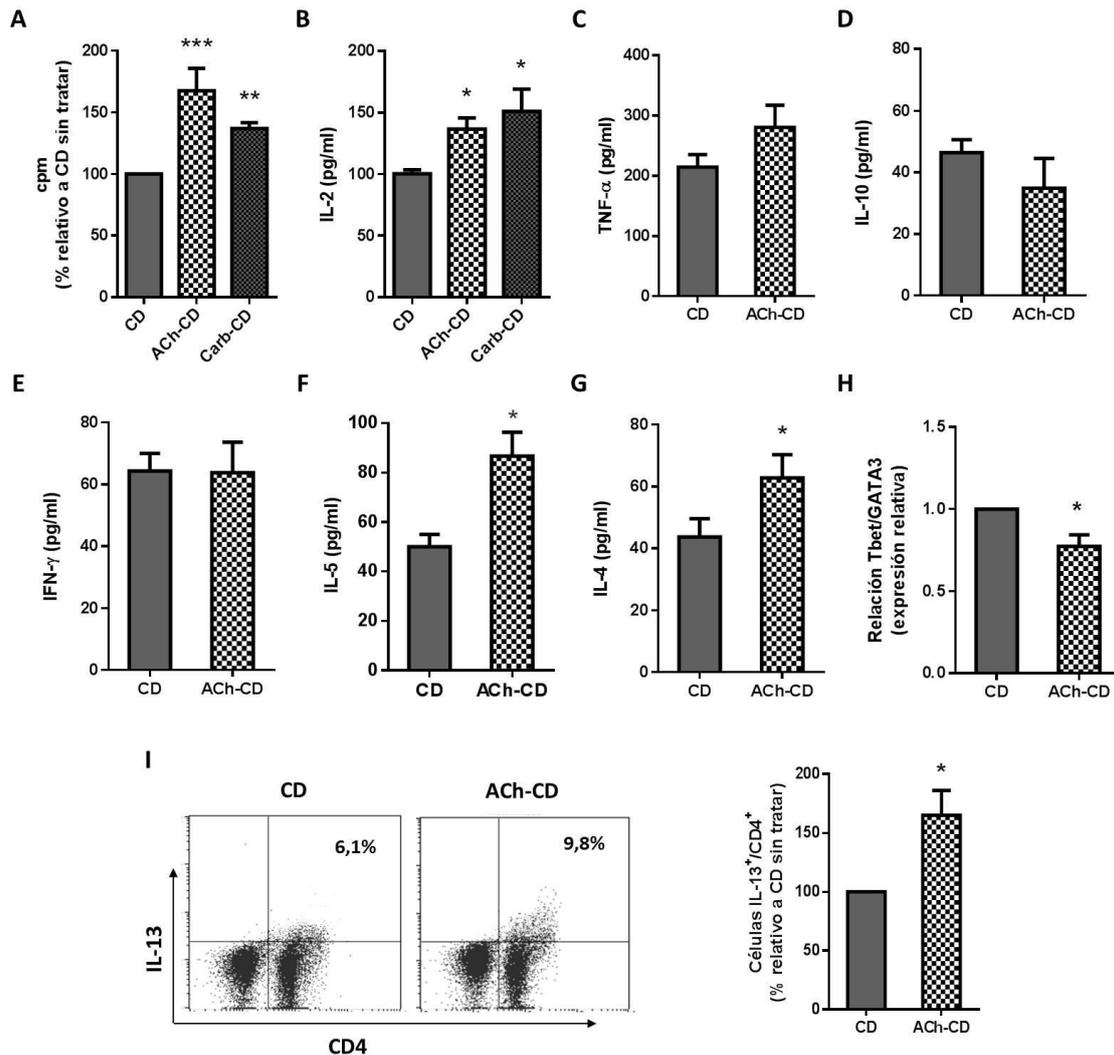


Figura 13. ACh polariza a las CD hacia un perfil promotor de respuesta Th2. (A-I) Se incubaron CD por 18 h con o sin ACh/carbacol (10^{-8} M); se lavaron y se cultivaron con linfocitos alogeneicos (relación CD/linfocito = 1:5). La proliferación evaluada por incorporación de timidina tritiada (A), la producción de citoquinas TNF- α (C), IL-10 (D), IFN- γ (E), IL-5 (F), IL-4 (G) (ELISA) e IL-13 (marcación intracitoplasmática y citometría de flujo) (I), así como la expresión de ARNm de Tbet y GATA3 (H) (qRT-PCR) fue evaluada al día 5, mientras que la producción de IL-2 (B) (ELISA) fue medida a las 48 h (media \pm SEM de 5-8 experimentos). En (A) e (I) se expresan los resultados como la media \pm SEM del porcentaje relativo a CD sin tratar (n=8), asignándole un valor arbitrario de 100% a las CD no tratadas. (H) Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=5) de la relación Tbet/GATA3 de cada experimento, la cual se calculó a partir de la expresión relativa de ARNm de cada factor. (I) En el panel izquierdo se observa un experimento representativo. En todos los casos, el nivel de producción de citoquinas del cultivo de linfocitos solos fue indetectable (dato no mostrado). *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 vs CD sin tratar.

Juntas, estas observaciones sugieren que la ACh favorece la polarización de las CD hacia un fenotipo promotor de perfil Th2. Más aún, para reforzar esta observación, nos propusimos evaluar si bajo condiciones promotoras de un perfil Th1, seguiríamos observando el mismo efecto. Como podemos observar en la figura 14, en presencia de IL-12, la producción de IFN- γ se redujo significativamente en los cultivos de ACh-CD

respecto a CD sin tratar. En la figura 14A, a partir de la marcación intracitoplasmática de las células del CML, pudimos confirmar que el descenso observado en la producción de IFN- γ se encontraba asociado a la disminución de las células T CD4⁺IFN- γ ⁺.

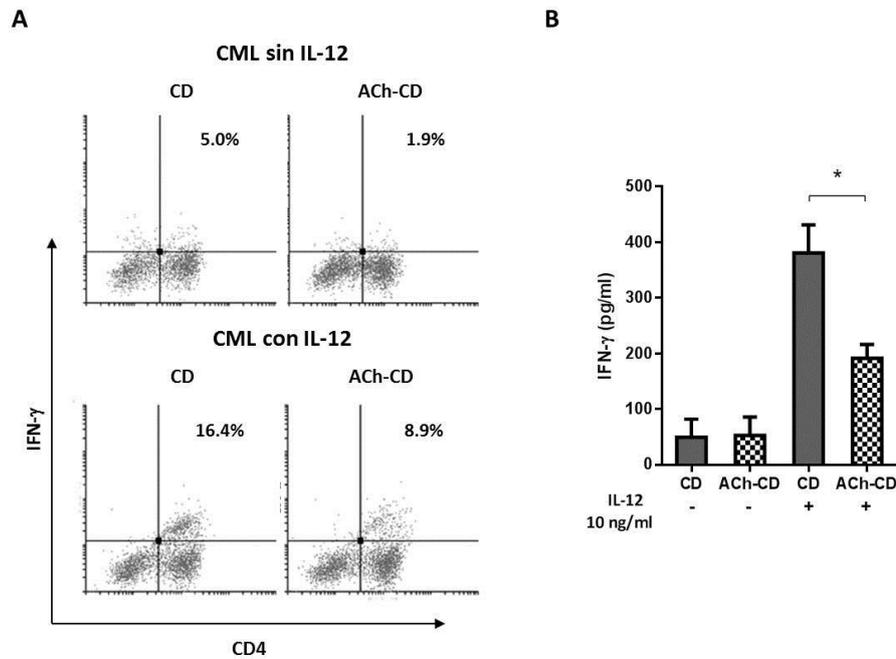


Figura 14. CD tratadas con ACh inhiben la producción de IFN- γ en condiciones promotoras de un perfil Th1. (A-B) Se incubaron CD (1×10^6 /ml) por 18 h con o sin ACh (10^{-8} M); se lavaron y se cultivaron con linfocitos alogeneicos (relación CD/linfocito = 1:5), en ausencia o presencia de IL-12 (10 ng/ml). La producción de IFN- γ fue evaluada a los 5 días de CML mediante marcación intracitoplasmática y citometría de flujo (A) y ELISA (B). Un experimento representativo se muestra en (A) y la media \pm SEM de n=4 experimentos en (B). *p<0.05.

Por otro lado, y para determinar que las diferencias observadas entre las CD y las ACh-CD no se debían a cambios en la viabilidad celular, analizamos cómo la ACh podría modular la supervivencia de las CD. En la figura 15, puede observarse que las CD tratadas con ACh no mostraron diferencias en la viabilidad celular respecto a las CD sin tratar, con ninguna de las concentraciones fisiológicas evaluadas (10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M).

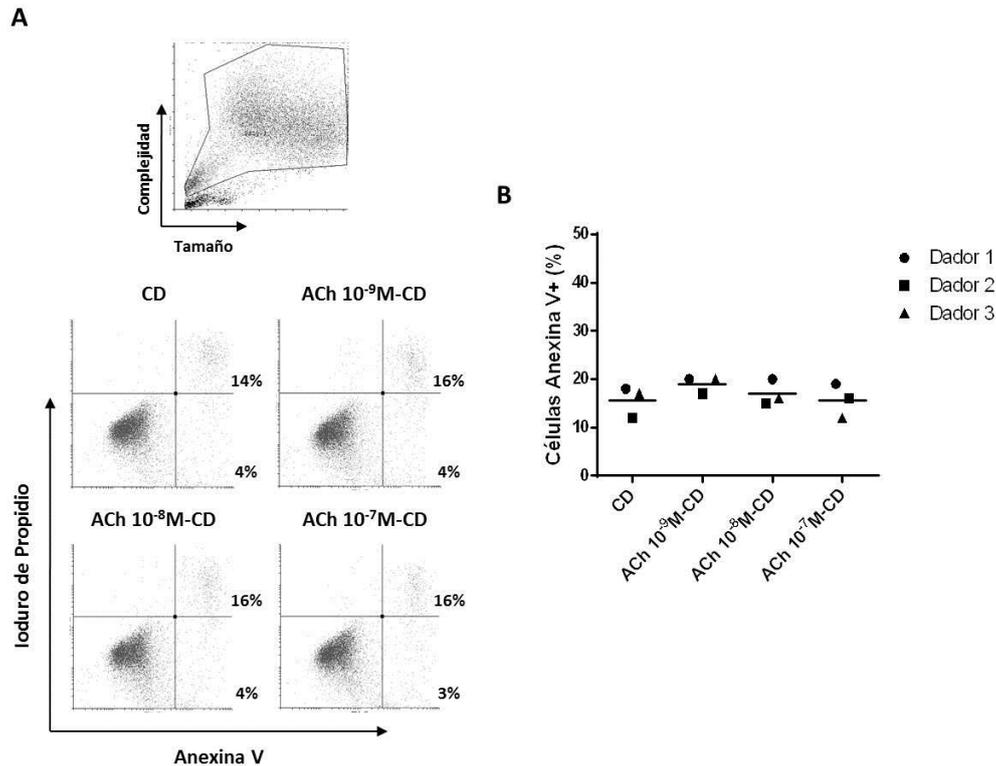


Figura 15. ACh no afecta la viabilidad de las CD. (A-B) Se cultivaron CD (1×10^6 /ml) por 18 h en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de ACh y se evaluó la viabilidad mediante el kit Anexina V/Ioduro de propidio por citometría de flujo. En **(A)** se muestra el dot-plot tamaño vs complejidad que se utilizó para determinar la región a evaluar y un dot-plot representativo de Anexina V/Ioduro de propidio de un experimento representativo, mientras que en **(B)** se muestra el porcentaje de células Anexina V+ (media \pm SEM, n=3).

Los resultados obtenidos hasta aquí muestran la capacidad de la ACh de favorecer las respuestas de etiología Th2, induciendo un cambio fenotípico (OX40L) en las CD que promueve la proliferación y diferenciación de células Th2 (citoquinas Th2 y relación Tbet/GATA3), además de facilitar el reclutamiento de estas últimas por síntesis de quimioquinas específicas (MDC, TARC). Sorprendentemente, encontramos que las ACh-CD además, lograron inhibir la polarización hacia Th1.

2. ACh favorece la polarización de las CD hacia un perfil promotor de Th2 inducido por TSLP

En los últimos años, el TSLP ha despertado un gran interés al establecerse como una de las principales moléculas inductoras del perfil inflamatorio característico de las patologías alérgicas (150). El TSLP induce la expresión y producción de moléculas asociadas al perfil Th2 inflamatorio en las CD como OX40L, MDC y TARC, además de aumentar la expresión de otras moléculas asociadas a la activación como HLA-DR, CD86 y citoquinas inflamatorias (49,74). Teniendo en cuenta estos antecedentes, y

nuestros resultados hasta este momento, nos preguntamos si la ACh sería capaz de modular/interferir con el efecto del TSLP sobre las CD.

2. 1. La inducción del fenotipo promotor de perfil Th2 que genera el TSLP en las CD es favorecida por la ACh

Para estudiar este punto, las CD se pre-trataron o no con TSLP y luego se expusieron a ACh 10^{-8} M, y observamos que la expresión de OX40L fue significativamente mayor que la observada con los estímulos individuales (figura 16A). Un resultado similar se observó cuando evaluamos la expresión de las moléculas indicadoras de maduración y activación de las CD, CD83 (figura 16B) y HLA-DR (figura 16C), respectivamente. Es interesante notar que en el caso de OX40L y CD83, el aumento observado no sólo se demuestra por la IFM sino también por el número de células positivas para dichos marcadores. Si bien, tanto el TSLP como la ACh aumentaron la expresión de la molécula CD86 por sí solos, como ya se ha reportado (49,109), ambos estímulos juntos no mostraron cambios significativos frente a TSLP-CD y ACh-CD (dato no mostrado).

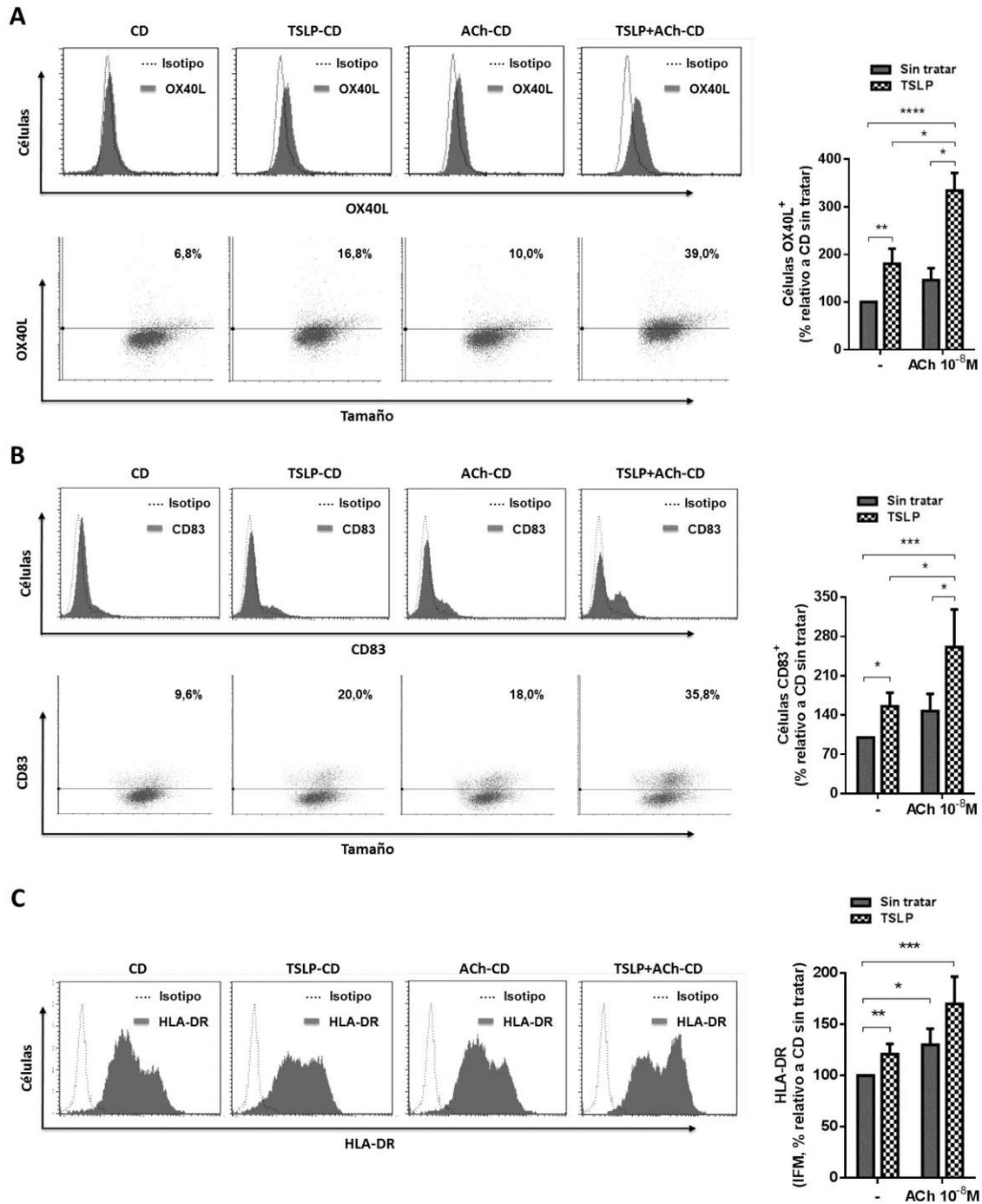


Figura 16. ACh incrementó la expresión de OX40L, CD83 y HLA-DR en CD estimuladas con TSLP. (A-C) Se pre-incubaron o no las CD (1×10^6 /ml) con TSLP (15 ng/ml) por 20 min y se expusieron o no a ACh (10^{-8} M) por 18 h. Luego, la expresión de OX40L, CD83 y HLA-DR fue evaluada por citometría de flujo. Se encuentran expresados los resultados como la media \pm SEM del porcentaje de células positivas (**A y B**) o de IFM (**C**) relativo a CD sin tratar, asignándole un valor arbitrario de 100% a las CD no tratadas. (**A-C**) Se muestran dot-plots e histogramas representativos de 5-8 experimentos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Posteriormente, nos propusimos evaluar el perfil de citoquinas producido por las CD tratadas o no con TSLP y/o ACh. Pudimos observar que ni el TSLP ni la ACh aumentaron

la producción de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-12p70 e IL-10 en CD, frente a las CD no tratadas (figura 17A-D). Sin embargo, indujeron un incremento en la producción de IL-8 (figura 17E) y TNF- α (figura 17F), siendo significativamente mayor la producción de las mismas cuando ambos estímulos se encontraban presentes.

