

Este trabajo está bajo licencia [CC BY-NC-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)© 2 de Zacca, Estefanía Raquel



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA
CIBICI – CONICET

Trabajo de Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

EFFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Lic. Estefanía Raquel Zacca

Director: Prof. Dr. Víctor Gabriel Morón

Córdoba, Argentina

2014

FINANCIAS QUIMICAS

R-7

579.29

7

12429

aw tor

7/7/2019

7/7/19

Director de tesis:

Prof. Dr. Víctor Gabriel Morón

Comisión evaluadora:

Prof. Dr. German A. Roth

Prof. Dra. Carolina L. Montes

Prof. Dr. Alfredo G. Lorenzo

Evaluador Externo:

Prof. Dr. Martín Rumbo

El presente trabajo de tesis fue desarrollado en el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Fue realizado gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación (FONCyT), Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT), Agencia Córdoba Ciencia y Fundación Florencio Fiorini.

A mi mamá y mi papá,

Cristina y Miguel,

Por ser mis pilares

A la memoria de mis abuelos,

Lidia, Gustavo, Ismael y Raquel,

Por su amor incondicional

A mi amor,

Francisco,

Por confiar en mí

AGRADECIMIENTOS

¡Cuántos años de trabajo, y cuántas personas a las que agradecer!! En este camino conté con la presencia de muchos, que siento tan esenciales, personas que participaron desde lo cotidiano hasta de lo inusual, desde lo científico hasta lo personal. Ha sido un largo camino... esta tesis representa para mí un enriquecimiento en lo profesional y también en lo personal, en la vida. No hubiera sido posible sin ustedes:

En primer lugar, agradecer a quien dirigió esta tesis y me dio la posibilidad de trabajar en el laboratorio, gracias Gabriel por darme esta oportunidad tan enriquecedora. Muchas gracias por tu comprensión en los momentos difíciles. Hemos sido un gran equipo, muy importante para llevar a cabo el trabajo de varios años. Por supuesto este equipo no hubiera sido posible sin Inés, mi gran maestra, compañera y ejemplo de estos años. Gracias por tu ayuda desde el principio hasta hoy. Gracias Ine por transmitirme tus conocimientos con tanta paciencia, una cualidad que valoro muchísimo y realmente estoy orgullosa de que vos hayas sido esa persona. Tu sencillez y simplicidad me han ayudado tanto, hiciste más simple lo complicado, infinitas gracias!

Gracias a Cristina, también por brindarme un lugar en el laboratorio para realizar mi trabajo, gracias Cristina por tus aportes, por tu ayuda, por representarnos y estar atenta a nuestro trabajo cotidiano. Gracias a Belkys, fuiste como una codirectora en mi tesis. Siempre a la par de Gabriel dirigiéndome y aportando tu experiencia. Gracias por enseñarme a hilar más fino en el trabajo, por incitarme a las preguntas y a la discusión de resultados.

A mis compañeras con las que compartí esta tesis desde el comienzo, Fer y Flor. Gracias por haberle aportado siempre a nuestro trabajo diario momentos de risas y distensión, donde pudimos divertirnos y pasar días preciosos juntas. No me es sencillo agradecer a una sin la otra, las dos me transmitieron su dulzura, amabilidad, comprensión y seguridad. Gracias por habernos complementado, por lo aprendido juntas. Gracias por todo el aguante!!!

Y el lab 108 siguió creciendo! y vinieron nuevos aires. Qué momentos interesantes, donde uno se reacomoda y transmite su experiencia. Rachel, mi sister, la otra parte de este equipo, gracias por la gran ayuda y colaboración de este último tiempo. Realmente me puso muy contenta tu llegada al laboratorio. Vos representas para mí, mi experiencia, lo aprendido. Te deseo lo mejor de lo mejor en este camino. Gracias Ana y Sofi por ser parte de este nuevo grupo, y a nuestra compañera más reciente Vicky, les deseo a todas los mejores éxitos.

No quiero olvidarme de mis primeras compañeras, Romi y Caro. Gracias por haberme ayudado en el comienzo, por la responsabilidad de haberme enseñado. Por todo lo compartido.

Gracias a todo al equipo docente de Patología y también al de Anatomía e Histología. Gracias por ser mis compañeras docentes. Gracias Caro Luque, por ser quien me ayudó a dar los primeros pasos, habiéndome transmitido tus conocimientos de la materia y como docente. Admiro tu forma de enseñar, agradezco haber tenido tu ejemplo. Me has hecho reír tanto!!

A todos los integrantes del CIBICI y del Departamento de Bioquímica Clínica. Somos tantos, que no quiero olvidarme de nadie. Agradezco y tengo mucho orgullo de ser o haber sido parte de esta gran institución, de esta universidad, que crece gracias a la participación de tantas personas que creen en la ciencia, en la enseñanza, en la institución pública. Gracias a los investigadores y becarios de los distintos laboratorios que fueron parte de esta tesis. Gracias Ceci Ramello por haberte conocido, por todo lo que me ayudaste, gracias Vani Alamino por haberme acercado a la ciencia, por todos los momentos compartidos ya desde mucho antes que la Inmunología. Gracias Caro Montes, Mariana Maccioni, Nico Nuñez, David Nocera, Ale García, Cecilia Álvarez, Nico Ponce, Fabio Cerbán, Cinthia Stempin. Gracias a Paula Abaddie, Pilar Crespo, Alejandra Romero, Adriana Berreta, Laura Santamaría, Fabricio y Luis Navarro.

Gracias a los miembros de mi comisión de tesis. Carolina montes, Alfredo Lorenzo, German Roth. Han sido una gran ayuda para mí estos años. Me incitaron a las preguntas, a mejorar mi tesis. Gracias por haber leído tan comprometidamente mi trabajo, me ayudaron mucho sus sugerencias, aportes, discusión.

Ahora sí es el momento de la familia y de los afectos. Quiero agradecer en primer lugar a mis padres. Gracias por estar siempre, por acompañarme en la vida. Gracias por su preocupación, por sus esfuerzos y todo el amor que me han dado. Por haber compartido conmigo los triunfos y las derrotas. Gracias al resto de mi familia, mis tíos, primos y sobris, gracias por confiar en mí y estar siempre presentes a pesar de la distancia. Gracias a Fran por el amor que me das, por ser mi compañero y haber emprendido esta vida juntos. Gracias por todo el aguante, por tu ayuda, por poner humor a nuestras vidas. Gracias a mis amigas hermanas que la vida me regaló, Geor, Ale, Maia, Tania. Gracias a mis amigas y colegas tan amadas Vicky, Moni, Nati. Gracias Jime, Nati Lo, Luisi, Juli, Lola, Jor, Tefi, Lala, Pame, Cle. Todas ustedes hacen multiplicar mis alegrías y atenuar mis decepciones.

A todos, infinitas gracias por haber sido parte de esta gran etapa. Gracias Laura Seppi, imposible no agradecerte, han sido tantos años de trabajo juntas!!! Genia, ídola.

A los que no nombré también gracias! de todos recibí una mano y me siento muy agradecida.

Mis arrugas

(Un poema antiguo como mi tiempo
... para todos y para nadie...)

Todo en la vida es transitorio,
Pero sienta bien aquí delante de mí,
Vamos a tener una conversación simple,

...Como quién camina junto hasta el fin,
Mira en mis ojos,
Mírate a mí...

...Qué importan las arrugas
si el alma aún es de querubín?...