Finalmente, a fin de conocer si los resultados observados en CD derivadas de Mo eran extrapolables a otro subtipo de CD, evaluamos la capacidad de la ACh de estimular la producción de TNF- α en CD CD1c⁺ mieloides circulantes, aisladas a partir de PBMC de sangre periférica, estimuladas previamente o no con TSLP. Observamos que el TSLP tiende a aumentar la producción de TNF- α en las CD respecto a las CD sin tratar, al contrario de la ACh, la cual a diferencia de lo observado en las CD derivadas de Mo, no indujo cambios al compararlas con las CD no tratadas. Al estimular a las CD con TSLP y ACh, se obtuvieron resultados similares a los observados con las CD derivadas de Mo (figura 17G). Este resultado nos sugiere que la capacidad de la ACh de favorecer los efectos inducidos por el TSLP no estaría restringida a un subtipo de CD en particular.

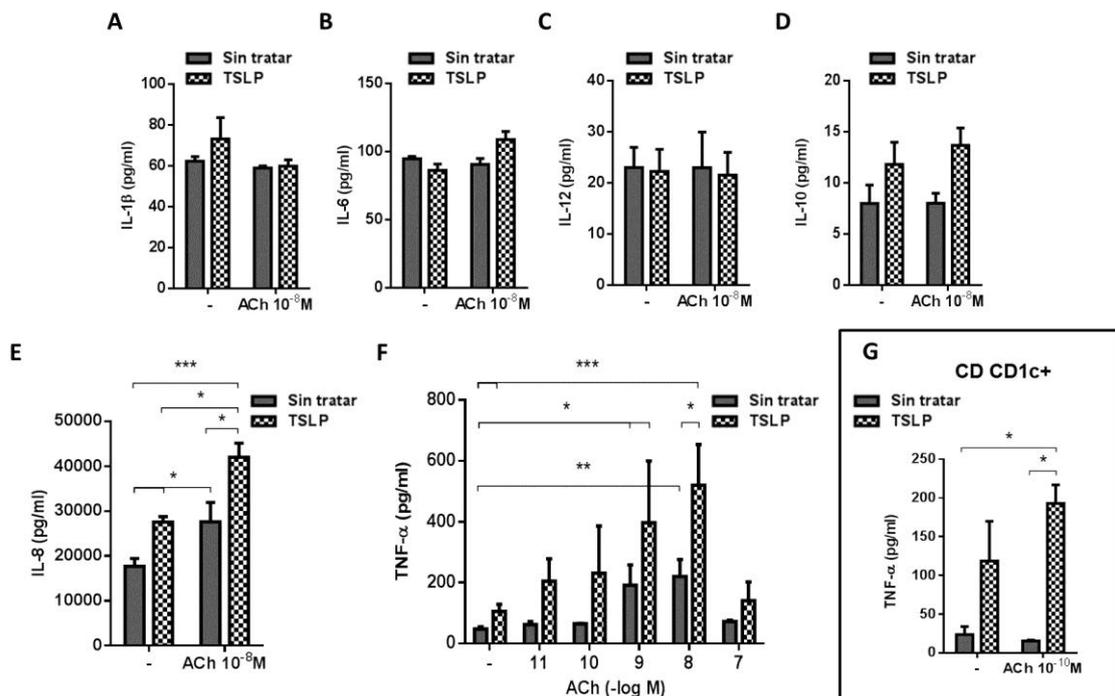


Figura 17. ACh incrementó la producción de TNF- α e IL-8 en CD estimuladas con TSLP. (A-G) Se pre-incubaron o no las CD (1x10⁶/ml) con TSLP (15 ng/ml) por 20 min y se expusieron o no a ACh (10⁻⁸M) por 18 h. Luego la producción de las diferentes citoquinas fue evaluada por ELISA. **(A-F)** Los resultados representan la media \pm SEM de 5-7 experimentos. El panel **(G)** muestra la producción de TNF- α en células CD1c⁺ aisladas de sangre periférica (media \pm SEM, n= 3). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

2. 2. Implicancia de los receptores colinérgicos y el receptor de TSLP en la respuesta mediada por ACh y TSLP en las CD

A partir de los resultados mencionados previamente, nos preguntamos si el efecto favorecedor de la ACh sobre las respuestas mediadas por TSLP podría relacionarse con cambios en la expresión del TSLPR.

El TSLP requiere para señalizar la presencia de su receptor formando un complejo heterodimérico completo en la membrana plasmática, compuesto por dos subunidades: la cadena α del receptor de IL-7 y la propia del receptor de TSLP (60,151,152). A continuación, evaluamos la presencia del TSLPR mediante qRT-PCR a partir del análisis de la expresión del ARNm de la cadena propia del receptor y como observamos en la figura 18A, la ACh no modificó la expresión de la misma en las CD.

Luego, nos propusimos evaluar la expresión de los receptores colinérgicos en las CD estimuladas con TSLP. Por ser uno de los nAChR más estudiados y estar presente en las CD (118), evaluamos la expresión del $\alpha 7$ -nAChR por qRT-PCR, y como podemos observar en la figura 18B, la misma no se vio modificada por el tratamiento de las CD con TSLP. En segundo lugar, evaluamos por citometría de flujo la modulación de la expresión del M1, M2, M3, M4 y M5 en las CD, al tratarlas o no con TSLP. Como podemos observar en la figura 18C, el tratamiento con TSLP no indujo la expresión de los receptores M1 y M2, los cuales no se expresan constitutivamente en las CD (109). A diferencia de estos receptores, M3, M4 y M5 sí poseen expresión constitutiva en las CD; sin embargo, solo en el caso del M3 se observó un aumento significativo de su expresión al tratarse a las CD con TSLP (figura 18C y D).

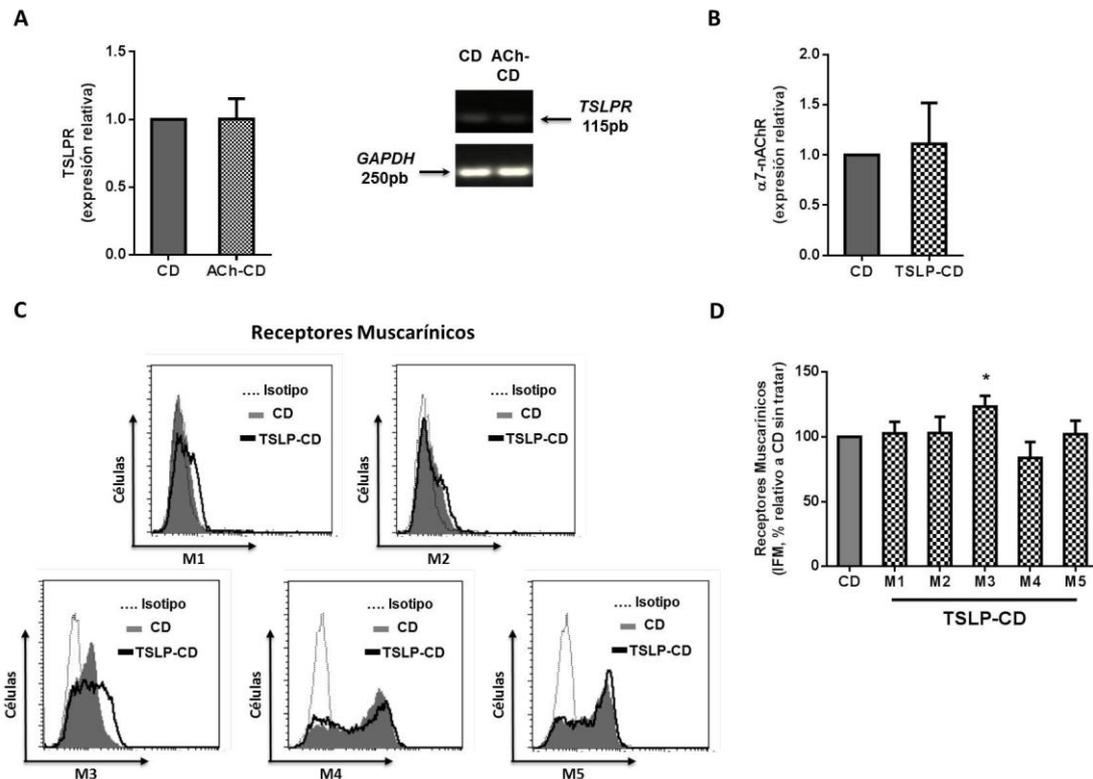


Figura 18. Efecto de ACh y TSLP sobre la expresión del TSLPR y los receptores colinérgicos en las CD. Se incubaron las CD (1×10^6 /ml) en presencia o ausencia de ACh (10^{-8} M) o TSLP (15 ng/ml) por 18 h y la expresión de TSLPR (A), receptor nicotínico $\alpha 7$ ($\alpha 7$ -nAChR) (B), o receptores muscarínicos (M1-M5) (C-D) fue evaluada por qRT-PCR o citometría de flujo, respectivamente. (A-B) Los resultados se presentan como expresión relativa de ARNm y representan la media \pm SEM de 4-5 experimentos. (A) Se muestra una corrida electroforética en gel donde se observan los productos de qRT-PCR del TSLPR de un experimento representativo. (C) Se muestran histogramas representativos, y en (D), la media \pm SEM de IFM expresada como porcentaje relativo a CD sin tratar se muestra en (n=5). * $p < 0.05$ vs CD sin tratar.

Con el fin de determinar el receptor involucrado, diseñamos ensayos de bloqueo de los distintos tipos de receptores colinérgicos (nAChR y mAChR) para determinar cuál/cuáles mediaba/n en el efecto estimulador de la ACh sobre las CD pre-tratadas con TSLP. Para esto, pre-incubamos o no a las CD, por 30 min, con antagonistas no selectivos para los nAChR y mAChR: MM y AT, respectivamente. Luego, las pre-tratamos con o sin TSLP y las cultivamos en presencia o ausencia de ACh, como se explicó previamente. Como se puede observar en la figura 19A, el tratamiento con AT, pero no con MM, inhibió completamente el aumento de la expresión de OX40L observado en las CD tratadas con TSLP y ACh, tanto en el nivel de expresión (figura 19A, panel superior) como en el número de células OX40L⁺ (Figura 19A, panel central e inferior). Resultados similares pueden observarse al analizar la expresión del marcador de maduración CD83 (figura 18B).

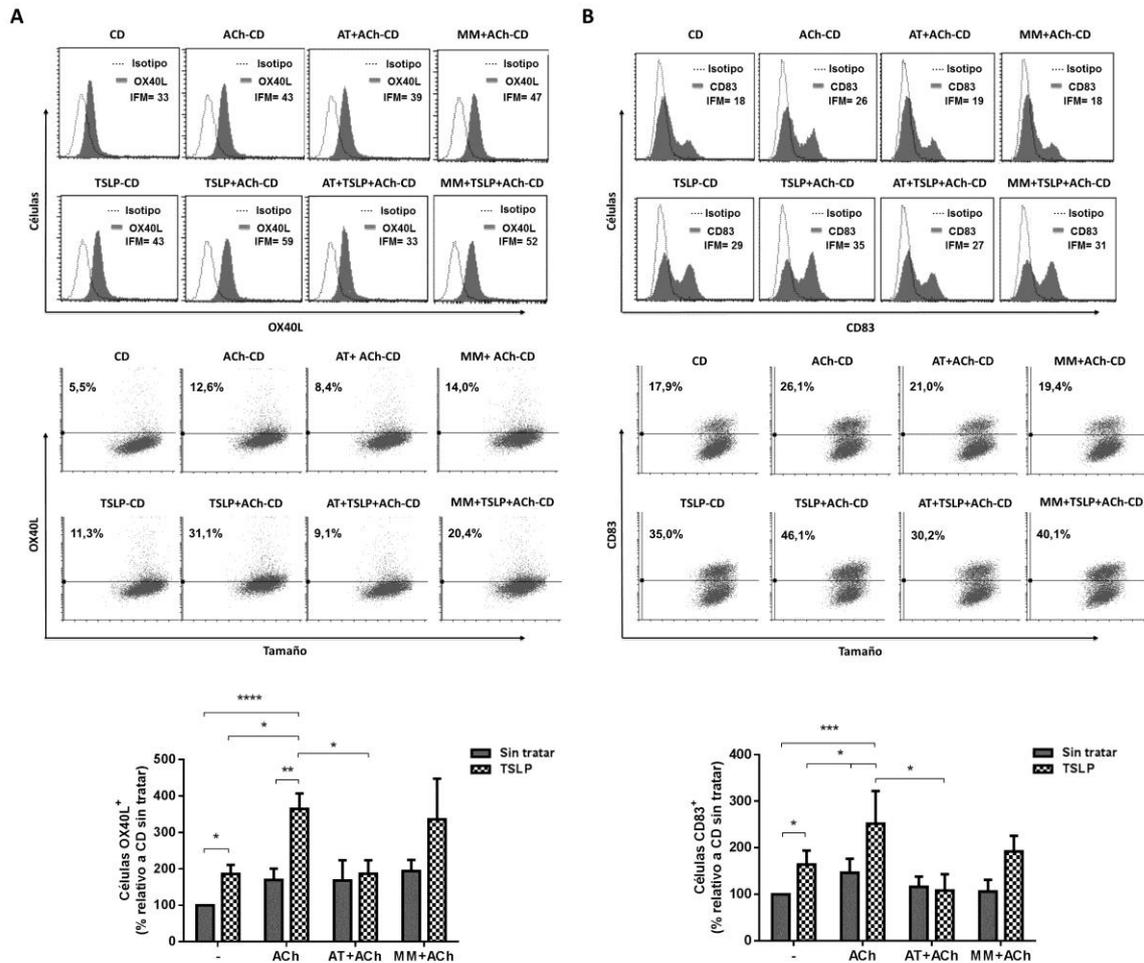


Figura 19. AT previene la capacidad de la ACh de incrementar la expresión de OX40L y CD83 en CD estimuladas con TSLP. Las CD (1×10^6 /ml) fueron pre-tratadas por 30 min con o sin el antagonista muscarínico AT (10^{-7} M) o el antagonista nicotínico MM (10^{-7} M). Luego, se pre-incubaron o no con TSLP (15 ng/ml) por 20 min y se expusieron o no a ACh (10^{-8} M) por 18 h; la expresión de OX40L (A) y CD83 (B) fue evaluada por citometría de flujo. (A-B) Experimentos representativos se muestran en el panel superior y central, mientras que en el inferior se muestra la media \pm SEM del porcentaje de células positivas relativo a CD sin tratar, asignándole un valor arbitrario de 100% a las CD no tratadas (n= 4-5 experimentos). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Por otra parte, evaluamos la producción de TNF- α e IL-8, otros dos parámetros que se encontraban incrementados en los cultivos de TSLP+ACh-CD. Nuevamente, observamos que las células tratadas con ambos estímulos a las cuales previamente se les había bloqueado los mAChR con el uso de AT, mostraron una significativa inhibición del incremento observado en la producción de ambas citoquinas por las TSLP+ACh-CD (figura 20). Además, en estos parámetros, podemos observar que la AT previene de manera significativa el aumento en la producción de ambas citoquinas estimulado por la ACh.

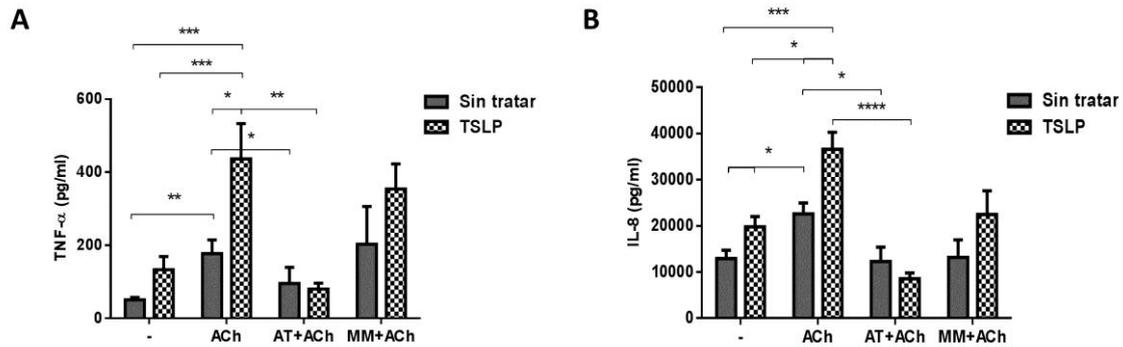


Figura 20. AT previene la capacidad de la ACh de incrementar la expresión de la producción de TNF- α e IL-8 en CD estimuladas con TSLP. Las CD (1×10^6 /ml) fueron pre-tratadas por 30 min con o sin el antagonista de los mAChR, AT (10^{-7} M), o el antagonista de los nAChR, MM (10^{-7} M). Luego, se pre-incubaron o no con TSLP (15 ng/ml) por 20 min y se expusieron o no a ACh (10^{-8} M) por 18 h; la producción de TNF- α (A) e IL-8 (B) fue evaluada por ELISA. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de 5-8 experimentos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

2. 3. ACh incrementa la capacidad de las TSLP-CD de inducir una respuesta inmune de tipo Th2 inflamatoria

Considerando que tanto la ACh como el TSLP inducen en las CD cambios fenotípicos que conducen a una respuesta inmune de tipo Th2 inflamatoria, y que estos cambios se encuentran reforzados al estar presentes ambos estímulos, nos quedaba por investigar si este efecto favorecedor de la ACh se traduciría, finalmente, en un incremento de la respuesta inmune generada por dichos estímulos individuales. Para esto, realizamos ensayos de CML en los cuales enfrentamos CD previamente tratadas o no con TSLP y/o ACh con LT CD4⁺ naïve aislados de PBMC.

Como podemos observar en la figura 21A-D y como era de esperarse, se observó que la producción de IL-2, TNF- α , IL-5 e IL-4 fue incrementada en los cultivos alogeneicos pertenecientes a las TSLP-CD y las ACh-CD, respecto a los CML de CD sin tratar, observándose aún mayor producción cuando los cultivos fueron incubados con ambos estímulos (TSLP+ACh-CD). A su vez, el tratamiento de las CD con TSLP+ACh incrementó el número de células T CD4⁺ naïve productoras de IL13⁺ en un CML (figura 21F). Al evaluar la producción de IL-10 por los LT CD4⁺, no observamos diferencias entre los distintos tratamientos, siendo el nivel de producción menor a 60 pg/ml (figura 21E).

Finalmente, evaluamos la producción de citoquinas en cultivos alogeneicos de CD CD1c⁺ tratadas o no con TSLP y/o ACh. Por un lado, al igual que en la producción de TNF- α por las CD CD1c⁺, observamos que el tratamiento con ACh posee diferentes

efectos sobre los dos subtipos de CD; al contrario de las CD derivadas de Mo, las CD1c⁺ tratadas no aumentaron la producción ni de IL-2 ni de IL-5 en un cultivo allogeneico, respecto a las CD sin tratar (figura G y H). Sí, en cambio, se obtuvieron resultados similares, al comparar el nivel de producción de IL-2, TNF- α e IL-5 en los CML de TSLP+ACh-CD, respecto a los que presentan CD tratadas con cada uno de los estímulos individuales (figura 21G-I).

Por otro lado, al igual que en las CD derivadas de Mo, el nivel de producción de estas citoquinas en los CML de TSLP-CD fue significativamente mayor al observado en los CML de CD sin tratar (figura 21G-I). No se encontraron diferencias tampoco en la producción de IL-10 en CD CD1c⁺ (dato no mostrado).

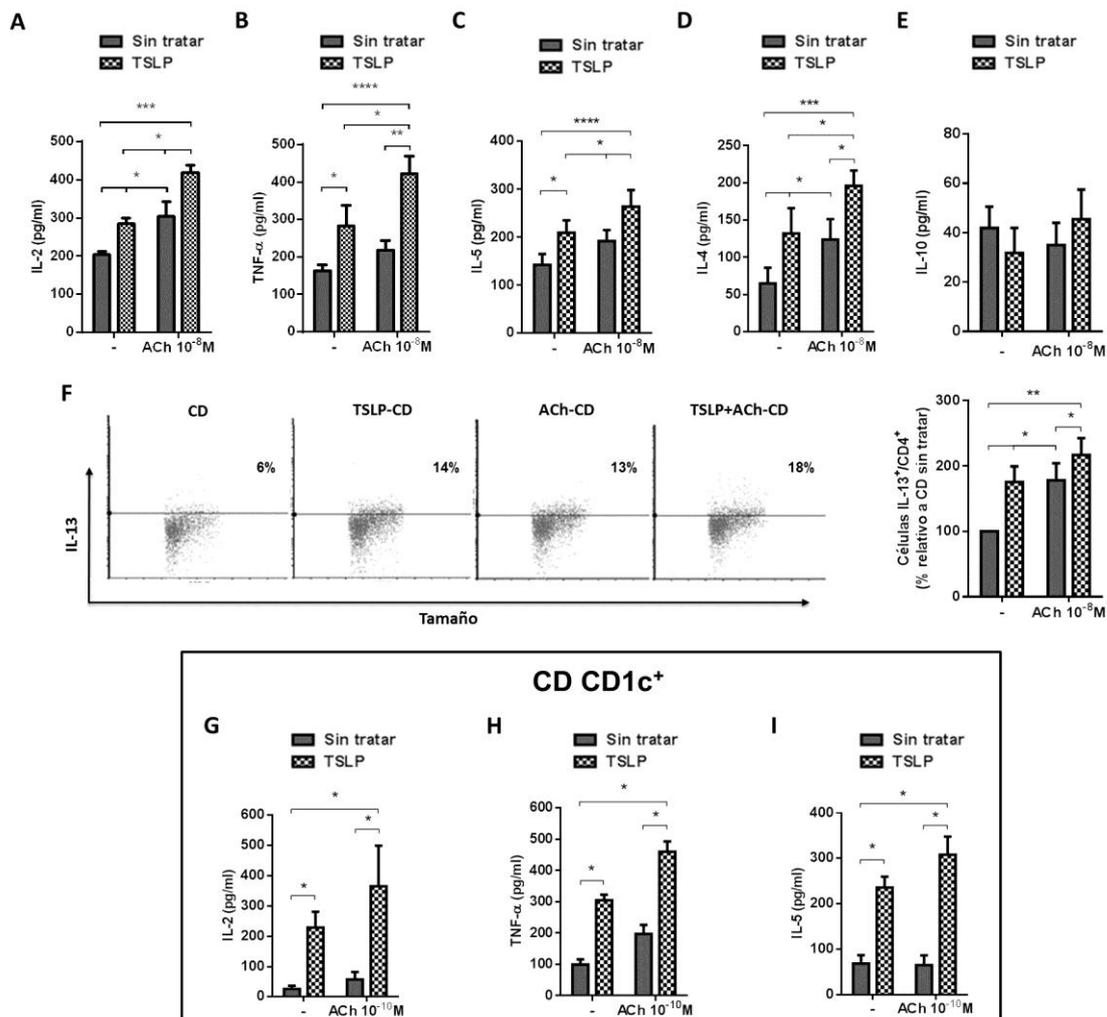


Figura 21. ACh incrementó la capacidad de las CD tratadas con TSLP de inducir la producción de IL-2, TNF- α , IL-5, IL-4 e IL-13 por células T CD4⁺ en el curso de un CML. (A-F) Las CD fueron pre-tratadas o no con TSLP (15 ng/ml) por 20 min y se expusieron o no a ACh (10^{-8} M) por 18 h; se lavaron y cultivaron con LT CD4⁺ *naïve* alogeneicos (relación CD/linfocitos = 1:5) por 6 días. Luego, las células fueron estimuladas con PMA/ionomicina durante 6 h y la producción de citoquinas fue evaluada por ELISA (A-E) o por marcación intracitoplasmática y citometría de flujo (F). Los resultados en (A-E) se expresan como la media \pm SEM de 5-8 experimentos realizados, mientras que en el panel (F, derecho), se expresan como la media \pm SEM del porcentaje relativo a CD sin tratar (n=6), asignándole un valor arbitrario de 100% a las CD no tratadas. En el panel (F, izquierdo) se muestra un experimento representativo. (G-I) Las CD CD1c⁺ aisladas de sangre periférica (1×10^6 /ml) fueron pre-tratadas o no con TSLP (15 ng/ml) y se expusieron o no a ACh (10^{-10} M) por 18 h; se lavaron y cultivaron con LT CD4⁺ *naïve* alogeneicos (relación CD/linfocitos = 1:5) por 6 días. Luego, las células fueron estimuladas con PMA/ionomicina durante 6 h y la producción de citoquinas fue evaluada por ELISA (media \pm SEM, n= 3). En todos los casos, el nivel de producción de citoquinas del cultivo de linfocitos solos fue indetectable (dato no mostrado). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Los resultados obtenidos aquí muestran la capacidad de la ACh de favorecer las respuestas mediadas por el TSLP sobre las CD, al aumentar aún más la expresión de moléculas claves en la activación y maduración de las CD (OX40L y CD83), así como el nivel de producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-8), efectos mediados por los mAChR. Estos cambios permiten el incremento de la capacidad estimuladora de las TSLP-CD (IL-2) y su polarización hacia un perfil Th2 inflamatorio (TNF- α , IL-5, IL-4, IL-13).

3. NE modula el fenotipo de las CD y favorece parcialmente los efectos inducidos por el TSLP

A lo largo de los años, la respuesta inadecuada a estresores físicos y psicológicos se ha asociado a exacerbaciones en numerosas patologías inflamatorias como reacciones de hipersensibilidad (p. ej. dermatitis atópica y asma alérgico), y enfermedades autoinmunes (p. ej. psoriasis) (153).

El sistema nervioso autónomo cumple un rol central en la regulación del tono muscular y vascular así como también en la secreción glandular presente en las vías aéreas. Esta modulación se encuentra mediada por los neurotransmisores del sistema colinérgico y adrenérgico, ACh y NE, respectivamente. El sistema simpático libera NE sobre las glándulas mucosas y los vasos sanguíneos de las vías aéreas, y a pesar de no tener una innervación directa sobre el músculo liso, este presenta ARs como el resto del tejido pulmonar. Paralelamente, fibras simpáticas inervan ganglios parasimpáticos permitiendo de esta manera la comunicación entre ambos sistemas (40). Además, el tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT, del inglés *Bronchus-associated lymphoid*

tissue), así como los demás órganos linfoides, se encuentra ampliamente innervado por el sistema simpático (154).

A fin de comparar las acciones mediadas por ambas vías del SNA, parasimpática y simpática, nos propusimos evaluar el rol del sistema adrenérgico en la funcionalidad de las CD, a fin de conocer su participación en el desarrollo de patologías inflamatorias, sabiendo que las mismas poseen ARs y que se ha reportado la modulación de su fisiología por NE (93,155–158).

3. 1. NE promueve la expresión de la molécula OX40L en las CD

Debido a que, como se mencionó anteriormente, la interacción OX40L-OX40 se encuentra implicada en diversas enfermedades inflamatorias, particularmente en alergia, y que al evaluar la expresión de OX40L en las CD estimuladas con ACh, encontramos un incremento de la misma, nos propusimos evaluar, si la NE podría también inducir la expresión de esta molécula. Para esto incubamos a las CD con diferentes concentraciones de NE por 18 h, y como se observa en la figura 22A, la NE fue capaz de incrementar significativamente la expresión de OX40L. También evaluamos la capacidad de las CD estimuladas con NE de producir las citoquinas quimioattractantes de células Th2, MDC y TARC, y a diferencia de lo observado con ACh, no se observó un incremento significativo respecto a las CD sin tratar (figura 22B-C).

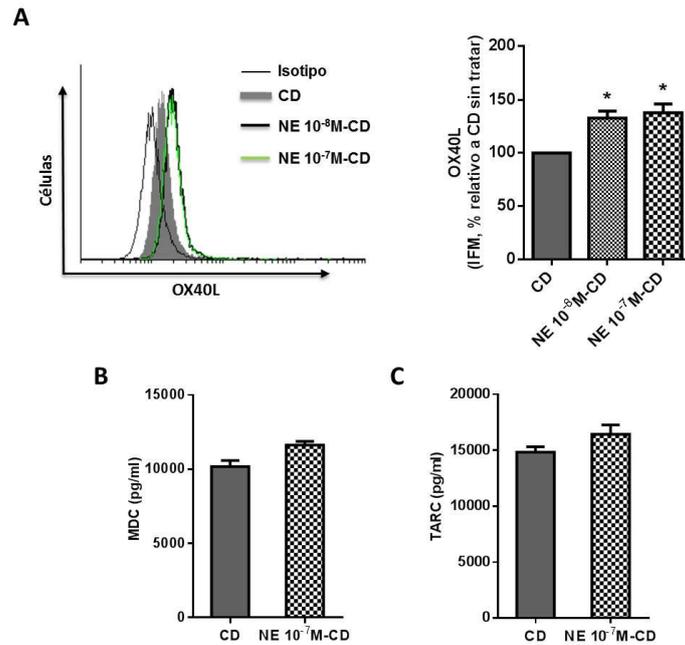


Figura 22. NE induce la expresión de OX40L sobre las CD. (A-C) Se cultivaron CD(1×10^6 /ml) por 18 h con o sin diferentes concentraciones de NE y la expresión de OX40L fue evaluada mediante citometría de flujo **(A)**, mientras que la producción de las quimioquinas MDC y TARC fue medida por ELISA (media \pm SEM, n=3) **(B y C)**. **(A)** Se muestra un histograma representativo y la media \pm SEM de IFM expresada como porcentaje relativo a CD sin tratar (n=8), asignándole un valor arbitrario de 100% a las CD no tratadas. * $p < 0.05$ vs CD sin tratar.

3. 2. NE promueve la expresión de moléculas co-estimuladoras sobre las CD, sin favorecer la inducción de las mismas por TSLP

A continuación, evaluamos si la NE podría modular la inducción de la expresión de las moléculas OX40L, CD83 y HLA-DR por el TSLP sobre las CD. Para esto, pre-incubamos a las CD en presencia o ausencia de TSLP por 4 h, para luego estimularlas o no con diferentes concentraciones de NE, por 18 h. Como se observa en la figura 23, si bien tanto el TSLP como la NE aumentaron la expresión por sí solos de las tres moléculas evaluadas, ambos estímulos juntos no mostraron cambios significativos frente a TSLP-CD y NE-CD. Además, la NE no fue capaz de modular la expresión de CD86 ni sola ni en presencia de TSLP (dato no mostrado).

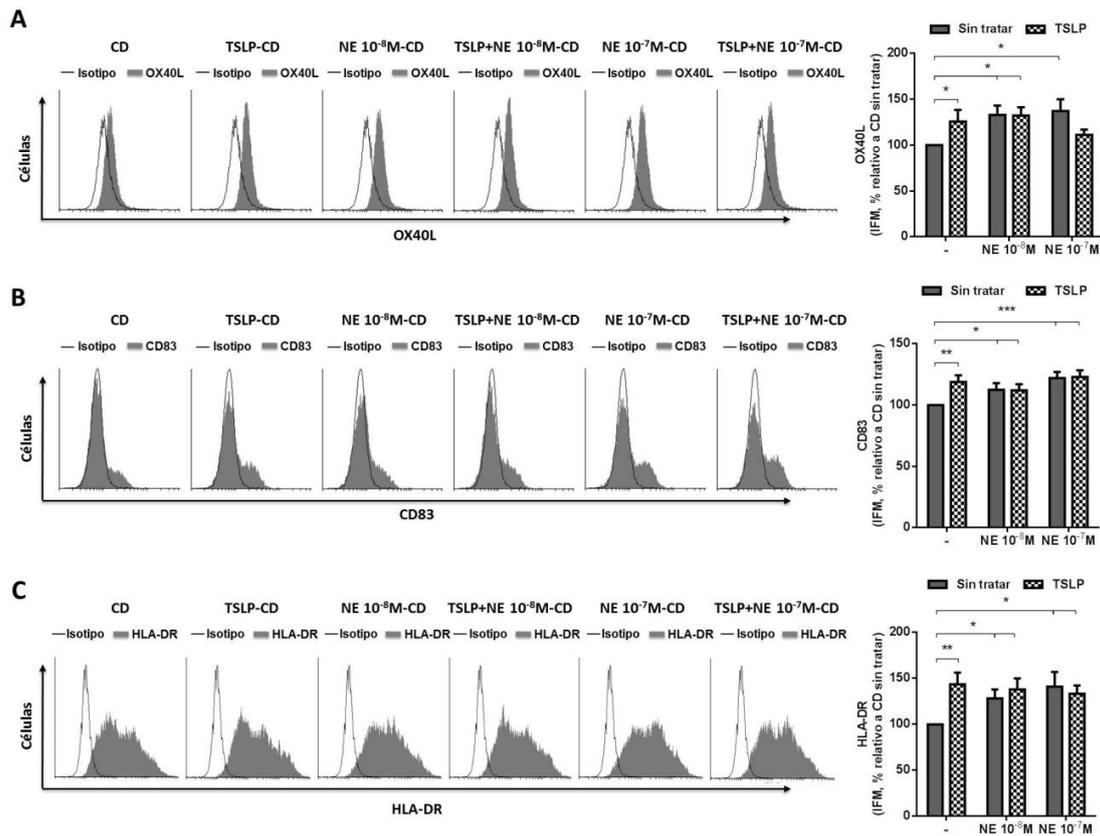


Figura 23. NE induce la expresión de OX40L, CD83 y HLA-DR sin modular la expresión de las mismas por TSLP. (A-C) Se pre-incubaron o no las CD (1×10^6 /ml) con TSLP (15 ng/ml) por 4 h, y luego se estimularon o no con diferentes concentraciones de NE por 18 h. Luego, la expresión de OX40L, CD83 y HLA-DR fue evaluada por citometría de flujo. Se muestra la media \pm SEM de IFM expresada como porcentaje relativo a CD sin tratar, asignándole un valor arbitrario de 100% a las CD no tratadas. **(A-C)** Se muestran histogramas representativos de 5-9 experimentos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3. 3. NE favorece la producción de citoquinas pro-inflamatorias en CD estimuladas con TSLP

Paralelamente, nos propusimos evaluar el perfil de citoquinas producido por las CD pre-tratadas con TSLP (por 4 h) y estimuladas luego con diferentes concentraciones de NE. Pudimos observar que la producción de IL-8 fue significativamente mayor cuando las CD se encontraban tratadas con ambos estímulos frente a las CD tratadas con los estímulos individuales (figura 24A). En la figura 24B, podemos observar que CD pre-tratadas con TSLP y luego estimuladas con NE, en el rango de concentración de $5 \cdot 10^{-7}$ M a $1 \cdot 10^{-7}$ M, incrementaron significativamente la producción de TNF- α frente a CD cultivadas con los estímulos individuales. Por otra parte, ni el TSLP ni la NE aumentaron la producción de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-12p70 e IL-10 por las CD, respecto a las CD sin tratar (datos no mostrados).

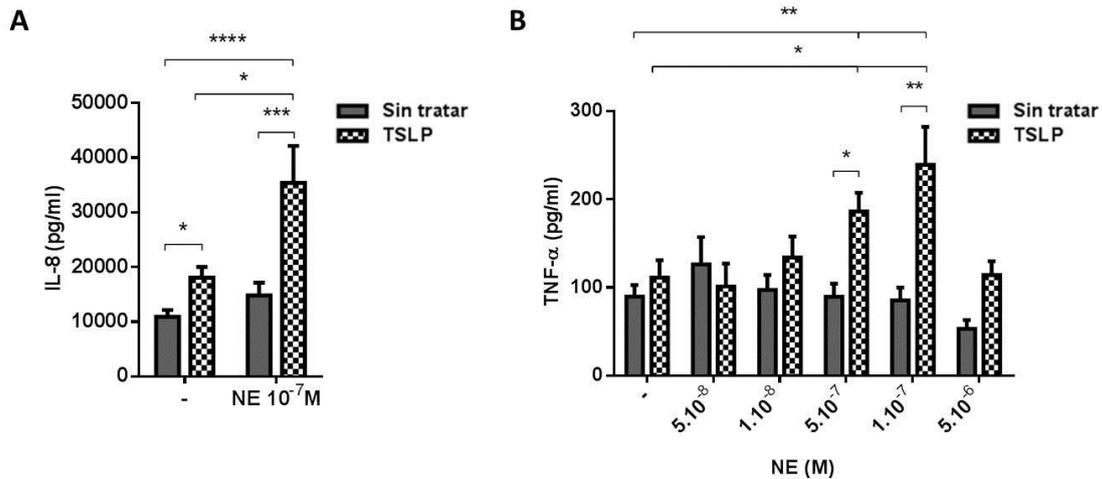


Figura 24. NE incrementó la producción de IL-8 y TNF- α en CD estimuladas con TSLP. (A-B) Se preincubaron o no las CD (1×10^6 /ml) con TSLP (15 ng/ml) por 4 h, y luego se estimularon o no con diferentes concentraciones de NE por 18 h. Luego la producción de citoquinas fue evaluada por ELISA. Los resultados representan la media \pm SEM de 9 experimentos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

La NE, al igual que la ACh y el TSLP, induce sobre las CD la expresión de moléculas co-estimuladoras claves en la inducción de un perfil Th2 inflamatorio (OX40L, CD83 y HLA-DR). Sin embargo, a diferencia de ACh, no altera la modulación de estas moléculas mediada por TSLP, pero sí de la producción de TNF- α e IL-8.