(Adilson S. Silva)





ÍNDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	2
LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	5
INTRODUCCIÓN	
1. Sistema inmune: características generales	8
a. Inmunidad innata	8
b. Respuesta adaptativa primaria	9
c. Respuesta adaptativa secundaria y memoria inmunológica	9
2. Sensores del sistema inmune	10
a. Reconocimiento de ácidos nucleicos.....	12
b. TLR7: ligandos	13
c. TLR7: localización y transporte	14
d. TLR7: señalización	15
3. La Célula dendrítica	17
a. Heterogeneidad y localización	17
b. Biología de la DC	20
Captura del antígeno	21
Procesamiento y presentación del antígeno	22
Presentación cruzada de antígenos.....	25
4. Sistema inmune y envejecimiento	28
a. Células madre hematopoyéticas y envejecimiento	29
b. Inmunidad adaptativa y envejecimiento	29
Linfocitos T.....	30

Linfocitos B	31
c. Inmunidad innata y envejecimiento	31
Neutrófilos	32
Células NK y NKT	32
Macrófagos	33
Células dendríticas	34

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis	37
Objetivo general	37
Objetivos específicos	37

RESULTADOS

Capítulo 1: Efecto del envejecimiento sobre la capacidad de las DCs de inducir una respuesta inmune efectora.

1. Modelo experimental de envejecimiento	40
2. Inducción de la respuesta inmune citotóxica <i>in vivo</i>	40
3. Capacidad para activar linfocitos T CD8 ⁺ vírgenes <i>in vitro</i>	42
4. Evaluación del contenido de DCs en ratones jóvenes y viejos	46
5. El envejecimiento afecta la capacidad de las cDC CD8 α ⁺ para activar linfocitos T CD8 ⁺ vírgenes <i>in vitro</i>	48
6. Conclusiones capítulo 1	48

Capítulo 2: La maquinaria de procesamiento antigénico en DCs se altera con el envejecimiento.

1. Determinación de la presentación antigénica en MHC clase I	51
2. Comparación de la capacidad para capturar antígenos	53
3. El envejecimiento afecta la capacidad degradativa de OVA mediada por DCs	56
4. Conclusiones capítulo 2	56

Capítulo 3: El envejecimiento disminuye la activación de DCs frente a ligandos TLR.

1. Maduración DCs <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> frente a polyU/DO	59
2. Estudio de los niveles de ARNm de TLR7	61
3. Señalización TLR7	62
4. Evaluación de la activación por TLR4	64
5. Conclusiones capítulo 3	65
DISCUSIÓN	67
CONCLUSIÓN	75
MATERIALES Y MÉTODOS	
Ratones	78
Medio de cultivo	78
Líneas celulares	78
Antígenos y péptidos	79
Agonistas y antagonistas de TLR	79
Anticuerpos	80
Métodos de ensayo	80
1. Obtención de suspensiones celulares	80
Células de bazo	80
Purificación de DCs (CD11c ⁺) de bazo	80
Purificación de subpoblaciones de DCs de bazo	81
Purificación de linfocitos T CD8 ⁺	81
2. Estimulación de DCs	82
3. Evaluación de la endocitosis de antígenos en DCs	83
4. Evaluación de la presentación cruzada de antígenos en DCs	83
5. Activación de linfocitos T CD8 ⁺ vírgenes	83

6. Citotoxicidad específica a antígeno <i>in vivo</i>	84
Reestimulación de linfocitos T <i>in vitro</i>	85
7. Determinación de citoquinas mediante un ELISA sándwich	85
8. Reacción de transcripción reversa de ARNm y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR)	86
9. Western Blot	87
10. Citometría de Flujo	88
11. Inmunofluorescencia	89
12. Análisis estadístico	90
Soluciones	91
1. Soluciones <i>buffer</i>	91
2. Soluciones utilizadas para contar células	91
3. Soluciones madres utilizadas en citometría de flujo	92
4. Soluciones utilizadas para mediciones de citoquinas por ELISA	92
5. Soluciones utilizadas en SDS-PAGE y Western blot	93
BIBLIOGRAFÍA	95
PUBLICACIONES	111

RESUMEN

El envejecimiento es un proceso complejo que afecta distintas funciones del organismo como la función del sistema inmune. Numerosas evidencias indican que tanto células de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa se encuentran afectadas por el envejecimiento. Las células dendríticas (DCs) son las células presentadoras de antígeno por excelencia y juegan un rol clave como enlace entre la respuesta inmune innata y adaptativa. Sin embargo, no se conoce con claridad cómo el envejecimiento puede afectar la función de las DCs. Es por ello que el propósito de este trabajo de tesis fue estudiar la función de las DCs en ratones viejos, focalizándonos en su habilidad para realizar presentación cruzada de antígenos a linfocitos T CD8⁺. Utilizando ácido poliuridílico (polyU), un análogo sintético de ARNsh, y albúmina de huevo de gallina (OVA) como modelo de antígeno, en este trabajo de tesis se demostró que DCs de ratones viejos tienen una capacidad reducida para realizar presentación cruzada de antígenos a linfocitos T CD8⁺. Se vio que este defecto podría deberse a cambios intrínsecos que sufre la DC con el envejecimiento, ya sea en el mecanismo de procesamiento y presentación antigénica como en la capacidad de las mismas para ser activadas. Cabe destacar, que se observó en los ratones viejos una alteración en el número y en la activación de la subpoblación cDCs CD8 α ⁺, la principal responsable de activar linfocitos T CD8⁺ a través de la presentación cruzada de antígenos.

Los resultados obtenidos, permiten evidenciar el impacto que tiene el envejecimiento en la DC, afectando su función y por lo tanto disminuyendo la activación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes y la generación de una eficiente respuesta citotóxica.

PALABRAS CLAVE

Envejecimiento

Célula dendrítica convencional CD8 α ⁺

Presentación cruzada de antígenos

Respuesta citotóxica

TLR7

ABREVIATURAS

7-AAD: 7-amino-actinomicina D

Ag: Antígeno

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

BMDC: Célula dendrítica derivada de médula ósea (del inglés *Bone marrow derived dendritic cells*)

cDC: Célula dendrítica convencional

CFSE: Carboxifluoresceína succinimidil éster

CLIP: Péptido de cadena invariante asociado a clase II (del inglés *Class II-associated li peptide*)

CLRs: Lectinas de tipo C (del inglés *C-type lectin receptors*)

CPA: Célula presentadora de antígenos

CpG-ODN: Oligodeoxinucleótidos sintéticos que contienen motivos CpG no metilados

CPRG: Clorofenol rojo- β -D-galactopiranosido

CTL: Linfocito T citotóxico (del inglés *Cytotoxic T lymphocyte*)

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño (del inglés, *Damage-associated molecular patterns*)

DC: Célula dendrítica (del inglés *Dendritic cells*)

dh: doble hebra

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Enzimoimmunoensayo en fase sólida (del inglés *Enzyme linked immunosorbent assay*)

FACS: Separación de células por fluorescencia (del inglés *Fluorescence-activated cell sorting*)

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (del inglés *Fluorescein isothiocyanate*)

Flt3L: Ligando de tirosin-quinasa 3 tipo Fms (del inglés *Fms-like tyrosine kinase 3 ligand*)

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄: Complejo de moléculas MHC clase I unidas al fragmento de la proteína ovoalbúmina

HBSS: Solución salina balanceada de Hanks (del inglés *Hank's balanced salt solution*)

HSCs: Células madre hematopoyéticas (del inglés *Haematopoietic stem cells*)

IFN: Interferón

I κ B: inhibidor de κ B

IL: Interleuquina

IMF: Intensidad media de fluorescencia

IRF: Factor regulador de interferón (del inglés *Interferon regulatory factor*)

Ii: Cadena invariante

LPS: Lipopolisacárido

LRRs: Múltiples repeticiones ricas en leucina (del inglés *Leucine-rich repeats*)

MACS: Separación de células utilizando perlas magnéticas (del inglés *Magnetic-activated cell sorting*)

MAPK: Quinasas activadas por mitógenos (del inglés *Mitogen-activated protein kinase*)