4. ACh activa a las CD murinas y participa en el desarrollo de procesos inflamatorios alérgicos

Atendiendo a nuestros resultados precedentes, nos preguntamos si el efecto observado para la ACh *in vitro* podía corroborarse con el desarrollo de una respuesta inflamatoria en las vías aéreas *in vivo* de etiología Th2. Esta pregunta guarda relación además, con el hecho que en los últimos años, se ha descrito la presencia de un sistema colinérgico completo en las CD murinas, con la presencia de mAChR, nAChR, AChE en células basales y ChAT en células activadas (97).

4. 1. ACh aumenta la expresión de MHC II sobre las CD y su capacidad estimuladora en un cultivo alogeneico

En primer lugar, y con el fin de reproducir los resultados observados en CD humanas, obtuvimos CD murinas por diferenciación de precursores de médula ósea de ratones

BALB/c, como se describe en Materiales y Métodos, y las cultivamos con diferentes concentraciones de ACh durante 18h. Luego, evaluamos la expresión de moléculas de activación y/o maduración. Como puede observarse en la figura 25A, la ACh 10^{-11} M aumentó significativamente la expresión de la MHC clase II (IA^d) en las CD, mientras que las demás concentraciones evaluadas no mostraron cambios significativos (Media \pm SEM; ACh 10^{-12} M: 108 ± 1 , ACh 10^{-11} M: 129 ± 8 , ACh 10^{-10} M: $114 \pm 7,5$, ACh 10^{-9} M: 105 ± 10 , ACh 10^{-8} M: 107 ± 9). No se observó modulación en las moléculas CD86 y CD40 en las CD tratadas con ACh frente a las CD no tratadas (dato no mostrado). Esto podría estar indicando un efecto activador de las CD por la ACh.

Posteriormente, realizamos ensayos de cultivo alogeneico donde enfrentamos a las CD provenientes de precursores de médula ósea de ratones BALB/c tratadas o no con ACh 10^{-11} M por 18 h, con esplenocitos de ratones C57BL/6. Después de 5 días, observamos una mayor proliferación de los esplenocitos que estuvieron en contacto con las ACh-CD respecto a los que estuvieron en contacto con las CD no tratadas (figura 25B).

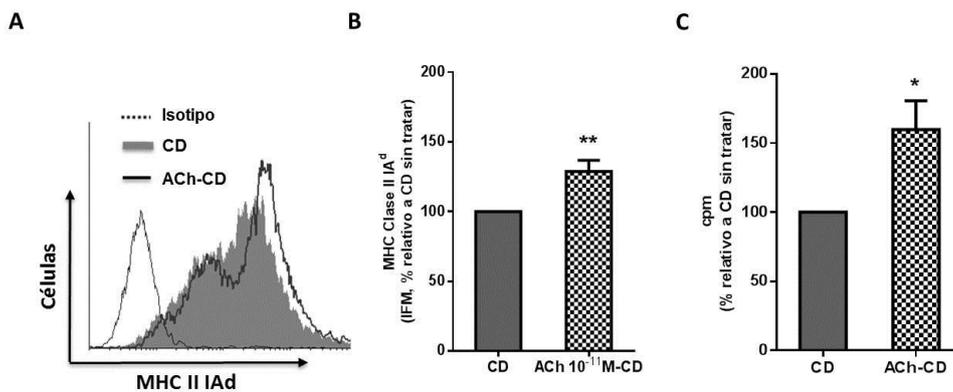


Figura 25. ACh incrementó la expresión de la MHC Clase II IA^d así como la capacidad estimuladora de las CD. (A) CD fueron expuestas o no a ACh 10^{-11} M durante 18 h (1×10^6 /ml) y la expresión de la MHC Clase II IA^d fue evaluada por citometría de flujo. En el panel (A) se muestra un histograma representativo mientras que en el panel (B) se muestra la media \pm SEM de IFM expresada como porcentaje relativo a CD sin tratar, asignándole un valor arbitrario de 100% a las CD no tratadas (n= 3-5 experimentos). (C) CD fueron expuestas o no a ACh 10^{-11} M durante 18 h (1×10^6 /ml), se lavaron y enfrentaron a esplenocitos alogeneicos de C57BL/6 (relación CD/linfocitos = 1:5) por 5 días. La proliferación fue evaluada por incorporación de timidina tritiada. Los resultados se expresan como la media \pm SEM del porcentaje relativo a CD sin tratar (n=3 por triplicado), asignándole un valor arbitrario de 100% a las CD no tratadas. El % de proliferación de esplenocitos cultivados solos fue en todos los casos menor al 10% (dato no mostrado). *p<0.01 vs CD sin tratar.

Por otra parte, en forma similar a lo encontrado en CD humanas, observamos que las CD tratadas con ACh mostraron un incremento significativo en la producción de TNF- α frente a las CD sin tratar (figura 26A). Además, tampoco observamos cambios

significativos al medir la producción de IL-10 e IL-12 donde el nivel fue menor a 50 pg/ml en ambos tratamientos (figura 26B y C).

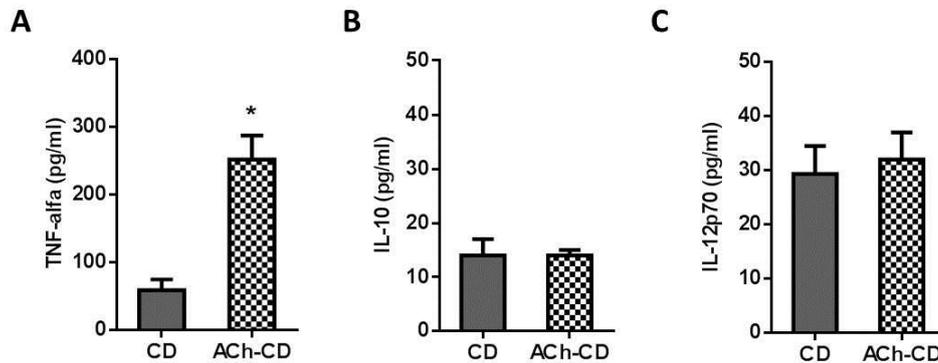


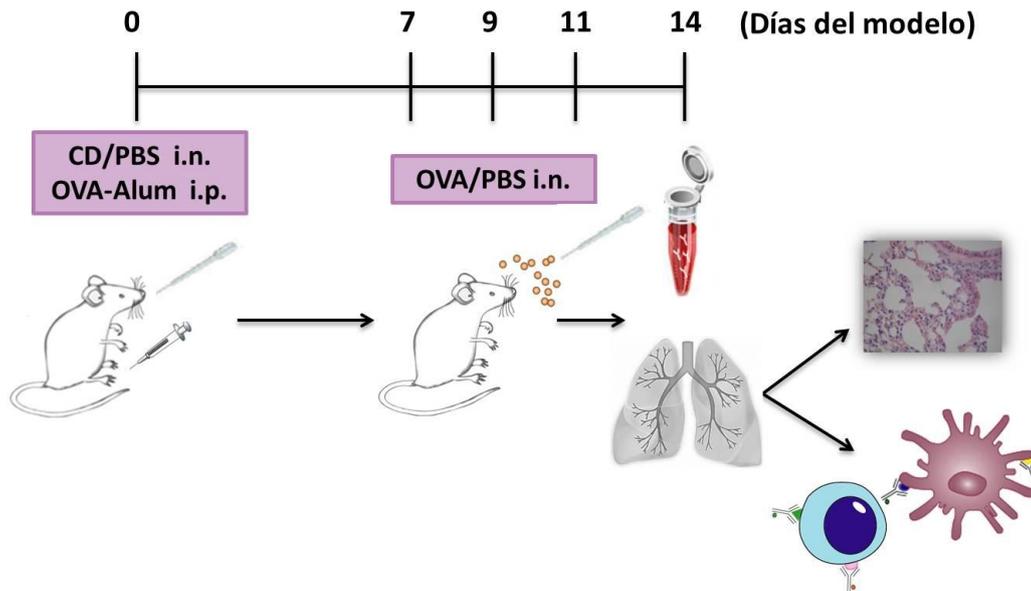
Figura 26. ACh incrementó la producción de TNF- α en las CD. CD fueron expuestas o no a ACh 10^{-11} M durante 18 h (1×10^6 /ml) y la producción de TNF- α (A), IL-10 (B) e IL-12p70 (C) fue evaluada por ELISA (media \pm SEM de n= 3-5 experimentos).

4. 2. Las CD tratadas con ACh favorecen la génesis de un proceso inflamatorio alérgico pulmonar (modelo *in vivo*)

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in vitro*, quisimos evaluar la capacidad de las ACh-CD de modular la respuesta inflamatoria *in vivo*. Para lo cual, desarrollamos un modelo murino BALB/c de alergia pulmonar inducido por instilación de OVA adaptado del modelo original descrito por Lambrecht y Hammad y realizado de rutina en nuestro laboratorio (42,138).

Como se describió en Materiales y Métodos, el primer día del modelo, se instilaron i.n. las CD previamente primadas (Grupo: ACh-CD) o no (Grupo: CD) con ACh 10^{-11} M por 18 h a dos grupos de ratones. Un tercer grupo se instiló con PBS en reemplazo de CD (Grupo: PBS). En todos los casos, los ratones se sensibilizaron i.p. con solución OVA-Alum, minutos después de la instilación de las CD / PBS. Luego, a partir del día 7, se desafiaron 3 veces con solución OVA i.n., como se describe en el esquema 1, culminando el modelo al día 15, con la extracción de sangre retro-orbital para el dosaje de IgE y el procesamiento de los pulmones (esquema 1).

En paralelo, a un cuarto grupo se lo instiló i.n. con PBS en lugar de CD, y se lo desafió con PBS en lugar de solución OVA; a este grupo se lo denominó grupo control sin alergizar (Grupo: Control Sano).



Esquema 1. Diseño experimental del modelo *in vivo* de génesis de respuesta inflamatoria alérgica pulmonar adaptado en nuestro laboratorio (explicación en el texto).

Como una medida del desarrollo de la respuesta inflamatoria a la OVA, medimos la producción de IgE en el suero de los animales tratados, y observamos que no hubo diferencias significativas entre los ratones instilados tanto con PBS, CD o ACh-CD. Como era de esperarse, observamos que el nivel de IgE OVA-específica fue significativamente mayor en todos los grupos alergizados (PBS, CD, ACh-CD) respecto al grupo control sano o no alergizado (Control Sano) (figura 27).

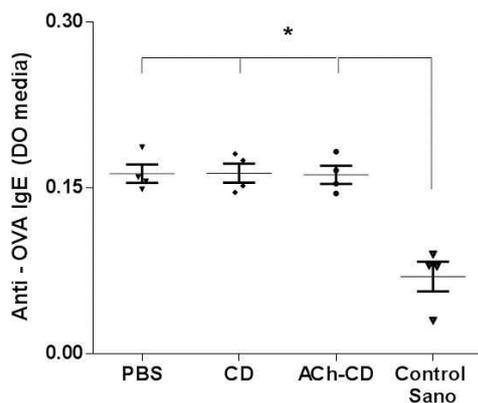


Figura 27. Anticuerpos IgE OVA-específicos en suero aumentados en ratones alergizados respecto a grupo control sano. Ratones BALB/c fueron instilados con CD e inyectados i.p. con OVA-Alum el mismo día, y aerolizados i.n. con OVA según se describe en Materiales y Métodos. El día del sacrificio, se obtuvieron muestras de suero y se midieron los niveles de IgE OVA-específica en los diferentes grupos de ratones alergizados (PBS, CD, ACh-CD) y en el grupo control sano (Control Sano) mediante ELISA. Los resultados se expresan como valores de absorbancia a 450 nm y representan la media \pm SEM de 4 animales por grupo. Experimento representativo de 2 realizados. * $p < 0.01$.

En primer lugar, antes del procesamiento de los pulmones, se tomaron fotografías de los lóbulos de los mismos para evidenciar los cambios morfológicos que presentaron los diferentes grupos al momento del sacrificio. Los tres grupos de ratones presentaron focos milimétricos rojizos distribuidos en la totalidad del órgano que se

correlacionan con los signos de inflamación observados luego en la histopatología (figura 28A).

A continuación, una muestra de los pulmones se destinó para el estudio histopatológico, como se explica en Materiales y Métodos, a fin de establecer los cambios tisulares inducidos por los tratamientos en los diferentes grupos. Los tres grupos han mostrado en común los siguientes parámetros de inflamación: vasocongestión de los capilares (figura 28B) e infiltrado inflamatorio con patrón intersticial (figura 28B), perivascular (figura 28C), y peribronquial (figura 28D). La celularidad del infiltrado fue principalmente de tipo mononuclear, y fue más denso en los grupos instilados con CD y ACh-CD, y mínimo en el grupo PBS.

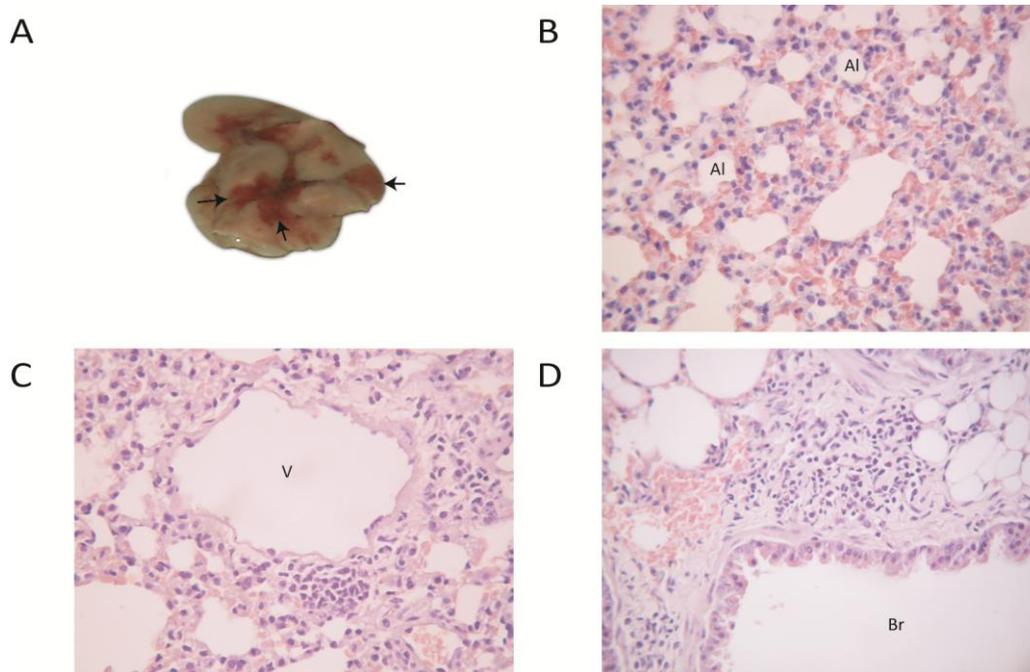


Figura 28. Parámetros comunes de inflamación entre los grupos. El día del sacrificio de los ratones, se extrajeron los pulmones, se tomaron fotografías y se aislaron secciones pertenecientes a los diferentes grupos alergizados (Grupos PBS, CD, ACh-CD) para análisis histopatológico. Se muestra una fotografía representativa de pulmón (A), y de H&E (B-D) mostrando parámetros comunes entre los grupos. (A) Vista macroscópica 1X; las flechas indican focos milimétricos rojizos, (B) H&E, magnificación 400X; se observa vasocongestión capilar e infiltrado intersticial. (C) H&E, magnificación 400X; se observa infiltrado mononuclear perivascular. (D) H&E, magnificación 400X; se observa infiltrado peribronquial. Al: Alvéolo, V: Vaso sanguíneo. Br: Bronquio. (n=2 experimentos realizado por duplicado)

Al comparar los distintos grupos, pudimos observar que ACh-CD presentó un masivo infiltrado mononuclear intersticial que provocó engrosamiento de los tabiques, disminución de las luces alveolares con reducción consecuente del espacio aéreo,

siendo hallazgos predominantes en este grupo respecto a los demás (figura 29A). Sumado a esto, como podemos observar en la figura 29B, este grupo presenta una pérdida de la estructura epitelial normal de los bronquiólos a causa de daño epitelial; en cambio, el grupo CD a pesar del infiltrado peribronquiolar que presenta, aún conserva la estructura normal de su epitelio. Finalmente, en la figura 29C podemos observar bronquios con descamación celular, hiperplasia de células epiteliales y liberación de mucus por células mucosecretoras. Estos cambios predominan en ACh-CD, siendo de menor intensidad en CD y mínimos en PBS.

En conjunto, estos resultados demuestran que el grupo ACh-CD posee mayor compromiso del parénquima pulmonar evidenciado por presentar una respuesta inflamatoria mayor asociada a signos de daño epitelial e hipersecreción de mucus.

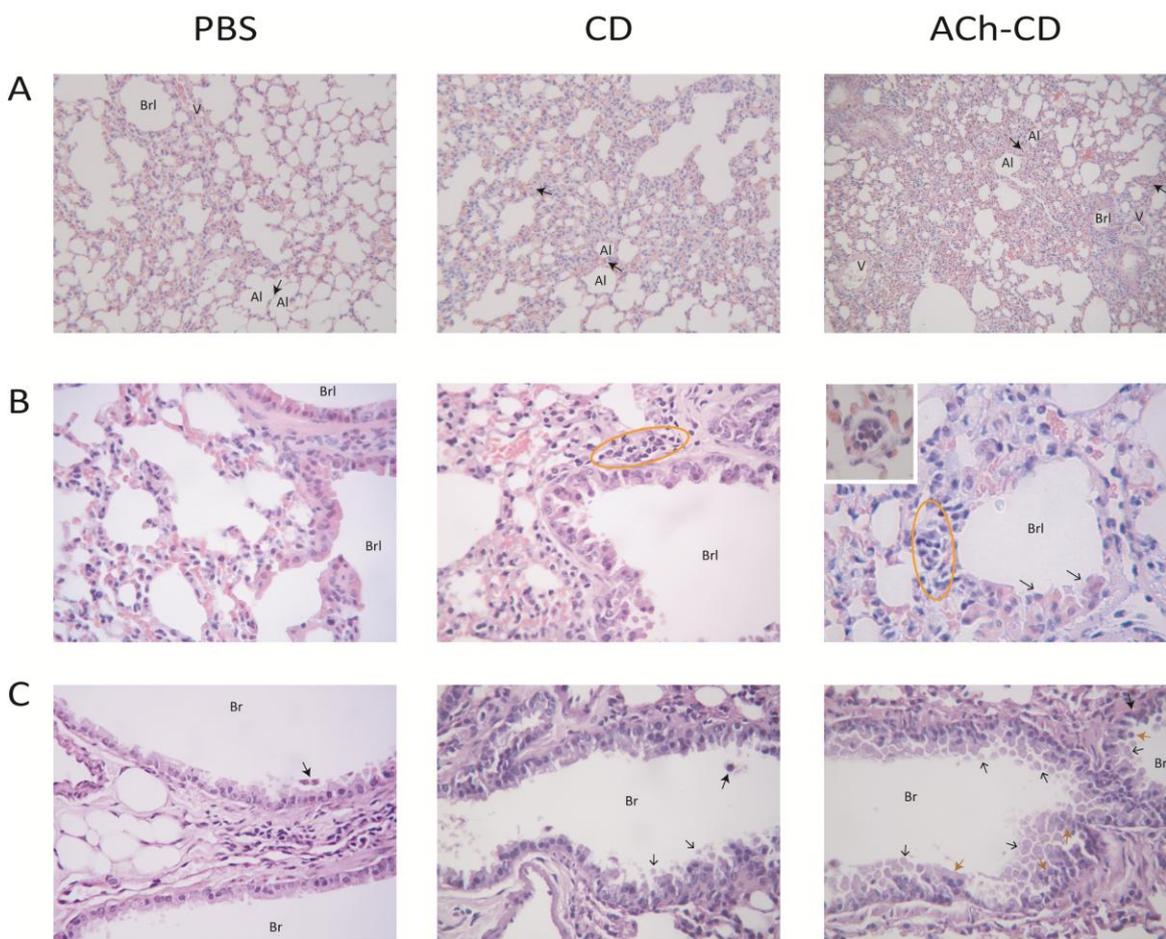


Figura 29. Pulmones del grupo ACh-CD presentan mayor daño tisular debido al masivo infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear. Se pueden observar fotografías representativas de los preparados histológicos con las coloraciones H&E (A, B) y PAS (C). Las fotografías muestran un experimento representativo de 2 realizados. (A) H&E, vista panorámica, magnificación 50X; las flechas negras indican el tabique inter-alveolar. (B) H&E, vista aumentada, magnificación 400X; las elipses indican infiltrado mononuclear peribronquiolar, y las flechas indican daño epitelial. Inserto en ACh-CD muestra arteriola con células mononucleares siendo reclutadas. (C) PAS, vista aumentada, magnificación 400X; las flechas negras llenas indican células PAS positivas, las flechas naranjas indican células epiteliales descamándose y las flechas negras vacías indican mucinas liberándose a la luz bronquial. Al: Alvéolo, V: Vaso sanguíneo. Br: Bronquio, Brl: Bronquíolo.

Debido al reclutamiento en el tejido pulmonar inducido por la transferencia de CD, decidimos analizar las poblaciones pulmonares por citometría de flujo. Para lo cual, los pulmones se procesaron como se explica en Materiales y Métodos, y como puede observarse en la figura 30, el grupo ACh-CD mostró un mayor porcentaje de células $CD11b^+CD11c^-$. Por el contrario, la población $CD11b^-CD11c^+$ disminuyó en este grupo de ratones respecto al grupo CD. Por último, no se observaron diferencias en la población $CD11b^+CD11c^+$ entre los grupos analizados (figura 30).

Es importante aclarar que a fin de evitar posibles falsos positivos en el análisis de las poblaciones celulares que mostraron cambios en los distintos tratamientos, se analizaron en paralelo teniendo en cuenta un tercer parámetro. Ha sido reportado que los macrófagos alveolares, frente a las CD y Mo, son células de alta autofluorescencia (células HAF, del inglés *High autofluorescence cells*) y que este parámetro puede utilizarse para la distinción de los mismos, cuando se evalúan los marcadores utilizados (23,159,160). Para esto, se adquirieron muestras de los tratamientos no marcadas y la población de células HAF se analizó individualmente (dato no mostrado). Al no mostrar cambios entre los grupos, los análisis se realizaron excluyendo las células HAF (figura 30 y 31).

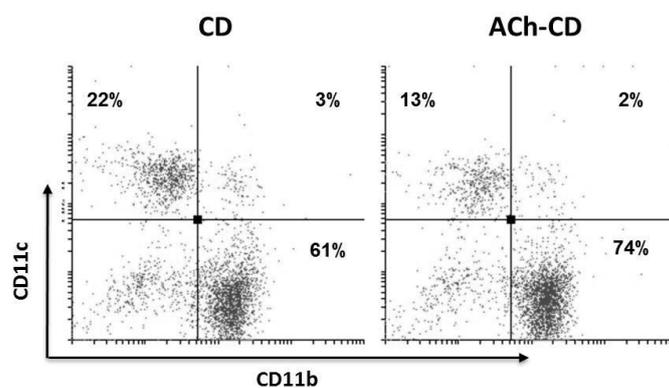


Figura 30. La instilación con ACh-CD en ratones alergizados genera un aumento del porcentaje de células CD11b⁺CD11c⁻ y una disminución de las CD11b⁻CD11c⁺ en el pulmón. CD pre-tratadas o no con ACh 10⁻¹¹M fueron instiladas en ratones BALB/c (5x10⁵ células / ratón), que minutos después fueron sensibilizados con OVA-Alum i.p. y desafiados con OVA 3 veces, según se describe en Materiales y Métodos. Luego de 15 días de instiladas las CD, los ratones fueron sacrificados y los pulmones fueron procesados. Las poblaciones fueron analizadas por citometría de flujo tomando la región de las CD-Mo-Macrófagos en el dot-plot Tamaño vs Granularidad y excluyendo los macrófagos por autofluorescencia (células HAF). La figura muestra un dot-plot representativo de 2 experimentos realizados.

Para descartar que esta disminución de las CD11b⁻CD11c⁺ se debiera, al menos en parte, a la población de CD plasmacitoides presentes en el pulmón (24), analizamos la población B220⁺ de esta región y no se observaron diferencias entre los grupos, siendo alrededor del 15% de la región en ambos tratamientos (figura 31).

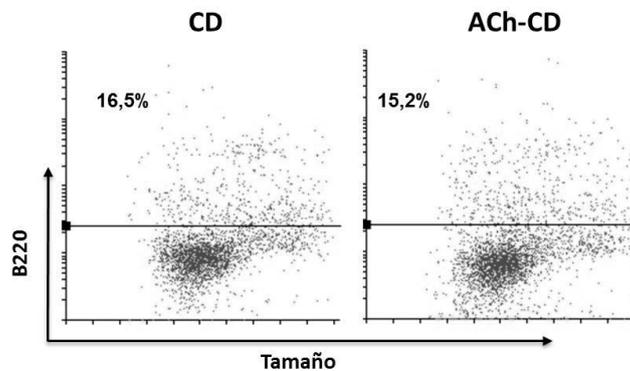


Figura 31. La instilación de ACh-CD no modula el porcentaje de células B220⁺ en pulmones de ratones alergizados. CD pre-tratadas o no con ACh 10⁻¹¹M fueron instiladas en ratones BALB/c (5x10⁵ células / ratón), que minutos después fueron sensibilizados con OVA-Alum i.p. y desafiados con OVA 3 veces, según se describe en Materiales y Métodos. Luego de 15 días de instiladas las CD, los ratones fueron sacrificados y los pulmones fueron procesados. Las poblaciones fueron analizadas por citometría de flujo tomando la región de las CD-Mo-Macrófagos en el dot-plot Tamaño vs Granularidad y excluyendo los macrófagos por autofluorescencia (células HAF). La figura muestra un dot-plot representativo de 2 experimentos realizados.

Por otro lado, evaluamos la población de LT CD4⁺ y CD8⁺, y no observamos diferencias significativas entre los grupos (datos no mostrados).

Estos resultados, nos permiten inferir que la transferencia de CD tratadas con ACh, condujo a un mayor reclutamiento de células CD11b⁺CD11c⁻ en el pulmón respecto a las CD. Nos preguntamos entonces si las CD tratadas con ACh podrían estar secretando alguna quimioquina que favoreciera el reclutamiento de Mo. Para ello, evaluamos en los cultivos de CD tratadas o no con ACh 10⁻¹¹M por 18 h, la producción de MCP-1, la quimioquina más potente para el reclutamiento de este tipo celular al tejido inflamado (161). Como puede observarse en la figura 32, encontramos que la ACh-CD presentó

un nivel significativamente mayor de producción de esta quimioquina, respecto a las CD no tratadas.

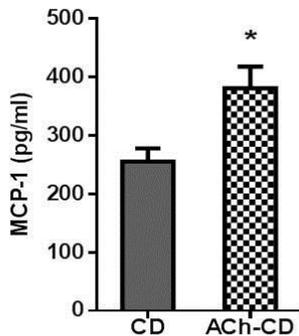


Figura 32. ACh incrementó la producción de MCP-1 en las CD. CD fueron expuestas o no a ACh 10^{-11} M durante 18 h (1×10^6 /ml) y la producción de MCP-1 fue evaluada por ELISA (media \pm SEM de n= 3-5 experimentos).

Los resultados del último objetivo, nos permiten inferir que, al igual que en humanos, la ACh activa a las CD murinas, aumentado su capacidad estimuladora, y que la transferencia de ACh-CD a ratones que inician un proceso alérgico provocaría un impacto sustancial tanto en la morfología como en la funcionalidad del epitelio pulmonar, consecuente al reclutamiento de células de etiología inflamatoria, causando un mayor compromiso del tejido.

DISCUSIÓN

Desde tiempos remotos se ha observado una asociación entre el estado psicológico y el inmunológico del individuo; sin embargo, hasta hace unos pocos años el sistema nervioso y el sistema inmune se consideraban sistemas individuales y autónomos. Recién en la década del '70, la interacción entre ambos obtiene su respaldo científico, al demostrarse la producción de hormonas de estrés ante la presencia de una respuesta inmune (162). En los primeros años de investigación en el área, se consideraba que el flujo de información estaba más bien dirigido desde el sistema nervioso hacia el sistema inmune, ejerciendo el primero un control homeostático sobre el segundo. Si bien esto último es cierto, años después se comprobó que el diálogo entre ambos sistemas es bidireccional y se encuentra modulado por la liberación endócrina y parácrina tanto de hormonas como de citoquinas y neuromediadores (79–81,163). Este diálogo neuroinmune es, actualmente, un factor más a tener en cuenta en la etiopatogénesis de ciertos desórdenes multifactoriales, como las patologías alérgicas y autoinmunes.

Recientemente, se ha establecido que la ACh excede su papel como neurotransmisor del sistema parasimpático, hallándose involucrada en la regulación local de numerosas funciones celulares, actuando como un mediador parácrino en una amplia variedad de células no-neuronales. Entre estas últimas, se encuentran las células inmunes, las cuales presentan receptores colinérgicos, así como las enzimas necesarias para la síntesis y liberación del neurotransmisor (1,164).

En cuanto a la acción inmunomodulatoria de la ACh, la atención se ha centrado mayormente en los procesos inflamatorios que ocurren en el tracto respiratorio, participando en el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias, tales como el asma y el EPOC (101,99,127).

Nuestro grupo de investigación ha reportado la presencia de un sistema colinérgico no-neuronal completo en las CD y su capacidad de respuesta ante la estimulación por agonistas colinérgicos, resultando en la activación de las CD y una mayor inducción de respuesta T en un cultivo alogeneico respecto a las CD sin tratar (109). Estos resultados nos sugirieron que la ACh cumpliría un papel relevante en la regulación de la funcionalidad de las CD y en consecuencia, de la respuesta T. A partir de esto, nos

preguntamos, entonces, qué impacto impondría esta actividad moduladora al curso de los fenómenos inflamatorios crónicos que afectan las vías aéreas.

En los últimos años, se ha caracterizado un nuevo tipo de células T CD4⁺ Th2, con un perfil de producción de citoquinas característico. Estas células, llamadas Th2 inflamatorias, se encuentran asociadas a las patologías alérgicas y en contraste con las Th2 típicas, producen altos tenores de TNF- α y no producen IL-10 (49). La inducción de este perfil inflamatorio es dependiente de la interacción entre las moléculas OX40L-OX40 presentes en las CD activadas y los LT CD4⁺, respectivamente (74).

En primer lugar, observamos que tanto la ACh como el carbacol inducen sobre las CD la expresión de esta molécula OX40L. A su vez, incrementa la producción de MDC y TARC, dos quimioquinas encargadas de guiar el reclutamiento de células Th2 al sitio de inflamación alérgica (44,56). Estos resultados coinciden con los aportados por Liu y colaboradores (165), los cuales demostraron que un agonista no-selectivo de mAChR, la metacolina, incrementó la expresión de OX40L por las CD aisladas de la mucosa nasal. Juntos, estos resultados sugieren que el sistema colinérgico favorece la expresión de esta molécula co-estimuladora de perfil Th2 en distintos subtipos de CD.

Debido a que el TSLP demostró cumplir un papel crítico en la inducción y mantenimiento de las respuestas alérgicas asociadas al epitelio, nos propusimos analizar cuáles de estas acciones mediadas por TSLP sobre las CD podía encontrarse facilitadas por ACh. Como había sido reportado previamente (71,74), observamos que el TSLP induce la expresión de OX40L. Interesantemente, el nivel de expresión, así como el número de células OX40L⁺, fue aún mayor al tratar a las CD con TSLP+ACh, respecto a las CD tratadas con los estímulos individualmente, efecto que contrasta con lo reportado para IL-33, que aun siendo una molécula clave en la potenciación del perfil Th2, no induce ni refuerza la expresión de OX40L sobre las CD (166). Esto nos sugiere que la ACh, podría promover aún más la inducción de respuestas de etiología Th2, incluso en presencia de fuertes inductores del perfil, tales como el TSLP, propiedad que la diferencia de la IL-33.

Un efecto similar hemos observado al evaluar la expresión de las moléculas HLA-DR y CD83. La expresión de estas moléculas fue aún más alta en CD tratadas con TSLP+ACh, comparada con la observada en las células cultivadas en presencia de un estímulo solo,

indicando que la ACh podría también facilitar el proceso de maduración de las CD inducido por TSLP. En los últimos años, diferentes grupos de investigación (167–169) han demostrado mediante experimentos de silenciamiento de CD83, que además de ser un marcador de maduración, su presencia genera una mayor proliferación T al aumentar la capacidad estimuladora de las CD en un cultivo alogeneico.

Como hemos reportado previamente (109), la ACh promueve la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-8 por las CD, efecto que es acrecentado al tratarse las mismas con TSLP+ACh. Esto se diferencia de lo observado en las TSLP-CD donde no se observó un aumento significativo en la producción de TNF- α , pero sí en IL-8, acorde a lo reportado previamente (49,71). Aun no considerándose una citoquina típica de perfil Th2, el TNF- α juega un importante rol en el desarrollo del asma y la inflamación alérgica, hallándose exacerbada su producción en las vías aéreas de asmáticos, así como ocurre con la ACh (121). Este incremento en la producción de TNF- α se correlaciona con ciertos haplotipos que se encuentran asociados a un mayor riesgo de asma (170,171).

El pre-tratamiento con AT, pero no con MM, previno significativamente el efecto favorecedor inducido por la ACh sobre la capacidad del TSLP para incrementar la expresión de OX40L y CD83, así como la producción de TNF- α e IL-8, sugiriendo que la acción moduladora de la ACh es ejercida a través de los mAChR. Esto es consistente con lo observado en nuestro trabajo previo (109). Además, mientras no observamos cambios en la expresión del TSLPR en las ACh-CD, hemos demostrado que el TSLP aumenta únicamente la expresión de M3 en las CD. Esto posee una importante relevancia en la patogenia del asma, ya que se sugiere que la expresión aumentada de M3 puede tener un efecto sustancial en la potenciación de su rol pro-inflamatorio, al aumentar la sensibilidad de ligandos endógenos liberados en concentraciones fisiológicas, influyendo en la severidad de la enfermedad y en la eficacia de los agentes terapéuticos (172).

Finalmente, para evaluar la capacidad de la ACh de promover el desarrollo de respuestas Th2, analizamos cómo las CD tratadas con la misma podrían estimular la proliferación T y la producción de citoquinas de perfil Th2 inflamatorio, IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- α , por los LT CD4⁺ en un cultivo alogeneico. En primer lugar, observamos que el

CML de las ACh-CD presentó una mayor proliferación y un incremento en la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 por los LT CD4⁺, en comparación con las CD no tratadas. A su vez, observamos también la disminución de la relación Tbet/GATA3 en estos cultivos, respecto al control, sugiriendo una prevalencia del perfil Th2 por sobre el Th1. Sorpresivamente observamos que, aún frente a un microambiente promotor de respuesta Th1 generado por la presencia de IL-12 durante el cultivo alogeneico, las ACh-CD lograron inhibir la promoción de este perfil, observándose disminuidas las células T CD4⁺IFN- γ ⁺ en estos CML. En contraste con estos resultados, Ito y colaboradores (74) han reportado la dominancia del perfil Th1 sobre el Th2 en presencia de IL-12 en los cultivos, más allá de la interacción OX40L-OX40 inducida por la activación de las CD con TSLP. Esto nos sugiere que el tratamiento con ACh podría inducir en las CD la expresión de otros factores no evaluados, desde moléculas de superficie hasta mediadores solubles, que estarían afectando de una u otra manera la respuesta de los LT CD4⁺ a la IL-12, lo que conduciría a un descenso de las células T CD4⁺ productoras de IFN- γ observado.

Previamente (109), hemos observado que la estimulación de las CD inmaduras con agonistas colinérgicos aumentó la expresión de HLA-DR, la producción de TNF- α y la capacidad estimuladora de las mismas en un cultivo alogeneico. Estos cambios pro-inflamatorios observados en las CD inmaduras fueron mediados por los mAChR. Llamativamente, estos efectos se volvieron opuestos si las CD se encontraban maduras con LPS. Estos resultados fueron consistentes con los reportes de Borovikova y Tracey (86,104,106), donde demuestran que la estimulación del nervio vago y la consecuente liberación de ACh por los LT esplénicos, suprime la producción de citoquinas pro-inflamatorias por los macrófagos esplénicos, inhibiendo el shock séptico por LPS. Este proceso, ampliamente estudiado, se denominó “vía colinérgica anti-inflamatoria”, y se encontraría mediada por el α 7-nAChR (119,173).