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés *Major histocompatibility complex*)

MyD88: Gen de respuesta primaria de diferenciación mielóide 88 (del inglés *Myeloid differentiation primary response gene 88*)

NFAT: Factor nuclear de células T activadas (del inglés *Nuclear factor of activated T cells*)

NK: Células asesinas naturales (del inglés *Natural Killer cells*)

NKT: Células T asesinas naturales (del inglés *Natural Killer T cells*)

NF- κ B: Factor nuclear κ B (del inglés *Nuclear factor κ B*)

NLR: Receptor tipo NOD (del inglés *Nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptor*)

OVA: Albúmina de huevo de gallina (del inglés *Ovalbumin*)

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés *Pathogen-associated molecular patterns*)

PBS: Solución tampón de fosfatos (del inglés *Phosphate balanced solution*)

pDC: Célula dendrítica plasmacitoide

polyU/DO: Ácido poliuridílico estabilizado con DOTAP

PRR: Receptor de reconocimiento de patrones (del inglés *Pattern-recognition receptor*)

RIG-1: Gen I inducible por ácido retinoico (del inglés *Retinoic acid-inducible gene 1*)

RLR: Receptor tipo RIG-I (del inglés *RIG-I like receptor*)

ROS: Especies reactivas del oxígeno (del inglés *Reactive oxygen species*)

SDS: Duodecil Sulfato de Sodio

SEM: Error estándar de la media (del inglés *Standard error of the mean*)

SFB: Suero fetal bovino

sh: simple hebra

TAP: Transportador asociado al procesamiento de antígenos (del inglés *Transporter associated with antigen processing*)

TCR: Receptor de la célula T (del inglés *T cell receptor*)

TIR: Dominio Toll/ receptor de IL-1

TGF: Factor de Crecimiento Tumoral (del inglés *Tumoral Growth Factor*)

TLR: Receptor tipo Toll (del inglés *Toll-like receptor*)

TNF: Factor de necrosis tumoral (del inglés *Tumor necrosis factor*)

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1. Vías de señalización de TLRs intracelular.....	16
FIGURA 2. Población de DCs en ratón: localización y recambio en condiciones normales.....	19
FIGURA 3. Proceso de maduración de la DC.....	21
FIGURA 4. Diferentes vías de presentación antigénica.....	23
FIGURA 5. Ensayo de citotoxicidad <i>in vivo</i>	41
FIGURA 6. Efecto del envejecimiento en la inducción de una respuesta citotóxica.....	43
FIGURA 7. DCs de ratones viejos son poco eficientes en activar linfocitos T CD8 ⁺ vírgenes <i>in vitro</i>	45
FIGURA 8. Contenido de DCs en ratones viejos.....	47
FIGURA 9. cDCs CD8 α ⁺ de ratones viejos inducen menor activación de linfocitos T CD8 ⁺ vírgenes <i>in vitro</i>	49
FIGURA 10. La presentación de OVA en MHC clase I se encuentra afectada en DCs de ratones viejos.....	52
FIGURA 11. El envejecimiento no afecta la capacidad de DCs para endocitar antígenos <i>in vitro</i>	54
FIGURA 12. Expresión de receptores involucrados en la captura de antígenos.....	55
FIGURA 13. Ensayo de captura <i>in vivo</i>	55
FIGURA 14. Menor degradación de OVA por DCs durante el envejecimiento.....	57
FIGURA 15. Menor activación de DCs de ratones viejos <i>in vivo</i>	60
FIGURA 16. Menor activación de DCs de ratones viejos <i>in vitro</i>	61
FIGURA 17. Menor nivel de ARNm de TLR7 en DCs de ratones viejos.....	62
FIGURA 18. La cinética de fosforilación de I κ B- α es diferente en DCs de ratones jóvenes y viejos.....	63
FIGURA 19. Activación basal de NF- κ B en DCs de ratones viejos.....	64
FIGURA 20. La maduración de DCs con LPS también se encuentra afectada con el envejecimiento.....	65
FIGURA 21. Cambios funcionales con la edad en DCs.....	73
FIGURA 22. Doble purificación de DCs a partir del bazo de un ratón normal.....	81
FIGURA 23. Purificación de linfocitos T CD8 ⁺ a partir del bazo de un ratón OT-I.....	82
FIGURA 24. Ensayo de citotoxicidad específica a antígeno <i>in vivo</i>	85

LISTADO DE TABLAS

TABLA 1. PRRs y sus ligandos	11
TABLA 2. Contenido de subpoblaciones de DCs en bazo de ratones jóvenes y viejos.....	46
TABLA 3. Anticuerpos empleados en ELISA de citoquinas.....	86
TABLA 4. Anticuerpos empleados en Western Blot.....	88
TABLA 5. Anticuerpos empleados en citometría de flujo	89

INTRODUCCIÓN

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. SISTEMA INMUNE: CARACTERÍSTICAS GENERALES

El sistema inmune constituye un notable mecanismo de defensa, que permite una respuesta protectora rápida y específica contra la gran cantidad de microorganismos potencialmente patógenos que habitan el mundo en que vivimos. También tiene un rol fundamental en la defensa contra tumores.

La tarea del sistema inmune es extremadamente compleja y las amenazas deben ser detectadas con absoluta especificidad distinguiendo los agentes patógenos de las células y tejidos sanos del organismo. Cuando el sistema inmune no funciona correctamente puede dar lugar a una serie de enfermedades, ya sea inmunodeficiencias, reacciones de hipersensibilidad o enfermedades autoinmunes como son Diabetes Mellitus tipo 1, Esclerosis Múltiple, Artritis Reumatoidea, Lupus Eritematoso Sistémico, entre otras.

a. INMUNIDAD INNATA

La mayoría de los microorganismos patógenos que infectan a un individuo, se encuentran primero con una poderosa defensa no específica. El epitelio provee una barrera física contra la entrada de microbios y también produce una variedad de factores antimicrobianos. Los microbios que penetran el epitelio se enfrentan además con macrófagos y otras células relacionadas, las cuales poseen “sensores microbianos” que reconocen moléculas características de muchos agentes patógenos. Estos sensores se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés *Pattern recognition receptors*) e incluyen varias familias de moléculas, que se encuentran codificadas en la línea germinal. Los más extensamente estudiados son los receptores tipo toll (TLRs, del inglés *Toll-like receptors*) y los receptores tipo nod (NLRs, del inglés *NOD-like receptors: the nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors*). Cuando un TLR interactúa con su ligando induce una serie de eventos de señalización intracelular, de los cuales la activación del sistema del factor nuclear κB (NF- κB , del inglés *Nuclear factor κB*) es particularmente importante. La activación de los macrófagos incrementa su actividad fagocítica y la inducción de sistemas antimicrobianos que ayudan a destruir el agente patógeno. La inducción de una respuesta inflamatoria como resultado de la activación del sistema inmune innato, recluta otros tipos celulares al sitio, incluyendo neutrófilos. De esta manera, el sistema inmune innato puede proveer un medio efectivo para controlar o eliminar patógenos.