Apoyando estos resultados, en los últimos años, diferentes autores han evaluado las acciones ejercidas por la nicotina sobre las CD. Vasallo y colaboradores han demostrado que el extracto de cigarrillo/nicotina aumenta la producción de IL-8 en las CD inmaduras, y de PGE2 en CD maduras, disminuye la expresión de las moléculas co-estimuladoras y la producción de IL-12 en las CD maduras, promoviendo la

diferenciación de las células T CD4⁺ en un perfil Th2, con producción de IL-4, IL-10 y disminución de IFN- γ (174,175). Estos resultados fueron avalados por el grupo de Nouri-Shirazi quienes mostraron, además, que la nicotina inhibe la captura del Ag en las CD, su diferenciación desde Mo, y suprime la producción de citoquinas pro-inflamatorias en CD maduras con LPS (176–178). Por otra parte, Aicher y colaboradores han reportado que la nicotina induce la maduración fenotípica de las CD, estimulando la producción de IL-12 y la diferenciación de células T CD4⁺ en un perfil Th1 (118).

En conjunto, estos resultados sugerirían que la estimulación colinérgica ejerce efectos duales sobre las CD dependiendo de su grado de maduración, así como también del tipo de receptor colinérgico involucrado. No obstante, fue interesante observar que las CD maduras con TSLP, a diferencia de las maduras con LPS, que recibieron posteriormente estimulación con ACh (TSLP+ACh-CD), aumentaron aún más la expresión de sus moléculas co-estimuladoras así como la producción de citoquinas pro-inflamatorias, estimulando una mayor respuesta proliferativa de LT CD4⁺ *naïve*, con producción incrementada de IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- α por los mismos en un cultivo allogeneico, en comparación a los estimulados con TSLP-CD y ACh-CD. Podemos decir entonces, que la ACh no solo no inhibió los efectos pro-inflamatorios en las CD tratadas con TSLP, sino que los mismos fueron mayores aún, reforzando el fenotipo inductor de respuestas Th2 inflamatorias.

Esto demuestra que el efecto final del estímulo colinérgico sobre las CD depende no solamente del grado de maduración de la misma, sino también del tipo de estímulo madurativo presente en el microambiente como los PAMPs, citoquinas o quimioquinas. Estos dos aspectos pueden influenciar, además, en la expresión de los nAChR y mAChR que median la respuesta, los cuales, según lo reportado (109,165,178), presentarían efectos contrastantes.

Por otro lado, quisimos evaluar si el efecto observado por la ACh de favorecer la acción del TSLP sobre las CD derivadas de Mo, podía abarcar otras subpoblaciones de CD. Para esto utilizamos CD mieloides circulantes CD1c⁺. Estas son precursoras de las CD1c⁺ residentes de las mucosas nasal, intestinal y pulmonar (22,51,179,180)(51), y se considera que, a pesar de poseer características fenotípicas comunes, adquieren su

total funcionalidad luego de migrar al tejido (51); es decir, que las CD1c⁺ circulantes aún no se encuentran en un completo estado de diferenciación. Resultados similares a los observados en las CD derivadas de Mo, se obtuvieron al evaluar la producción de TNF- α tanto en las TSLP-CD como en los cultivos alogeneicos de las mismas. Este último punto coincide con lo reportado previamente por Soumelis y colaboradores (49), mientras que Melum y su grupo han reportado el mismo efecto en CD CD1c⁺ de la mucosa nasal. Estos autores han demostrado que el TSLPR no se expresa constitutivamente en las CD CD11c⁺ (49) o CD CD1c⁺ (51) circulantes, sino que inducen su expresión y activación luego de 24 h de cultivo con o sin TSLP u otros estímulos madurativos, como poly I:C (51).

Al tratar a las CD CD1c⁺ con ACh, observamos que a diferencia de lo observado en las CD derivadas de Mo, no incrementa la producción de TNF- α al compararlas con las CD no tratadas. Lo mismo ocurrió en el contexto de un cultivo alogeneico entre ACh-CD y LT CD4⁺ *naïve*, donde no observamos aumentos significativos de producción de IL-2, ni TNF- α , así como tampoco de IL-5.

En relación a lo anterior, la diferencia en el efecto de la ACh sobre las CD circulantes respecto a las derivadas de Mo, las cuales poseen orígenes y fenotipos distintos, podría justificarse por la probable diferencia en la densidad y subtipos de mAChR expresados, de los cuales se ha reportado, en diferentes tipos celulares tales como linfocitos y células epiteliales bronquiales, que varía su expresión dependiendo de los estímulos presentes en el medio, así como de su grado de activación (134,172,181,182). No obstante, al tratar a las CD con TSLP+ACh, se obtuvieron resultados similares a los observados con las CD derivadas de Mo, sugiriendo que el efecto favorecedor de una molécula sobre otra no se encuentra restringido a un subtipo particular de CD.

Estos resultados, en conjunto, demuestran que las CD circulantes y las CD residentes de tejidos presentan una diferente modulación tanto por TSLP como por ACh, determinado en parte por la presencia/ausencia de estímulos madurativos en su microambiente. Prueba de ello, es la presencia de una mayor expresión del receptor así como una mayor población de CD CD1c⁺TSLPR⁺ en sangre y bronquios de pacientes asmáticos (183), donde el nivel de TSLP en suero está aumentado considerablemente respecto a los dadores sanos (65).

Así como otros estímulos inductores de activación y maduración de las CD, como lo son los PAMPs y el CD40L, el TSLP ha demostrado incrementar la expresión de las moléculas HLA-DR, CD80, CD86 y CD83 en las CD (49,59,71). Sin embargo, contrario a los PAMPs y al CD40L, el TSLP no promueve la producción de citoquinas promotoras de perfil Th1 y Th17, como lo son la IL-12 y la IL-23, respectivamente, u otras citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , e IL-6 (49,74).

Otra propiedad importante de las TSLP-CD es su capacidad de producir quimioquinas que reclutan neutrófilos (IL-8) y células Th2 (MDC y TARC) (49,51,71). La IL-8 se encuentra incrementada en las vías aéreas de pacientes con asma severo, lo cual demuestra que los neutrófilos, no solo los eosinófilos, juegan un rol relevante en la fisiopatogenia del asma severo. Por otro lado, diferente a las clásicas células Th2, las cuales producen IL-4, IL-5 e IL-13, las células Th2 inducidas por CD estimuladas con TSLP parecen adquirir un fenotipo inflamatorio caracterizado por la producción TNF- α (44,49,74). Estas células Th2 inflamatorias jugarían un importante rol, no solo en el desarrollo de enfermedades alérgicas como el asma, sino también en la progresión del cáncer (53).

Nuestras observaciones indican que la ACh provoca una serie de cambios en las CD idénticos a los inducidos por el TSLP; una incrementada expresión de OX40L, así como de HLA-DR y CD83, la estimulación de la producción de quimioquinas capaces de inducir el reclutamiento de neutrófilos (IL-8) y células Th2 (TARC y MDC) y una incrementada producción de IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- α por los LT CD4⁺ en el curso de un CML. Más experimentos son necesarios para determinar la relevancia de la ACh neuronal y no-neuronal, en la promoción de respuestas Th2 *in vivo*.

A raíz de que una de las acciones principales de la ACh es la contracción del músculo liso, los anticolinérgicos están siendo ampliamente utilizados como broncodilatadores en EPOC y asma (121,127,184). Sin embargo, esta cada día más aceptado que los anticolinérgicos no solo previenen la broncoconstricción sino que reducen la secreción mucosa, la infiltración neutrofílica, y la remodelación de la vía aérea (127–129). Se asume que estos efectos protectivos involucran la capacidad de los anticolinérgicos de prevenir la interacción con ACh con los mAChR expresados tanto por las células musculares lisas como las epiteliales de las vías aéreas (130–132).

Nuestros resultados sugieren que los anticolinérgicos podrían también proteger las vías aéreas en el curso de una enfermedad obstructiva de las mismas, mediante la inhibición de la polarización de las CD hacia un perfil promotor de respuesta Th2 inducido por la ACh.

Las acciones inmunomodulatorias mediadas por la ACh en el asma, también juegan un importante rol en otras enfermedades alérgicas, por ejemplo la dermatitis atópica. Es sabido que la piel presenta un sistema colinérgico no-neuronal completo (185); más aún los niveles de ACh difieren marcadamente entre los individuos sanos y los pacientes con dermatitis atópica, predominando esto en la capa superficial de la piel. De hecho, se demostró que ACh puede estar incrementada 14 veces en un eczema de piel de pacientes con dermatitis atópica comparado con muestras de piel sana (50). A partir de los resultados de esta tesis, proponemos que la ACh podría estimular la capacidad de las LC no solo de reclutar células Th2, sino también a estimular la producción de citoquinas de perfil Th2, contribuyendo al desarrollo de la inflamación alérgica en la piel. Más estudios son necesarios para validar esta hipótesis.

Junto con la ACh, el sistema adrenérgico cumple un rol central en tanto en la relajación del músculo liso debido a la presencia de ARs en el mismo, así como en el control vascular y glandular mediante la inervación de los mismos por fibras adrenérgicas. A su vez, el BALT se encuentra inervado ampliamente por neuronas adrenérgicas (40,83). Las exacerbaciones típicas de los procesos alérgicos se han asociado íntimamente a la desregulación de la respuesta al estrés (153). Además, la evidencia acumulada hasta el momento sugiere que la NE podría influenciar la presentación antigénica, activación, proliferación y diferenciación de las células T, debido a la presencia de ARs en estas células y de la inervación restringida hacia el área paracortical en los OLS (93).

A fin de comparar si la modulación de las CD por el sistema colinérgico en el contexto de una respuesta inmune alérgica es exclusiva de este sistema, nos propusimos evaluar la modulación de las mismas por el sistema adrenérgico. En comparación con ACh-CD, no observamos cambios significativos en la producción de MDC y TARC por las NE-CD, así como tampoco de TNF- α e IL-8. Resultados diferentes observamos al evaluar la expresión de las moléculas co-estimuladoras OX40L, CD83 y HLA-DR; en este caso, las

NE-CD aumentaron significativamente la expresión de estas moléculas en comparación a las CD sin tratar.

Al pre-activar a las CD con TSLP y luego exponerlas a la NE, observamos un aumento significativo en la producción de TNF- α e IL-8, respecto a las TSLP-CD y NE-CD. Esto nos sugiere que la NE podría favorecer los efectos pro-inflamatorios del TSLP en las CD. Sin embargo, esto último no fue lo observado al evaluar las moléculas de superficie OX40L, CD83 y HLA-DR, donde el tratamiento con ambos estímulos no generó una mayor expresión de las mismas, respecto a las CD tratadas con ambos estímulos individuales.

Existen trabajos previos que demuestran el efecto de la NE y/o agonistas β 2-adrenérgicos en CD maduras con LPS o activadas con CD40. Maestroni y colaboradores reportaron que la estimulación con NE en CD murinas maduras con LPS, inhibe la diferenciación hacia un perfil Th1, debido a la incapacidad de las CD tratadas de producir IL-12 y del aumento de la producción de IL-10, mediado por los β 2-ARs. Resultados similares fueron demostrados por Nijhuis y su grupo (186), los cuales observaron una mayor polarización hacia un perfil Th2 y Treg, en co-cultivos de LT OVA-específicos con CD primadas con OVA, maduras con LPS y pre-tratadas con NE. A su vez, Goyarts y colaboradores (158) observaron en CD humanas derivadas de precursores CD34⁺, que la NE inhibe la producción de IL-12, IL-23, TNF- α e IL-6 mediado por β -ARs, sin afectar la producción de IL-10. Resultados similares fueron observados en Mo y CD derivadas de Mo humanas por Panina-Bordignon y colaboradores (187), quienes además demostraron la inhibición del perfil Th1 en LT CD4⁺ *naïve* activados con mitógenos y pre-tratados con agonista β 2-adrenérgico.

Actualmente, se considera que la respuesta celular al estímulo adrenérgico, así como ocurre con el colinérgico, depende del receptor involucrado, que a su vez es dependiente, al menos parcialmente, del grado de activación celular; prueba de ello, es el aumento de los β 2-ARs en CD maduras con LPS, así como la variabilidad de estos receptores en las células T CD4⁺ diferenciadas, donde se encuentran aumentados en células Th1 y disminuidos en las Th2 (83). A partir de estos resultados, y en base a los antecedentes descriptos, podemos inferir que la naturaleza del estímulo activador presente en el microambiente de las CD, es crítica para definir el tipo de citoquinas

producidas por las mismas; mientras la NE estimula la producción de TNF- α en las CD pre-activadas con TSLP, la inhibe en las CD maduras con LPS.

Para el último objetivo de esta tesis, nos propusimos evaluar la participación de las CD moduladas por la ACh en la génesis de un proceso inflamatorio alérgico de las vías aéreas en un modelo *in vivo*. En primer lugar, al evaluar la expresión de la molécula MHC II (IA^d) en CD tratadas con ACh, observamos un aumento significativo de la misma, acompañado por un incremento en la capacidad estimuladora de las CD en un cultivo alogeneico. Por otro lado, observamos que mientras no indujo cambios en la producción de IL-10 ni de IL-12p70, la ACh aumentó significativamente la producción de TNF- α en las CD. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en las CD humanas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in vitro*, evaluamos la capacidad de las ACh-CD de modular la respuesta inflamatoria en un modelo murino BALB/c agudo de alergia pulmonar inducido por OVA-Alum. Al evaluar los pulmones de los distintos grupos, observamos que ambos grupos instilados con CD han demostrado signos de inflamación como vasocongestión capilar e infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear con patrón intersticial, perivascular y peribronquial; no obstante, el grupo ACh-CD fue el que presentó una disminución más marcada de las luces alveolares fruto del engrosamiento de los tabiques por el masivo infiltrado en el parénquima pulmonar. Además, a diferencia del grupo CD, ACh-CD ha presentado pérdida de la estructura normal del epitelio bronquiolar, y una mayor hiperplasia de células epiteliales bronquiales con liberación de mucus por células mucosecretoras (*goblet cells*). En conjunto, estos resultados demuestran que el grupo ACh-CD posee mayor compromiso del parénquima pulmonar.

Los modelos murinos de alergia actualmente descritos en la bibliografía, no logran imitar la totalidad de los signos del asma alérgico observados en humanos. Los modelos de corta duración o “modelos de asma aguda” consisten en la exposición de los animales a elevadas concentraciones de alérgeno por un período relativamente breve (entre días y pocas semanas). Estos modelos no han podido reproducir algunos

de los signos del asma alérgico observados en los asmáticos crónicos, como la remodelación de la vía aérea y el daño epitelial (144).

Este último presenta alguna/s de las siguientes características: áreas de discontinuidad en el revestimiento epitelial, desprendimiento epitelial (*epithelial shedding*), y/o membranas basales desnudas. El daño epitelial es una característica típica en el individuo asmático, observado tanto en la histopatología como en el BALF (188), que no ha sido ampliamente demostrada en modelos murinos de alergia. Se encuentra aceptado que el infiltrado inflamatorio parecería estar involucrado en este proceso (189); luego de la acumulación de las células inflamatorias en el sitio, estas comienzan a liberar mediadores como leucotrienos, prostaglandinas, histamina, citoquinas, quimioquinas y otras moléculas relacionadas a la inflamación, que tendrían el potencial de aumentar la respuesta inflamatoria y de favorecer el daño y disfunción del tejido (190).

Por otro lado, modelos crónicos de más de 8 semanas o más cortos pero con más concentración de alérgeno y/o aerolizaciones más frecuentes, lograron imitar algunos cambios observados en los individuos asmáticos como el engrosamiento de la capa muscular subepitelial de los bronquios, la deposición de colágeno subepitelial, una mayor hiperplasia de células mucosecretoras y la consecuente oclusión de la luz de los bronquios por alta concentración de mucus, así como evidencias de daño epitelial o pérdida de la estructura normal de los bronquios (190–193).

A partir de estos antecedentes, podemos sugerir que en nuestro modelo, el grupo ACh-CD presenta tanto signos de inflamación aguda como el infiltrado de tipo mononuclear, así como también de crónica, ya que observamos daño epitelial e hiperplasia de células epiteliales y mucosecretoras, con una gran liberación de mucinas a la luz. Esto nos sugiere que la ACh, mediante la modulación de las CD, estaría involucrada en el avance del proceso inflamatorio alérgico, debido a que estas características del proceso crónico no se observaron en el grupo CD.

A continuación, al evaluar las poblaciones pulmonares presentes en los grupos CD y ACh-CD, observamos que este último mostró un mayor porcentaje de células CD11b⁺CD11c⁻. Este resultado sumado al análisis histopatológico, nos permite inferir

que la transferencia de CD tratadas con ACh, condujo a un mayor reclutamiento de células CD11b⁺CD11c⁻ en el pulmón respecto a las CD.

En relación a esto, cuando el pulmón es desafiado con sustancias extrañas que tienen el potencial de desencadenar un evento inflamatorio, tales como una infección microbiana o la exposición a un alérgeno, el epitelio activado produce quimioquinas pro-inflamatorias como MCP-1, capaces de reclutar a los Mo CCR2⁺ al tejido para diferenciarse allí en CD inflamatorias (23,161). Como mencionamos en la introducción, a estos se los conoce como “Mo inflamatorios” y son de fenotipo CD11b⁺CD11c⁻. Las CD inflamatorias son necesarias y suficientes para inducir la respuesta Th2 en modelos de alergia de las vías aéreas (23,194,195). Prueba de esto, es el trabajo de Kool y colaboradores (196) donde demuestran que la respuesta Th2 inducida por OVA-Alum se pierde totalmente al depletar a los ratones de las CD, pero es recuperada a partir de la transferencia adoptiva de Mo. Además, Robays y colaboradores demostraron que el CCR2 es indispensable para la expansión de las CD pulmonares en un modelo alérgico, la cual es dependiente del egreso de los Mo al torrente sanguíneo desde la médula ósea, proceso que se encuentra mediado por este receptor (195). De acuerdo con esto, se ha propuesto que altas concentraciones en suero de MCP-1 podrían estar generando este proceso, sugiriendo que las quimioquinas producidas localmente en la inflamación alérgica no solo reclutan y activan a las células inmunes, sino también podrían poseer un efecto sistémico estimulando a los precursores de médula ósea a extravasarse al torrente sanguíneo, como lo hace la eotaxina con los eosinófilos (195). Estos antecedentes sugieren que, bajo condiciones inflamatorias, la contribución de los Mo al *pool* de las CD es crucial. Además, se ha demostrado que las CD inflamatorias pulmonares son las principales encargadas en la producción de quimioquinas pro-inflamatorias influenciando la respuesta inflamatoria local (194).