El sistema inmune innato también actúa reclutando respuestas inmunes antígeno (Ag)-específicas, no solamente atrayendo células del sistema inmune al sitio de infección, sino también a través de la captura de Ags por células dendríticas (DCs, del inglés *Dendritic cells*) y su transporte a través de estas células hacia tejidos linfoides donde se inicia la respuesta inmune primaria. Las DCs activadas expresan moléculas coestimuladoras en su superficie y producen citoquinas que pueden regular la calidad de la respuesta inmune y combatir de manera más eficiente los distintos agentes patógenos, ya sean bacterias, virus o parásitos.

b. RESPUESTA ADAPTATIVA PRIMARIA

La respuesta primaria se inicia cuando una sustancia antigénica extraña interactúa con linfocitos vírgenes específicos para el Ag bajo circunstancias apropiadas. La respuesta consiste en la expansión y diferenciación de linfocitos T colaboradores y efectores, y en la producción de moléculas de anticuerpo específicas para el inmunógeno. La primera incluye células productoras de citoquinas y células T citotóxicas, capaces de lisar células infectadas. Generalmente, la combinación de la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa primaria, son suficientes para erradicar o controlar los patógenos. En efecto, la función más efectiva del sistema inmunológico es la de montar una respuesta que elimine el agente infeccioso del cuerpo, lo que se denomina inmunidad esterilizante.

c. RESPUESTA ADAPTATIVA SECUNDARIA Y MEMORIA INMUNOLÓGICA

Como consecuencia del encuentro inicial con el microorganismo, el individuo inmunizado puede desarrollar un estado de memoria inmunológica. Si el individuo se infecta nuevamente con el mismo microorganismo (o uno íntimamente relacionado), se produce una respuesta secundaria. Esto generalmente consiste en una respuesta de anticuerpos más rápida, de mayor magnitud, y compuesta por anticuerpos que unen los Ags con mayor afinidad por lo tanto son más efectivos en eliminar el microorganismo del cuerpo. También, sobreviene una respuesta T celular más rápida y efectiva. Entonces, la infección inicial con un microorganismo, a menudo inicia un estado de inmunidad en el que el individuo está protegido contra una segunda infección. En la mayoría de las situaciones, la protección la proveen las moléculas de anticuerpo de alta afinidad que rápidamente eliminan el microorganismo re introducido. Esta es la base de la mayoría de las vacunas licenciadas actualmente.

2. SENSORES DEL SISTEMA INMUNE

Los sensores microbianos del sistema inmune innato son los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) codificados en la línea germinal que detectan patrones moleculares relativamente conservados en la mayoría de los microorganismos de una especie determinada (1). Estas estructuras se denominan Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *Pathogen-associated molecular patterns*). En principio esta estrategia permite que un grupo finito de receptores reconozca una enorme diversidad de patógenos potenciales. La mayoría de los PAMPs reconocidos por PRRs son comunes a una amplia clase de microbios patógenos, y son moléculas que no se encuentran en el huésped. Sin embargo, una clara excepción a esta generalización es el reconocimiento de ácidos nucleicos. Debido a que estas macromoléculas son comunes tanto para el huésped como para el posible patógeno, sus receptores tienen el potencial de responder a ligandos propios con el riesgo que eso implica. Por otro lado, la evidencia reciente indica que los PRRs son también responsables del reconocimiento de moléculas endógenas liberadas por células dañadas, lo que se conoce como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, del inglés *Damage-associated molecular patterns*) (2).

Los patógenos microbianos son reconocidos a través de múltiples PRRs específicos (Tabla 1) que pueden ser clasificados por su ubicación en receptores secretados, transmembrana o citosólicos (3). Los PRRs secretados, por ejemplo colectinas, ficolinas y pentraxinas, se unen a la superficie celular microbiana, activan las vías clásica y de lectinas del sistema del complemento y opsonizan los patógenos para que sean fagocitados por macrófagos y neutrófilos (3). Los PRRs de transmembrana incluyen la familia de receptores tipo Toll (TLRs) y las lectinas de tipo C (CLRs, del inglés *C-type lectin receptors*). Los TLRs son una familia de receptores transmembrana tipo 1 que contienen un dominio extracelular con múltiples repeticiones ricas en leucina (LRRs, del inglés *leucine-rich repeats*) unidas mediante una región transmembrana a un dominio conservado de señalización llamado receptor Toll/IL-1 (TIR) (4). Son expresados en la membrana plasmática o en la membrana de organelas endosomales/lisosomales y su expresión depende del tipo celular. Los TLRs ubicados en la superficie celular reconocen patrones microbianos conservados que son accesibles a la misma, mientras que los TLRs endosomales principalmente detectan ácidos nucleicos microbianos. Por último, los PRRs citosólicos incluyen los receptores tipo gen I inducible por ácido retinoico (RLRs, del inglés *Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) like receptors*) y receptores que contienen un dominio de unión a nucleótidos y repeticiones de leucinas (NLRs).

TABLA 1. PRRs y sus ligandos (2).

PRR	Ubicación	Ligando	Origen del ligando
TLRs			
TLR1	Membrana plasmática	Triacil lipoproteína	Bacterias
TLR2	Membrana plasmática	Lipoproteína	Bacterias, virus, parásitos, endógeno
TLR3	Endolisosoma	ARNdh	Virus
TLR4	Membrana plasmática	LPS	Bacterias, virus, endógeno
TLR5	Membrana plasmática	Flagelina	Bacterias
TLR6	Membrana plasmática	Diacil lipoproteína	Bacterias, virus
TLR7/8	Endolisosoma	ARNsh	Virus, bacterias, endógeno
TLR9	Endolisosoma	CpG-ADN	Virus, bacterias, protozoos, endógeno
TLR10	Endolisosoma	Desconocido	Desconocido
TLR11	Membrana plasmática	Moléculas similares a profilina	Protozoos
RLRs			
RIG-I	Citoplasma	ARNdh cortos	Virus
MDA5	Citoplasma	ARNdh largos	Virus
LGP2	Citoplasma	Desconocido	Virus
NLRs			
NOD1	Citoplasma	Ácido g-D-glutamil-meso diaminopimélico	Bacterias
NOD2	Citoplasma	Dipéptido muramilo	Bacterias
CLRs			
Dectin-1	Membrana plasmática	β -glucanos	Hongos
Dectin-2	Membrana plasmática	β -glucanos	Hongos
MINCLE	Membrana plasmática	Proteína asociada a espliceosoma 130	Endógeno, hongos

Los RLRs detectan virus y a diferencia de los TLRs endosomales son expresados por la mayoría de las células del organismo. NLRs representan una gran familia de más de 20 sensores intracelulares que pueden detectar no sólo patógenos sino también señales de estrés. Por ejemplo detectan la degradación de productos de peptidoglicanos, productos microbiales y partículas cristalinas no infecciosas (5).

La gran mayoría de los PRRs son capaces de inducir una respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T o B mediante la activación de factores de transcripción NF- κ B, factor regulador de interferón (IRF, del inglés *interferon regulatory factor*) o factor nuclear de células T activadas (NFAT, del inglés *nuclear factor of activated T cells*). Sin embargo aquellos PRRs que son secretados y algunos transmembrana que son endocitados (por ejemplo el receptor de manosa y receptor basurero) no son capaces de inducir una respuesta inmune adaptativa por sí solos (6).

a. RECONOCIMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Algunos PRRs transmembrana como otros citosólicos están involucrados en el reconocimiento de ácidos nucleicos. Mientras varios miembros de la familia de TLRs monitorean el contenido de compartimentos endolisosomales, otros PRRs citosólicos detectan ácidos nucleicos en el citoplasma. En conjunto estos receptores pueden reconocer múltiples formas de ácidos nucleicos: ARN y ADN, simple hebra (sh) o doble hebra (dh). En algunos de estos casos, todavía no están totalmente definidas las características moleculares precisas de los ligandos. Conceptualmente, estos dos grupos de receptores son a menudo vistos como sistemas paralelos que sólo difieren en su localización, sin embargo ahora hay evidencia considerable de que la expresión, la señalización y la regulación de los dos grupos son muy diferentes (7).

Cuatro miembros de la familia de TLRs han sido implicados en el reconocimiento de ácidos nucleicos: TLR3, 7, 8 y 9 (Tabla1). Mientras que TLR7, 8 y 9 reconocen ácidos nucleicos con un cierto grado de selectividad en la secuencia, la detección de ARNd_h por TLR3 es independiente de la secuencia utilizada (7). Como ya se ha mencionado, estos receptores se localizan en endosomas y lisosomas donde monitorean el lumen de dichos compartimentos. Esta localización parece ser un punto clave en la regulación de la discriminación entre los ligandos del huésped o ajenos ya que en condiciones normales el ADN propio no llega a estas organelas. Estos receptores se expresan en varias células inmunológicamente relevantes como DCs, macrófagos y linfocitos B. En el caso de las DCs, se observa una expresión diferencial de estos TLRs entre las diferentes subpoblaciones, las DCs convencionales (cDCs) y las DCs plasmacitoideas (pDCs), ver más adelante. La unión del TLR con su ligando lleva a la

producción de citoquinas, efectores antimicrobianos, aumento en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y coestimuladoras. Una respuesta característica de reconocimiento de ácidos nucleicos es la producción de interferones (IFNs) tipo I, que activan el sistema inmune innato modulando de esta manera la respuesta inmune adaptativa.

Los PRRs citosólicos son más variados en su composición así como en su señalización. Además se expresan en una mayor variedad de células que los TLRs. Los RLRs reconocen ARN, y una familia de receptores análogos, aún sin identificar, responden a ADN citosólico (7). Ambas familias de receptores activan al factor de transcripción IRF3 y potencialmente inducen la producción de IFNs tipo I en todos los tipos celulares. Además el ADN citosólico activa un complejo multiproteico llamado inflamasoma, integrado por NLRs.

Uno de los grandes desafíos para los investigadores en el estudio individual de los receptores implicados en el reconocimiento de un ácido nucleico, es el hecho de que cualquier agente patógeno probablemente sea reconocido por múltiples receptores. A pesar del solapamiento en el reconocimiento de ciertos ligandos por TLR y PRRs citosólicos, es importante reconocer que algunos aspectos de estas familias de receptores son conceptualmente muy distintos. Por ejemplo, el reconocimiento mediado por TLR no requiere la infección de la célula, lo que permite a una célula del sistema inmune responder a patógenos en ausencia de las modificaciones que a menudo se producen en células infectadas. Por el contrario, PRRs citosólicos detectan los ácidos nucleicos que llegan al citoplasma lo que normalmente indica que la célula ha sido infectada (7). En concordancia con la diferencial expresión encontrada de PRRs citosólicos y TLRs intracelulares, se ha observado en muchos casos que DCs no infectadas pueden presentar Ags derivados de células infectadas (8). Es por eso que muchos investigadores postulan que una célula no inmune infectada, puede reconocer los ácidos nucleicos dentro del citoplasma a través de RLRs, llevando a la secreción de IFNs tipo I y otros factores que activan a DCs. La célula infectada muere y es fagocitada por DCs, que en un contexto inflamatorio, se activa a través del reconocimiento de los ácidos nucleicos por TLRs intracelulares (3).

En conjunto, estos dos grupos de receptores facilitan el reconocimiento de los ácidos nucleicos derivados de agentes patógenos en los múltiples contextos asociados con la infección.

b. TLR7: LIGANDOS

Originalmente el TLR7 fue identificado como receptor de derivados de imidazoquinolinas como imiquimod y resiquimod (R-848) y de análogos de guanina como loxoribina; actualmente se reconoce al ARNsh como su ligando fisiológico (9-12). El ARNsh puede ser derivado de virus cuyo genoma está formado por ARN como el virus de la estomatitis vesicular, virus de influenza A y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (13). En particular, TLR7 reconoce ARNsh ricos en guanosina y uridina, y cadenas sintéticas de poliuridinas. Por último, TLR7 puede reconocer algunos ARN de interferencia (14). En humanos comparte su especificidad por ARNsh ricos en guanosinas (G) y uridinas (U), y por imidazoquinolinas con el receptor TLR8. Sin embargo todavía no está claro si el gen *tlr8* codifica a un receptor funcional en ratones.

c. TLR7: LOCALIZACIÓN Y TRANSPORTE

Utilizando inmunofluorescencia varios grupos de investigación pudieron demostrar que en células no estimuladas, el TLR7 y el TLR9, se encuentran en el retículo endoplásmico y no en endosomas o lisosomas como se esperaba. Sin embargo la activación sólo ocurre dentro de endolisosomas con pH ácido, ya que la respuesta es claramente inhibida con la utilización de drogas como cloroquina, bafilomicina A1 o cloruro de amonio (15).

Ahora se conoce que TLR7 se encuentra en el retículo endoplásmico y luego del ingreso del ligando a la célula, es movilizado rápidamente hacia endolisosomas (16). Este desplazamiento está regulado por UNC93B1, una proteína transmembrana residente del retículo endoplásmico. UNC93B1 se une específicamente a las regiones transmembrana de TLR3, 7 y 9 en el retículo endoplásmico, y favorece su movilización desde el retículo hacia los endolisosomas (16), requisito indispensable para la inducción de una respuesta inmune (17). TLR7 y TLR9 compiten por la asociación con UNC93B1, mientras que TLR3 parece no estar afectado (18). El tráfico de TLR también está regulado por otras dos proteínas que residen en el retículo endoplásmico: PRAT4A y gp96 (15).

Como ya se ha mencionado, la maduración de los endosomas es requerida para la activación de TLR intracelulares por sus respectivos ligandos. Esta maduración podría en algunos casos facilitar la destrucción de microbios para la posterior liberación de los ligandos contenidos, pero también podría contribuir a un procesamiento de los TLRs. Por ejemplo, una vez que TLR9 ha alcanzado un endolisosoma su ectodominio es cortado por proteasas (19, 20). Aunque se han reportado cortes similares en TLR7 (18-21), todavía no hay evidencias concluyentes.

d. TLR7: SEÑALIZACIÓN

Cada TLR individual desencadena una respuesta biológica específica. Estas diferencias son explicadas gracias al descubrimiento de las moléculas adaptadoras que se unen al dominio TIR de un TLR. MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM son moléculas adaptadoras que son reclutadas por los diferentes TLRs activando diferentes vías de señalización. Por ejemplo, MyD88 (del inglés *Myeloid differentiation primary response gene 88*) es utilizada por todos los TLRs a excepción de TLR3, activa el factor de transcripción NF- κ B y las MAPKs (del inglés *Mitogen-activated protein kinases*) llevando a la inducción de citoquinas inflamatorias.

Después de la unión del ARNsh en la región LRRs sobre TLR7 (Figura 1), se produce una modificación conformacional del receptor lo que lleva a la unión de MyD88 hacia el dominio TIR en la porción citoplasmática del TLR. Luego, MyD88 interactúa con IRAK (del inglés *IL-1 receptor associated kinase*) 4, quien fosforila a su vez a IRAK 1 y 2. Luego estas moléculas ya fosforiladas activan TRAF 6 (del inglés *TNF receptor-associated factor 6*), una ubiquitina ligasa E3. TRAF6 se une a TAK1 (del inglés *TGF- β activated kinase 1*) quien se asocia a dos proteínas adaptadoras: TAB1 (del inglés *TAK1-binding proteins*) y TAB2. Esta última sirve como receptor de las cadenas de poliubiquitinas entre TRAF6 y NEMO (del inglés *NF- κ B essential modulator*). Finalmente TAK1 fosforila IKK β y activa la cascada de MAPKs comenzando con MAPKK3 y 6 lo que lleva a la fosforilación de JNKs, p38 y CREB. IKK fosforila I κ Bs (inhibidor de κ B) lo que induce su degradación con la resultante translocación de NF- κ B al núcleo celular (15). La familia de factores de transcripción IRF también es activada. IRF1 se asocia directamente con MyD88 (22) e IRF5 con MyD88 y TRAF6 (23). En última instancia, la activación de los factores de transcripción IRFs, NF- κ B y AP-1 (del inglés *activating protein-1*), induce la transcripción de genes de citoquinas inflamatorias, como TNF e IL-12 (15, 22, 23).