Por todo esto, nos preguntamos entonces si las ACh-CD podrían estar secretando alguna quimioquina que favoreciera el reclutamiento de Mo. Efectivamente, observamos que las CD tratadas con ACh produjeron un nivel significativamente mayor de MCP-1, respecto a las CD no tratadas, sugiriendo que esta quimioquina podría estar implicada en el reclutamiento masivo de células mononucleares observado en la histopatología.

En relación a lo anterior, Gonzalo y colaboradores (197,198) demuestran que en un modelo de alergia inducido por OVA, a tiempos cortos (día 15) el reclutamiento es predominantemente mononuclear de tipo monocítico, con un pico dentro de las primeras 6 h luego de la aerolización con el alérgeno. A partir del día 18, observan un progresivo reclutamiento de LT y eosinófilos, y aunque el porcentaje de Mo es menor comparado al día 15, estos vuelven a ser reclutados al tejido dentro de las primeras 6 h luego de la siguiente aerolización. No observan niveles detectables ni de neutrófilos ni de células B o mastocitos. En relación a esto, observan la misma cinética en la producción de las quimioquinas respectivas de las diferentes poblaciones evaluadas, siendo MCP-1 la quimioquina involucrada en el reclutamiento de los Mo, al hallarse aumentada dentro de las primeras 6 h de la aerolización al día 15 (197,198). Posteriormente, el mismo grupo demuestra que la neutralización de MCP-1 disminuye drásticamente no solo la inflamación sino también la hiperreactividad bronquial, y lo asocian a la disminución de mediadores inflamatorios liberados por los Mo y LT; debido a esto sugieren que los Mo estarían involucrados en la eosinofilia posterior observada a partir del día 21 (199).

De forma consistente a los trabajos de Gonzalo y colaboradores, observamos en nuestro modelo de alergia inducido por OVA a día 14, un infiltrado predominante de células mononucleares $CD11b^+CD11c^-$, con células polimorfonucleares aisladas, y un porcentaje muy bajo de linfocitos sin diferencias entre los tratamientos. El infiltrado intersticial en el grupo alergizado PBS fue mínimo, y esto es consistente con lo reportado por Gonzalo y colaboradores, ya que en su modelo no realizan transferencia adoptiva de CD (198). Llamativamente, en el grupo CD y ACh-CD el infiltrado intersticial es mayor, reduciendo el espacio aéreo de los pulmones de estos ratones. Esto confirma que la transferencia adoptiva de las CD, y más aún de las tratadas con ACh, estaría induciendo el reclutamiento de las células mononucleares observado. Más aún, el grupo de Gonzalo y colaboradores demuestra que el porcentaje de Mo reclutados desciende a las 12 h de la última aerolización; en cambio, en nuestro modelo aún se observa este infiltrado hasta 72 h después tanto en los grupos CD como ACh-CD, sugiriendo que las CD transferidas estarían involucradas en la perpetuación del reclutamiento.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados sobre el rol de MCP-1 en el reclutamiento de Mo en el modelo descrito por Gonzalo y colaboradores, sumado a que observamos en las CD tratadas con ACh una mayor producción de esta quimioquina, consideramos que la perpetuación del proceso inflamatorio observada en nuestro modelo podría estar dirigido, al menos en parte, por la producción de MCP-1 presente en el tejido. Más experimentos son necesarios para confirmar el rol de esta quimioquina en nuestro modelo.

Estos resultados nos permiten inferir que, al igual que en humanos, las CD murinas son activadas por la ACh generando el aumento de su capacidad estimuladora. A su vez, la transferencia de ACh-CD a ratones que inician un proceso alérgico provocaría un impacto sustancial tanto en la morfología como en la funcionalidad del epitelio pulmonar, característico de procesos crónicos, sugiriendo un agravamiento del proceso alérgico inflamatorio agudo y resultando en un mayor compromiso de las vías aéreas.

CONCLUSIONES

En conclusión, nuestros resultados demuestran la relevancia del impacto de la ACh sobre las CD al imprimir en ellas un perfil Th2 que sería promotor de las respuestas inflamatorias crónicas. Nuestras observaciones indican que la ACh provoca una serie de cambios en las CD idénticos a los generados por el TSLP, un potente inductor del perfil Th2 inflamatorio. El asma alérgico es considerado una patología causada por una desregulación inmune y se encuentra asociado, principalmente, al desarrollo de este perfil. Estos resultados nos permiten comprender, parcialmente, el accionar de las CD bajo la influencia del neurotransmisor principal del sistema nervioso parasimpático en los procesos inflamatorios alérgicos.

Nuestras observaciones, demuestran además, la relevancia de la neuromodulación de las CD por la ACh en el inicio de los procesos alérgicos de las vías aéreas, al evidenciar mediante un modelo murino un parénquima pulmonar altamente comprometido debido a una mayor respuesta inflamatoria asociada a un reclutamiento masivo de células mononucleares en el intersticio, con un consecuente daño epitelial y una hipersecreción de mucus exacerbada (eventos observados normalmente en procesos inflamatorios crónicos). Estos hallazgos sugieren un rol crítico para la ACh, a partir de su impacto en las CD, en la fisiopatología del asma y las enfermedades obstructivas crónicas.

A pesar de ser el primer neurotransmisor descubierto, sigue sorprendiendo la diversidad funcional de la ACh; particularmente, en nuestro modelo, actuando como neuromodulador de la respuesta inmune en procesos inflamatorios inductores de un perfil Th2.

Podríamos afirmar que hemos encontrado un nuevo rol para una antigua molécula.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* 2008;**154**:1558–1571.
2. Kawashima K, Fujii T. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *J Pharmacol Sci* 2008;**106**:167–173.
3. Nomura T, Terada N, Kim WJ, Nakano K, Fukuda Y, Wakita A et al. Interleukin-13 induces thymus and activation-regulated chemokine (CCL17) in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 2002;**20**:49–55.
4. Wessler I, Roth E, Deutsch C, Brockerhoff P, Bittinger F, Kirkpatrick CJ et al. Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Br J Pharmacol* 2001;**134**:951–956.
5. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973;**137**:1142–1162.
6. Schraml BU, Reis e Sousa C. Defining dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2015;**32**:13–20.
7. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002;**20**:621–667.
8. Fainboim L, Geffner J. *Introducción a la Inmunología humana*. 6° ed. Editorial Médica Panamericana 2011
9. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;**392**:245–252.
10. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;**18**:767–811.
11. Risoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999;**283**:1183–1186.
12. Sabatté J, Maggini J, Nahmod K, Amaral MM, Martínez D, Salamone G et al. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;**18**:5–17.
13. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003;**21**:685–711.
14. Adorini L, Penna G. Induction of tolerogenic dendritic cells by vitamin D receptor agonists. *Handb Exp Pharmacol* 2009;**251**:251–273.

15. Steinman RM, Idoyaga J. Features of the dendritic cell lineage. *Immunol Rev* 2010;**234**:5–17.
16. Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu M-H, Sastre-Garau X, Soumelis V, Amigorena S. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med* 2012;**209**:653–660.
17. Ziegler-heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Derek N et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. 2014;**116**:5–7.
18. León B, López-Bravo M, Ardavín C. Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol* 2005;**17**:313–318.
19. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010;**327**:291–295.
20. Segura E, Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol* 2013;**34**:440–445.
21. Boltjes A, van Wijk F. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Front Immunol* 2014;**5**:1–13.
22. Nizzoli G, Krietsch J, Weick A, Steinfeld S, Facciotti F, Gruarin P et al. Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* 2013;**122**:932–942.
23. Lambrecht BN, Hammad H. Lung Dendritic Cells in Respiratory Viral Infection and Asthma: From Protection to Immunopathology. *Annu Rev Immunol* 2012;**30**:243–270.
24. Hammad H, Lambrecht BN. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006;**118**:331–336.
25. Hammad H, Plantinga M, Deswarte K, Pouliot P, Willart M a M, Kool M et al. Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med* 2010;**207**:2097–2111.
26. León B, Ardavín C. Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Nat Immunol cell Biol* 2008;**86**:320–324.
27. Hessel C, Moser M. Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol* 2012;**42**:2535–2543.
28. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007;**7**:19–30.

29. Varol C, Landsman L, Fogg DK, Greenshtein L, Gildor B, Margalit R et al. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* 2007;**204**:171–180.
30. Jakubzick C, Tacke F, Ginhoux F, Wagers AJ, van Rooijen N, Mack M et al. Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103+ and CD103-pulmonary dendritic cell populations. *J Immunol* 2008;**180**:3019–3027.
31. Steinman RM. Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. *Annu Rev Immunol* 2012;**30**:1–22.
32. Robbins CS, Swirski FK. The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2010;**67**:2685–2693.
33. Panek CA, Ramos MV, Mejias MP, Abrey-Recalde MJ, Fernandez-Brando RJ, Gori MS et al. Differential expression of the fractalkine chemokine receptor (CX3CR1) in human monocytes during differentiation. *Cell Mol Immunol* 2015;**12**:669–680.
34. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;**179**:1109–1118.
35. Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller W a. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 1999;**11**:753–761.
36. Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 2007;**26**:519–531.
37. Kupiec-Weglinski JW, Austyn JM, Morris PJ. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Traffic from the blood, and T cell-dependent and -independent entry to lymphoid tissues. *J Exp Med* 1988;**167**:632–645.
38. Teijeira A, Russo E, Halin C. Taking the lymphatic route: dendritic cell migration to draining lymph nodes. *Semin Immunopathol* 2014;**36**:261–274.
39. Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS* 2003;**111**:675–697.
40. Gori S, Alcain JM, Salamone G, Vermeulen M. Inflammatory Mediators and Neuromodulators: Targeting in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. In: Atta-ur-Rahman, editor. *Frontiers in Clinical Drug Research – Anti Allergy Agents*. Bentham Science Publishers 2016: 2: 3–44.
41. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med* 2012;**18**:684–692.

42. Lambrecht BN, Hammad H. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol* 2003;**3**:994–1003.
43. Mitchell PD, O’Byrne PM. Biologics and the lung: TSLP and other epithelial cell-derived cytokines in asthma. *Pharmacol Ther* Published Online First: 2016. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.06.009
44. Liu Y-J. TSLP in epithelial cell and dendritic cell cross talk. *Adv Immunol* 2009;**101**:1–25.
45. Ying S, O’Connor B, Ratoff J, Meng Q, Mallett K, Cousins D et al. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol* 2005;**174**:8183–8190.
46. Al-Shami A, Spolski R, Kelly J, Keane-Myers A, Leonard WJ. A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J Exp Med* 2005;**202**:829–839.
47. Liu Y-J, Soumelis V, Watanabe N, Ito T, Wang Y-H, Malefyt RDW et al. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu Rev Immunol* 2007;**25**:193–219.
48. Zhou B, Comeau MR, De Smedt T, Liggitt HD, Dahl ME, Lewis DB et al. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol* 2005;**6**:1047–1053.
49. Soumelis V, Reche P a, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002;**3**:673–680.
50. Wessler I, Reinheimer T, Kilbinger H, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Saloga J et al. Increased acetylcholine levels in skin biopsies of patients with atopic dermatitis. *Life Sci* 2003;**72**:2169–2172.
51. Melum GR, Farkas L, Scheel C, Van Dieren B, Gran E, Liu YJ et al. A thymic stromal lymphopoietin-responsive dendritic cell subset mediates allergic responses in the upper airway mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 2013;**134**:613–621.e7.
52. Liu T, Li T-L, Zhao F, Xie C, Liu A-M, Chen X et al. Role of thymic stromal lymphopoietin in the pathogenesis of nasal polyposis. *Am J Med Sci* 2011;**341**:40–47.
53. Ying G, Zhang Y, Tang G, Chen S. Functions of thymic stromal lymphopoietin in non-allergic diseases. *Cell. Immunol.* 2015;**295**:144–149.
54. Ziegler SF, Artis D. Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nat Immunol* 2010;**11**:289–293.

55. Gori MS, Alcain J, Vermeulen M, Salamone G. Papel dual de la linfopoyetina estromal tímica (TSLP): ¿Regulador homeostático o mediador pro-inflamatorio? *Química Viva* 2015;**14**:53–61.
56. Ziegler SF, Liu Y. Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function. *Nat Immunol* 2006;**7**:709–714.
57. Friend SL, Hosier S, Nelson A, Foxworthe D, Williams DE, Farr A. A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM+ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. *Exp Hematol* 1994;**22**:321–328.
58. Sims JE, Williams DE, Morrissey PJ, Garka K, Foxworthe D, Price V et al. Molecular cloning and biological characterization of a novel murine lymphoid growth factor. *J Exp Med* 2000;**192**:671–680.
59. Reche P a, Soumelis V, Gorman DM, Clifford T, Liu Mr, Travis M et al. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol* 2001;**167**:336–343.
60. Pandey a, Ozaki K, Baumann H, Levin SD, Puel a, Farr a G et al. Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. *Nat Immunol* 2000;**1**:59–64.
61. Wu J, Liu F, Zhao J, Wei Y, Lv J, Dong F et al. Thymic stromal lymphopoietin promotes asthmatic airway remodelling in human lung fibroblast cells through STAT3 signalling pathway. *Cell Biochem Funct* 2013;**31**:496–503.
62. Kashyap M, Rochman Y, Spolski R, Samsel L, Leonard WJ. Thymic stromal lymphopoietin is produced by dendritic cells. *J Immunol* 2011;**187**:1207–1211.
63. He R, Geha RS. Thymic stromal lymphopoietin. *Ann N Y Acad Sci* 2010;**1183**:13–24.
64. Chauhan A, Singh M, Agarwal A, Paul N. Correlation of TSLP, IL-33, and CD4 + CD25 + FOXP3 + T regulatory (Treg) in pediatric asthma. *J Asthma* 2015;**52**:868–872.
65. Lin S-C, Huang J-J, Wang J-Y, Chuang H-C, Chiang B-L, Ye Y-L. Upregulated thymic stromal lymphopoietin receptor expression in children with asthma. *Eur J Clin Invest* 2016;**46**:511–519.
66. Nygaard U, Hvid M, Johansen C, Buchner M, Folster-Holst R, Deleuran M et al. TSLP, IL-31, IL-33 and sST2 are new biomarkers in endophenotypic profiling of adult and childhood atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* Published Online First: May 2016. doi:10.1111/jdv.13679
67. Wang WL, Li HY, Zhang MS, Gao PS, He SH, Zheng T et al. Thymic stromal lymphopoietin: A promising therapeutic target for allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;**160**:18–26.

68. Du M, Guo P, Piao H, Wang S, Sun C, Jin L et al. Embryonic Trophoblasts Induce Decidual Regulatory T Cell Differentiation and Maternal–Fetal Tolerance through Thymic Stromal Lymphopoietin Instructing Dendritic Cells. Published Online First: 2014. doi:10.4049/jimmunol.1203425
69. Iliev ID, Spadoni I, Mileti E, Matteoli G, Sonzogni a, Sampietro GM et al. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut* 2009;**58**:1481–1489.
70. Watanabe N, Wang Y-H, Lee HK, Ito T, Wang Y-H, Cao W et al. Hassall’s corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 2005;**436**:1181–1185.
71. Guo PF, Du MR, Wu HX, Lin Y, Jin LP, Li DJ. Thymic stromal lymphopoietin from trophoblasts induces dendritic cell-mediated regulatory TH2 bias in the decidua during early gestation in humans. *Blood* 2010;**116**:2061–2069.
72. Croft M. Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). *Annu Rev Immunol* 2010;**28**:57–78.
73. Wang Y-H, Liu Y-J. Thymic stromal lymphopoietin, OX40-ligand, and interleukin-25 in allergic responses. *Clin Exp Allergy* 2009;**39**:798–806.
74. Ito T, Wang YH, Duramad O, Hori T, Delespesse GJ, Watanabe N et al. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 2005;**202**:1213–1223.
75. Webb GJ, Hirschfield GM, Lane PJJ. OX40, OX40L and Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* Published Online First: 2015. doi:10.1007/s12016-015-8498-3
76. Seshasayee D, Lee WP, Zhou M, Shu J, Suto E, Zhang J et al. In vivo blockade of OX40 ligand inhibits thymic stromal lymphopoietin driven atopic inflammation. *J Clin Invest* 2007;**117**:3868–3878.
77. Kaur D, Brightling C. OX40/OX40 ligand interactions in T-cell regulation and asthma. *Chest* 2012;**141**:494–499.
78. Ziegler SF. Thymic stromal lymphopoietin and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2012;**130**:845–852.
79. Lambrecht BN. Immunologists getting nervous: neuropeptides, dendritic cells and T cell activation. *Respir Res* 2001;**2**:133–138.
80. Steinman L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nat Immunol* 2004;**5**:575–581.
81. Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2006;**6**:318–328.

82. Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996;**17**:64–102.
83. Islas Weinstein L, Revuelta A, Pando RH. Catecholamines and acetylcholine are key regulators of the interaction between microbes and the immune system. *Ann N Y Acad Sci* 2015;**1351**:39–51.
84. Pavlov V a, Tracey KJ. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Biochem Soc Trans* 2006;**34**:1037–1040.
85. Czura CJ, Tracey KJ. Autonomic neural regulation of immunity. *J Intern Med* 2005;**257**:156–166.
86. Borovikova L V, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000;**405**:458–462.
87. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The Sympathetic Nerve—An Integrative Interface between Two Supersystems: The Brain and the Immune System. *Pharmacol Rev* 2000;**52**:595–638.
88. Maestroni GJM. Sympathetic nervous system influence on the innate immune response. *Ann N Y Acad Sci* 2006;**1069**:195–207.
89. Felten DL, Felten SY, Bellinger DL. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: Structure and function. *Immunol Rev* 1987;**100**:225–260.
90. Qiu Y-H, Cheng C, Dai L, Peng Y-P. Effect of endogenous catecholamines in lymphocytes on lymphocyte function. *J Neuroimmunol* 2005;**167**:45–52.
91. Chen Y, Leon-Ponte M, Pingle SC, O’Connell PJ, Ahern GP. T lymphocytes possess the machinery for 5-HT synthesis, storage, degradation and release. *Acta Physiol (Oxf)* 2015;**213**:860–867.
92. Babu DK, Diaz A, Samikkannu T, Rao KVK, Saiyed ZM, Rodriguez JW et al. Upregulation of serotonin transporter by alcohol in human dendritic cells: possible implication in neuroimmune deregulation. *Alcohol Clin Exp Res* 2009;**33**:1731–1738.
93. Takenaka MC, Araujo LP, Maricato JT, Nascimento VM, Guerreschi MG, Rezende RM et al. Norepinephrine Controls Effector T Cell Differentiation through β 2-Adrenergic Receptor-Mediated Inhibition of NF- κ B and AP-1 in Dendritic Cells. *J Immunol* 2016;**196**:637–644.
94. Kenney MJ, Ganta CK. Autonomic nervous system and immune system interactions. *Compr Physiol* 2014;**4**:1177–1200.

95. Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H, Horiguchi K. Reconciling neuronally and nonneuronally derived acetylcholine in the regulation of immune function. *Ann N Y Acad Sci* 2012;**1261**:7–17.
96. Kawashima K, Fujii T. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Life Sci* 2003;**72**:2101–2109.
97. Kawashima K, Yoshikawa K, Fujii YX, Moriwaki Y, Misawa H. Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. *Life Sci* 2007;**80**:2314–2319.
98. Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 2009;**89**:73–120.
99. Gwilt CR, Donnelly LE, Rogers DF. The non-neuronal cholinergic system in the airways: An unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? *Pharmacol Ther* 2007;**115**:208–222.
100. Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *Life Sci* 2012;**91**:1027–1032.
101. Racké K, Juergens UR, Matthiesen S. Control by cholinergic mechanisms. *Eur J Pharmacol* 2006;**533**:57–68.
102. Shah N, Khurana S, Cheng K, Raufman J-P. Muscarinic receptors and ligands in cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;**296**:C221–C232.
103. Shah N, Khurana S, Cheng K, Raufman J. Muscarinic receptors and ligands in cancer. 2009;**21201**. doi:10.1152/ajpcell.00514.2008.
104. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002;**420**:853–859.
105. Andersson U, Tracey KJ. Neural reflexes in inflammation and immunity. *J Exp Med* 2012;**209**:1057–1068.
106. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdes-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* 2011;**334**:98–101.
107. Su X, Matthay MA, Malik AB. Requisite role of the cholinergic alpha7 nicotinic acetylcholine receptor pathway in suppressing Gram-negative sepsis-induced acute lung inflammatory injury. *J Immunol* 2010;**184**:401–410.
108. Papparini D, Gori S, Grasso E, Scordo W, Calo G, Pérez Leirós C et al. Acetylcholine contributes to control the physiological inflammatory response during the peri-implantation period. *Acta Physiol* 2015;;n/a – n/a.

109. Salamone G, Lombardi G, Gori S, Nahmod K, Jancic C, Amaral MM et al. Cholinergic modulation of dendritic cell function. *J Neuroimmunol* 2011;**236**:47–56.
110. Kawashima K, Fujii T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther* 2000;**86**:29–48.
111. Tayebati SK, El-Assouad D, Ricci A, Amenta F. Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. *J Neuroimmunol* 2002;**132**:147–155.
112. Nomura J, Hosoi T, Okuma Y, Nomura Y. The presence and functions of muscarinic receptors in human T cells: the involvement in IL-2 and IL-2 receptor system. *Life Sci* 2003;**72**:2121–2126.
113. Sato KZ, Fujii T, Watanabe Y, Yamada S, Ando T, Kazuko F et al. Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines. *Neurosci Lett* 1999;**266**:17–20.
114. Koarai a., Traves SL, Fenwick PS, Brown SM, Chana KK, Russell REK et al. Expression of muscarinic receptors by human macrophages. *Eur Respir J* 2012;**39**:698–704.
115. Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H, Horiguchi K. Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on $\alpha 7$ nAChRs. *Int Immunopharmacol* Published Online First: 2015. doi:10.1016/j.intimp.2015.04.015
116. De Rosa MJ, Dionisio L, Agriello E, Bouzat C, Esandi MDC. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor modulates lymphocyte activation. *Life Sci* 2009;**85**:444–449.
117. De Rosa MJ, Esandi MDC, Garelli A, Rayes D, Bouzat C. Relationship between $\alpha 7$ nAChR and apoptosis in human lymphocytes. *J Neuroimmunol* 2005;**160**:154–161.
118. Aicher A, Heeschen C, Mohaupt M, Cooke JP, Zeiher AM, Dimmeler S. Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: Potential role for progression of atherosclerotic lesions. *Circulation* 2003;**107**:604–611.
119. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003;**421**:384–388.
120. Van Der Zanden EP, Hilbers FW, Verseijden C, Van Den Wijngaard RM, Skynner M, Lee K et al. Nicotinic acetylcholine receptor expression and susceptibility to cholinergic immunomodulation in human monocytes of smoking individuals. *Neuroimmunomodulation* 2012;**19**:255–265.

121. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res* 2006;**7**:73.
122. Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 1999;**17**:255–281.
123. Busse WW, Lemanske RFJ. Asthma. *N Engl J Med* 2001;**344**:350–362.
124. Loza MJ, Penn RB. Regulation of T cells in airway disease by beta-agonist. *Front Biosci (Schol Ed)* 2010;**2**:969–979.
125. Veres TZ, Rochlitzer S, Braun A. The role of neuro-immune cross-talk in the regulation of inflammation and remodelling in asthma. *Pharmacol Ther* 2009;**122**:203–214.
126. Gosens R, Zaagsma J, Grootte Bromhaar M, Nelemans A, Meurs H. Acetylcholine: A novel regulator of airway smooth muscle remodelling? *Eur J Pharmacol* 2004;**500**:193–201.
127. Kistemaker LEM, Gosens R. Acetylcholine beyond bronchoconstriction: roles in inflammation and remodeling. *Trends Pharmacol Sci* 2014;**36**:164–171.
128. Bos IST, Gosens R, Zuidhof a. B, Schaafsma D, Halayko a. J, Meurs H et al. Inhibition of allergen-induced airway remodelling by tiotropium and budesonide: A comparison. *Eur Respir J* 2007;**30**:653–661.
129. Vacca G, Randerath WJ, Gillissen A. Inhibition of granulocyte migration by tiotropium bromide. *Respir Res* 2011;**12**:24.
130. Belmonte KE. Cholinergic pathways in the lungs and anticholinergic therapy for chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005;**2**:297–304; discussion 311–312.
131. Cao R, Dong X-W, Jiang J-X, Yan X-F, He J-S, Deng Y-M et al. M(3) muscarinic receptor antagonist bencycloquidium bromide attenuates allergic airway inflammation, hyperresponsiveness and remodeling in mice. *Eur J Pharmacol* 2011;**655**:83–90.
132. Grainge CL, Lau LCK, Ward JA, Dulay V, Lahiff G, Wilson S et al. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. *N Engl J Med* 2011;**364**:2006–2015.
133. Meurs H, Oenema T a., Kistemaker LEM, Gosens R. A new perspective on muscarinic receptor antagonism in obstructive airways diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2013;**13**:316–323.
134. Ricci A, Amenta F, Bronzetti E, Mannino F, Mariotta S, Khosrow Tayebati S. Expression of peripheral blood lymphocyte muscarinic cholinergic receptor subtypes in airway hyperresponsiveness. *J Neuroimmunol* 2002;**129**:178–185.

135. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;**111**:450–463; quiz 464.
136. Nahmod KA, Vermeulen ME, Raiden S, Salamone G, Gamberale R, Fernandez-Calotti P et al. Control of dendritic cell differentiation by angiotensin II. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2003;**17**:491–493.
137. Alvarez C, Amaral MM, Langellotti C, Vermeulen M. Leukotriene C₄ prevents the complete maturation of murine dendritic cells and modifies interleukin-12/interleukin-23 balance. *Immunology* 2011;**134**:185–197.
138. Amaral MM, Alvarez C, Langellotti C, Geffner J, Vermeulen M. Histamine-treated dendritic cells improve recruitment of type 2 CD8 T cells in the lungs of allergic mice. *Immunology* 2010;**130**:589–596.
139. Remes Lenicov F, Rodriguez Rodrigues C, Sabatte J, Cabrini M, Jancic C, Ostrowski M et al. Semen promotes the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *J Immunol* 2012;**189**:4777–4786.
140. Bestach Y. *Estudios genéticos y citogenéticos en Aplasia Medular*. 2015.http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5756_Bestach.pdf
141. Hu L-H, Chen F-H, Li Y-R, Wang L. Real-time determination of human telomerase reverse transcriptase mRNA in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004;**10**:3514–3517.
142. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992;**176**:1693–1702.
143. Vermeulen M, Giordano M, Trevani AS, Sedlik C, Gamberale R, Fernández-Calotti P et al. Acidosis improves uptake of antigens and MHC class I-restricted presentation by dendritic cells. *J Immunol* 2004;**172**:3196–3204.
144. Lloyd CM, Gonzalo J a, Coyle a J, Gutierrez-Ramos JC. Mouse models of allergic airway disease. *Adv Immunol* 2001;**77**:263–295.
145. Machida I, Matsuse H, Kondo Y, Kawano T, Saeki S, Tomari S et al. Cysteinyl Leukotrienes Regulate Dendritic Cell Functions in a Murine Model of Asthma. *J Immunol* 2004;**172**:1833–1838.
146. Barnes PJ. Distribution of receptor targets in the lung. *Proc Am Thorac Soc* 2004;**1**:345–351.
147. Pera T, Zuidhof A, Valadas J, Smit M, Schoemaker RG, Gosens R et al. Tiotropium inhibits pulmonary inflammation and remodelling in a guinea pig model of COPD. *Eur Respir J* 2011;**38**:789–796.

148. Gosens R, Bos IST, Zaagsma J, Meurs H. Protective effects of tiotropium bromide in the progression of airway smooth muscle remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;**171**:1096–1102.
149. Ohta S, Oda N, Yokoe T, Tanaka a., Yamamoto Y, Watanabe Y et al. Effect of tiotropium bromide on airway inflammation and remodelling in a mouse model of asthma. *Clin Exp Allergy* 2010;**40**:1266–1275.
150. Liu Y-J. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J Exp Med* 2006;**203**:269–273.
151. Park LS, Martin U, Garka K, Gliniak B, Di Santo JP, Muller W et al. Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *J Exp Med* 2000;**192**:659–670.
152. Yu X, Li H, Ren X. Signaling cascades initiated by TSLP-mediated signals in different cell types. *Cell Immunol* 2012;**279**:174–179.
153. Liezmann C, Klapp B, Peters EMJ. Stress, atopy and allergy: A re-evaluation from a psychoneuroimmunologic perspective. *Dermatoendocrinol* 2011;**3**:37–40.
154. Cavallotti C, Bruzzone P, Tonnarini G, Cavallotti D. Distribution of catecholaminergic neurotransmitters and related receptors in human bronchus-associated lymphoid tissue. *Respiration* 2004;**71**:635–640.
155. Maestroni GJ. Dendritic cell migration controlled by alpha 1b-adrenergic receptors. *J Immunol* 2000;**165**:6743–6747.
156. Maestroni GJM. Short exposure of maturing, bone marrow-derived dendritic cells to norepinephrine: Impact on kinetics of cytokine production and Th development. *J Neuroimmunol* 2002;**129**:106–114.
157. Maestroni GJM, Mazzola P. Langerhans cells α 2-adrenoceptors: Role in migration, cytokine production, Th priming and contact hypersensitivity. *J Neuroimmunol* 2003;**144**:91–99.
158. Goyarts E, Matsui M, Mammone T, Bender AM, Wagner J a., Maes D et al. Norepinephrine modulates human dendritic cell activation by altering cytokine release. *Exp Dermatol* 2008;**17**:188–196.
159. Vermaelen K, Pauwels R. Accurate and simple discrimination of mouse pulmonary dendritic cell and macrophage populations by flow cytometry: Methodology and new insights. *Cytom Part A* 2004;**61**:170–177.
160. Zaynagetdinov R, Sherrill TP, Kendall PL, Segal BH, Weller KP, Tighe RM et al. Identification of myeloid cell subsets in murine lungs using flow cytometry. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;**49**:180–189.

161. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interf Cytokine Res* 2009;**29**:313–326.
162. Besedovsky H, Sorkin E, Keller M, Muller J. Changes in blood hormone levels during the immune response. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975;**150**:466–470.
163. Blalock JE. Harnessing a neural-immune circuit to control inflammation and shock. *J Exp Med* 2002;**195**:F25–F28.
164. Wessler IK, Kirkpatrick CJ. The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther* 2001;**14**:423–434.
165. Liu T, Xie C, Chen X, Zhao F, Liu a-M, Cho D-B et al. Role of muscarinic receptor activation in regulating immune cell activity in nasal mucosa. *Allergy* 2010;**65**:969–977.
166. Murakami-Satsutani N, Ito T, Nakanishi T, Inagaki N, Tanaka A, Vien PTX et al. IL-33 promotes the induction and maintenance of Th2 immune responses by enhancing the function of OX40 ligand. *Allergol Int* 2014;**63**:443–455.
167. Prechtel AT, Turza NM, Theodoridis A a, Steinkasserer A. CD83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering RNA leads to a diminished T cell stimulation. *J Immunol* 2007;**178**:5454–5464.
168. Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuyaearts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A et al. CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol* 2007;**37**:686–695.
169. Kruse M, Rosorius O, Krätzer F, Bevec D, Kuhnt C, Steinkasserer a et al. Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. *J Exp Med* 2000;**191**:1581–1590.
170. Moffatt MF, Cookson WO. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet* 1997;**6**:551–554.
171. Padron-Morales J, Sanz C, Davila I, Munoz-Bellido F, Lorente F, Isidoro-Garcia M. Polymorphisms of the IL12B, IL1B, and TNFA genes and susceptibility to asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2013;**23**:487–494.
172. Xu ZP, Song Y, Yang K, Zhou W, Hou LN, Zhu L et al. M3 mAChR-mediated IL-8 expression through PKC/NF-κB signaling pathways. *Inflamm Res* 2014;**63**:463–473.
173. Andersson U, Tracey KJ. Reflex Principles of Immunological Homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2012;**30**:313–335.
174. Vassallo R, Tamada K, Lau JS, Kroening PR, Chen L. Cigarette smoke extract suppresses human dendritic cell function leading to preferential induction of Th-2 priming. *J Immunol* 2005;**175**:2684–2691.

175. Vassallo R, Kroening PR, Parambil J, Kita H. Nicotine and oxidative cigarette smoke constituents induce immune-modulatory and pro-inflammatory dendritic cell responses. *Mol Immunol* 2008;**45**:3321–3329.
176. Nouri-Shirazi M, Tinajero R, Guinet E. Nicotine alters the biological activities of developing mouse bone marrow-derived dendritic cells (DCs). *Immunol Lett* 2007;**109**:155–164.
177. Nouri-Shirazi M, Guinet E. Evidence for the immunosuppressive role of nicotine on human dendritic cell functions. *Immunology* 2003;**109**:365–373.
178. Guinet E, Yoshida K, Nouri-Shirazi M. Nicotinic environment affects the differentiation and functional maturation of monocytes derived dendritic cells (DCs). *Immunol Lett* 2004;**95**:45–55.
179. Demedts IK, Brusselle GG, Vermaelen KY, Pauwels R a. Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;**32**:177–184.
180. Schlitzer A, McGovern N, Ginhoux F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin Cell Dev Biol* 2015;**41**:9–22.
181. Ricci A, Mariotta S, Amenta F, Tayebati SK, Terzano C. Changes in muscarinic cholinergic receptor expression in human peripheral blood lymphocytes in allergic rhinitis patients. *Pulm Pharmacol Ther* 2008;**21**:79–87.
182. Profita M, Riccobono L, Montalbano AM, Bonanno A, Ferraro M, Albano GD et al. In vitro anticholinergic drugs affect CD8+ peripheral blood T-cells apoptosis in COPD. *Immunobiology* 2012;**217**:345–353.
183. Froidure a., Shen C, Gras D, Van Snick J, Chanez P, Pilette C. Myeloid dendritic cells are primed in allergic asthma for thymic stromal lymphopoietin-mediated induction of Th2 and Th9 responses. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2014;**69**:1068–1076.
184. Tashkin DP, Celli B, Senn S, Burkhart D, Kesten S, Menjoge S et al. A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008;**359**:1543–1554.
185. Grando SA. Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1997;**2**:41–48.
186. Nijhuis LE, Olivier BJ, Dhawan S, Hilbers FW, Boon L, Wolkers MC et al. Adrenergic α_2 receptor activation stimulates anti-inflammatory properties of dendritic cells in vitro. *PLoS One* 2014;**9**:2–3.
187. Panina-Bordignon P, Mazzeo D, Lucia PD, D'Ambrosio D, Lang R, Fabbri L et al. Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *J Clin Invest* 1997;**100**:1513–1519.

188. Bai TR, Knight D a. Structural changes in the airways in asthma: observations and consequences. *Clin Sci (Lond)* 2005;**108**:463–477.
189. Blyth DI, Pedrick MS, Savage TJ, Hessel EM, Fattah D. Lung Inflammation and Epithelial Changes in a Murine Model of Atopic Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;**14**:425–438.
190. Foster PS, Hogan SP, Ramsay a J, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 1996;**183**:195–201.
191. Olmez D, Babayigit a., Erbil G, Karaman O, Bagriyanik a., Yilmaz O et al. Histopathologic changes in two mouse models of asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009;**19**:132–138.
192. Ohkawara Y, Lei XF, Stämpfli MR, Marshall JS, Xing Z, Jordana M. Cytokine and Eosinophil Responses in the Lung, Peripheral Blood, and Bone Marrow Compartments in a Murine Model of Allergen-induced Airways Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;**16**:510–520.
193. Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech* 2008;**1**:213–220.
194. Plantinga M, Guilliams M, Vanheerswynghe M, Deswarte K, Branco-madeira F, Toussaint W et al. Article Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen. *Immunity* 2011;**38**:322–335.
195. Robays LJ, Maes T, Lebecque S, Lira S a., Kuziel W a., Brusselle GG et al. Chemokine Receptor CCR2 but Not CCR5 or CCR6 Mediates the Increase in Pulmonary Dendritic Cells during Allergic Airway Inflammation. *J Immunol* 2007;**178**:5305–5311.
196. Kool M, Soullié T, van Nimwegen M, Willart M a M, Muskens F, Jung S et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2008;**205**:869–882.
197. Gonzalo JA, Lloyd CM, Kremer L, Finger E, Martinez-A. C, Siegelman MH et al. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation: The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *J Clin Invest* 1996;**98**:2332–2345.
198. Gonzalo J a, Pan Y, Lloyd CM, Jia GQ, Yu G, Dussault B et al. Mouse monocyte-derived chemokine is involved in airway hyperreactivity and lung inflammation. *J Immunol* 1999;**163**:403–411.
199. Gonzalo J a, Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TN, Proudfoot a et al. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *JExpMed* 1998;**188**:157–167.