La cascada de señalización descrita en el párrafo anterior tiene lugar en macrófagos, cDCs, linfocitos B y pDCs, y lleva a la producción de citoquinas inflamatorias como IL-6, IL-12 y TNF- α pero no induce IFNs tipo 1. Las pDCs son únicas en su habilidad de inducir la producción de grandes cantidades de IFNs tipo 1 luego de la activación de TLR7 y 9. Es por eso que es importante destacar que en pDCs existe una vía de señalización adicional (Figura 1). La activación de TLR7 y de TLR9 lleva al reclutamiento de MyD88 e IRAK4, que luego interactúan con TRAF6, TRAF3, IRAK1, IKK α , osteopontina e IRF7 (24, 25). Finalmente IRAK1 e IKK α fosforilan a IRF7 lo que induce su translocación al núcleo induciendo la producción de grandes cantidades de IFNs tipo 1 (26). Al presente no está claro si ambas vías de señalización en las pDCs ocurren de manera simultánea o secuencial (15).

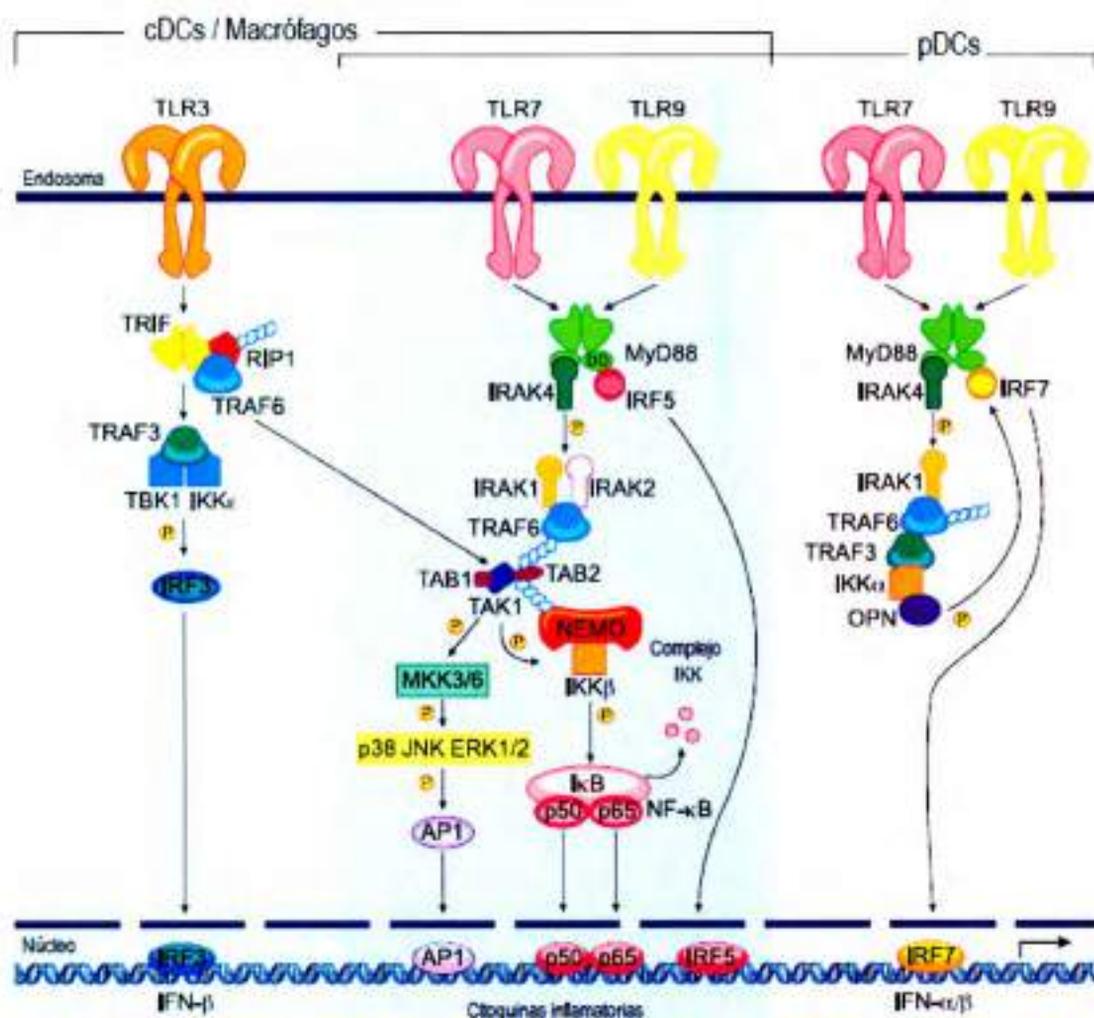


FIGURA 1. Vías de señalización de TLRs intracelular. La activación de TLR3, 7 o 9 inicia cascadas de señalización distintas y superpuestas en DCs convencionales (cDCs), macrófagos y pDCs. En cDCs y macrófagos, la señalización de TLR3 (izquierda) induce IFN-β a través de TRIF, TRAF6 y RIP1, un complejo que se asocia con TRAF3 para activar TBK1 e IKKε, que a su vez, fosforilan IRF3. TRAF6 y RIP1 activan NF-κB y MAPKs para inducir citoquinas inflamatorias (no representado). pDCs utilizan una vía diferente para inducir grandes cantidades de IFNs tipo I (derecha). La activación de TLR7 o TLR9 recluta MyD88 e IRAK4, que a su vez interactúan con TRAF6, TRAF3, IRAK1, IKKα, osteopontina (OPN) e IRF7. IRAK1 e IKKα fosforilan y activan IRF7, dando lugar a la transcripción de genes inducibles por IFN y la producción de IFNs tipo I. [Modificado de Blasius y colaboradores, 2010 (15)].

3. LA CÉLULA DENDRÍTICA

En 1868, Paul Langerhans describió por primera vez a las DCs, asumiendo que eran células nerviosas de la piel, pero el papel de las DCs como células presentadoras de Ags (CPAs) no fue apreciado hasta 1973, después de más de 100 años, cuando R. Steinman y Z. Cohn identificaron en el bazo de ratones DCs capaces de estimular una respuesta inmune primaria (27). Actualmente, las DCs constituyen un sistema integrado de células presentadoras que controlan tanto la inmunidad como la tolerancia inmunológica.

Las DCs se generan a partir de precursores de médula ósea y tienen la capacidad tanto de iniciar como de modular las repuestas inmunes dependiendo de las señales recibidas por parte de los microorganismos como del microambiente y ambiente celular que las rodea (27, 28). Debido a su morfología particular, gracias a la presencia de unas largas prolongaciones citoplasmáticas, poseen una gran capacidad de movimiento así como también la capacidad de interactuar con los efectores tanto de la respuesta inmune innata: células NK y NKT (29), como también con las células de la respuesta inmune adaptativa: linfocitos T y linfocitos B (30, 31).

Las DCs, junto a macrófagos y linfocitos B, son CPAs. Las DCs son las CPAs más poderosas, ya que son capaces de activar linfocitos T vírgenes e inducir una respuesta inmune adaptativa, incluida la respuesta citotóxica. Ello es debido a una combinación de diversas propiedades: capacidad de tomar Ags, de procesarlos en una forma adecuada y de presentarlos asociados a MHC clase I o MHC clase II, junto con la expresión de moléculas coestimuladoras y la capacidad de secretar citoquinas.

Distintas citoquinas están implicadas en el desarrollo de las DCs *in vivo*. Entre otras, la citoquina ligando de tirosin-quinasa 3 tipo Fms (Flt3L, del inglés *Fms-like tyrosine kinase 3 ligand*) es suficiente y esencial para el desarrollo de DCs *in vivo*. En contraste a Flt3-L, la citoquina factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, del inglés *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) no es indispensable en condiciones homeostáticas pero juega un papel importante en situaciones de inflamación.

a. HETEROGENEIDAD Y LOCALIZACIÓN

Las DCs constituyen una población muy heterogénea de células que pueden dividirse en dos poblaciones principales: 1) DCs migratorias provenientes de tejidos no linfoides y DCs convencionales (cDCs) residentes en el tejido linfoide y 2) pDCs. El término "convencional" en las cDCs se ha utilizado

para diferenciarlas de las pDCs dentro de las DCs residentes de un órgano linfoide. Las DCs de órganos no linfoides, por el contrario, son principalmente llamadas DCs de tejidos (32). Tanto las DCs migratorias como las residentes tienen dos funciones principales: el mantenimiento de auto-tolerancia y la inducción de una respuesta inmune específica contra patógenos invasores, mientras que la principal función de las pDCs es secretar grandes cantidades de IFNs tipo 1 en respuesta a una infección viral para activar linfocitos T contra Ags virales.

Dentro de las DCs presentes en tejidos no linfoides se pueden distinguir las presentes en los tejidos estériles, como el páncreas y el corazón, las DCs presentes en los sitios de filtrado, como el hígado y el riñón, y las DCs presentes en la interfaz con el medio ambiente, como el pulmón, el intestino y la piel (Figura 2).

Las DCs de los tejidos linfoides son las más estudiadas dentro de las subpoblaciones de DCs en ratón. Debido a que en este trabajo de tesis los estudios se realizaron con DCs de bazo, éstas se describen detalladamente a continuación.

Los precursores de las DCs llegan al bazo a través de la sangre, donde terminan de diferenciarse (33). En ratones, DCs esplénicas expresan constitutivamente MHC clase II y la integrina CD11c. Dentro de las cDC (CD11c⁺ B220⁻) se encuentran dos subgrupos principales, que incluyen cDCs CD4⁺ CD8α⁻ CD11b⁺ que se localizan sobre todo en la zona marginal y cDCs CD8α⁺ CD4⁻ CD11b⁻ localizadas principalmente en la zona de células T. También se han identificado cDCs CD4⁻ CD8α⁻ CD11b⁺ y se las conoce como doble negativas. A pesar de la existencia de una baja cantidad de proliferación de progenitores de DCs a nivel local, no se auto-renuevan y son continuamente reemplazadas por precursores vía sanguínea (32). Las DCs de ganglios linfáticos son más heterogéneas, ya que incluyen las cDCs CD8α⁺, CD4⁺ y dobles negativas residentes de tejido que provienen de la sangre, y DCs migratorias que entran a través de los vasos linfáticos aferentes y varían de acuerdo al sitio de drenaje del ganglio linfático (34). El tejido linfoide asociado a mucosas incluye: tejido linfoide en la nasofaringe, las placas de Peyer y folículos linfoides aislados en el intestino delgado grueso. Estos tejidos son en su mayoría poblados por DCs derivadas de la sangre, cuyo fenotipo se asemeja al encontrado en bazo (35). En el timo, las DCs se ubican principalmente en la médula y en su mayoría son CD8α⁺. La función principal de estas DCs es participar en la selección negativa de los linfocitos T (36).

Las pDCs expresan constitutivamente MHC clase II y en ratones se las reconoce por su baja expresión de CD11c y el fenotipo CD11b⁻ B220⁺ Ly6C⁺ y PDCA1⁺. Estas células circulan por la sangre y en condiciones normales son encontradas en médula ósea, bazo, timo, ganglios linfáticos e hígado. Las pDCs

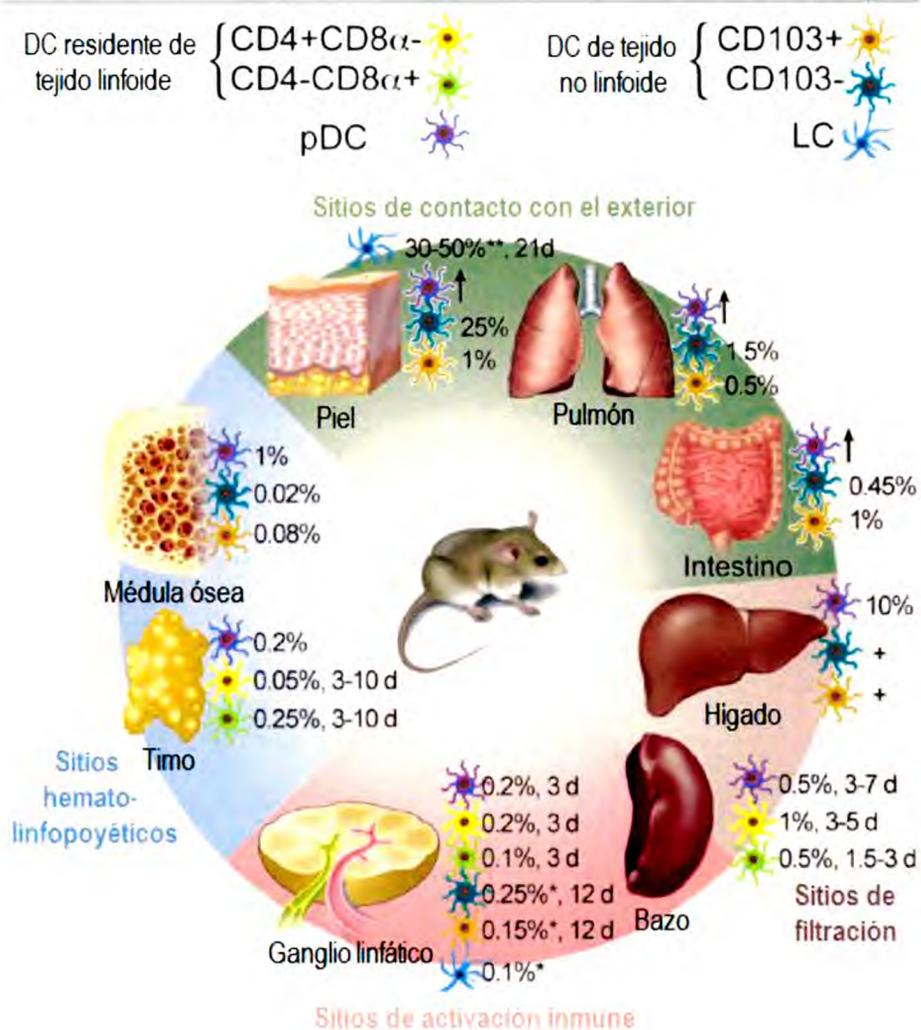


FIGURA 2. Población de DCs en ratón: localización y recambio en condiciones normales. Las DCs se distribuyen por todo el organismo. Se representan las principales subpoblaciones de DCs en los sitios hematopoyéticos, de contacto con el exterior (mucosas), de filtración, y donde ocurre la activación de una respuesta inmune. Los porcentajes corresponden al contenido de DCs en cada órgano con respecto al total de células hematopoyéticas nucleadas. El tiempo de renovación de aproximadamente el 50 % de las DCs se informa en días (d). * Ganglios linfáticos drenantes de piel; ** epidermis; + no se conoce el número exacto; ↑ presentes en inflamación. (Modificado de Merad y colaboradores, 2009 (32)).

ingresan a los ganglios linfáticos a través de las vénulas de endotelio alto y se acumulan en las zonas T paracorticales (37). El tiempo de vida de las pDCs en bazo y ganglio linfático es muy corto por lo que necesitan ser continuamente reemplazadas a través de la sangre.

Las DCs que se encuentran en sangre han sido principalmente estudiadas en humanos, donde se encuentran DCs de tejido tanto cDCs como pDCs. En ratones no están tan bien caracterizadas. La mayoría de las DCs murinas que circulan son pDCs MHC II⁺ CD11c⁺, sin embargo también se encuentra un bajo número de DCs progenitoras CD11c⁺ MHC II⁺ y MHC II⁻ que dan origen a DCs CD8α⁺ y CD8α⁻ en órganos linfoides (38).

b. BIOLOGÍA DE LA DC

A partir de su generación en médula ósea, la DC sufre un proceso de desarrollo que puede dividirse en una fase de diferenciación y en una fase de maduración. En la fase de diferenciación, los progenitores derivados de médula ósea se diferencian en precursores circulantes que llegarán a generar los distintos subtipos de DCs. En este estado, se encuentran como centinelas y son consideradas como células inmaduras. Para poder llevar a cabo su función, las DCs experimentan un complejo proceso de transformación de una célula que captura Ag en una CPA, llamado maduración (Figura 3). Este proceso incluye (29): 1. cambios en la morfología como la reorganización del citoesqueleto y la adquisición de alta motilidad celular, 2. pérdida de receptores endocíticos/fagocíticos, 3. secreción de quimioquinas, 4. aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras, 5. translocación de MHC clase II de compartimentos a la superficie celular y 6. secreción de citoquinas.

Una vez que las DCs han sido activadas, adquieren la capacidad para interactuar con linfocitos. Las DCs realizan esta interacción a través de por lo menos tres familias de moléculas: citoquinas, moléculas de la familia B7 y miembros de la familia de TNF. El inicio de la inmunidad adaptativa mediada por células T plantea varios desafíos. En primer lugar, la frecuencia de células T con su receptor (TCR, del inglés *T cell receptor*) específico es extremadamente baja. En segundo lugar, las células infectadas expresan muy pocas moléculas MHC clase I y ninguna MHC clase II para poder ser reconocidas por las células T específicas. En tercer lugar, las células infectadas carecen de moléculas coestimuladoras, indispensables para promover la expansión clonal de células T y la producción de citoquinas, por lo tanto carecen de capacidad para generar linfocitos T citotóxicos (CTL, del inglés *Cytotoxic T lymphocyte*) y T cooperadores. Estos retos son ampliamente superados por las DCs, quienes capturan microbios, presentan sus Ags y proporcionan señales necesarias para la expansión y la diferenciación de células T. A partir del reconocimiento de PAMPs o en respuesta a citoquinas inflamatorias secretadas por células del tejido afectado, las DCs aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras y migran a los sitios donde

se encuentran las células T específicas de Ag en órganos linfáticos secundarios. Así, las DCs han sido consideradas tradicionalmente como centinelas móviles que llevan los Ags a los linfocitos T y los activan.

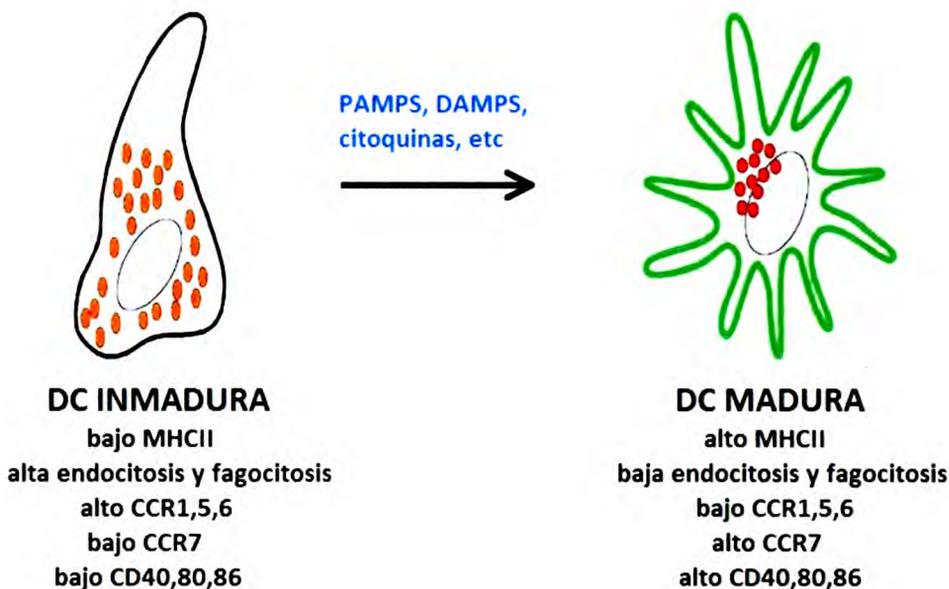


FIGURA 3. Proceso de maduración de la DC. Después de la maduración, las DCs sufren grandes cambios morfológicos, fenotípicos y funcionales. Cuando la DC inmadura reconoce un producto microbiano o una señal de peligro, se activa y madura cambiando la expresión de un gran número de moléculas de superficie e intracelulares necesarias para que la DC pueda migrar hacia la zona T de los órganos linfáticos, procesar Ags, estimular y modular la activación y diferenciación de las células T vírgenes. La DC expresa de forma constitutiva MHC clase II y moléculas coestimuladoras, que incrementan su expresión con la maduración y le sirven para realizar la iniciación de la respuesta T contra Ags.

CAPTURA DEL ANTÍGENO

Los principales mecanismos de captura del Ag ejercidos por las DCs son pinocitosis, endocitosis mediada por receptor y fagocitosis. La pinocitosis, caracterizada por la invaginación de la membrana y la formación de vesículas de gran tamaño, permite la internalización de partículas solubles provenientes de los fluidos extracelulares. La endocitosis mediada por receptores ocurre en DCs a través de moléculas presentes en su superficie, tales como los receptores de los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas (FcγR) para la captura de los inmunocomplejos, los receptores de tipo lectina y el receptor de manosa pudiendo fijar el Ag. Mediante la fagocitosis las DCs son capaces de internalizar cuerpos apoptóticos y necróticos, bacterias y parásitos.



Clásicamente, se ha descrito que estos mecanismos de captura de Ags son funciones especializadas de las DCs inmaduras y que tras recibir un estímulo de maduración, las DCs disminuyen su capacidad de endocitosis. Sin embargo, la formación de vesículas de clatrina (esenciales en la pinocitosis) tiene lugar de forma continua en las células. Por ello y por publicaciones recientes, no debería considerarse que las DCs maduras no son capaces de llevar a cabo procesos de internalización de Ags.

PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DEL ANTÍGENO

Los Ags capturados son procesados por las DCs en distintos compartimentos intracelulares, dando lugar a la generación de péptidos antigénicos que se unen a moléculas MHC de clase I o II. Una vez expresados en la superficie celular, los complejos MHC/péptido pueden ser reconocidos por linfocitos T a través de su TCR. Además de unirse al receptor T, las dos clases de moléculas de MHC son reconocidas de diferente manera por las dos moléculas correceptoras, CD4 y CD8, que caracterizan los dos grupos principales de linfocitos T. Los linfocitos TCD8⁺ reconocen péptidos asociados a moléculas MHC clase I y los linfocitos TCD4⁺ reconocen péptidos asociados a moléculas MHC clase II.

Existen distintas vías para la presentación de péptidos antigénicos. Los péptidos asociados a MHC clase I son producidos por la degradación proteolítica de proteínas citoplasmáticas, el transporte de los péptidos generados al retículo endoplásmico y la unión a moléculas MHC clase I (Figura 4A). Dichas proteínas citoplasmáticas pueden derivar de la síntesis endógena de proteínas, de virus que han infectado a la CPA o bacterias intracelulares. La generación de los péptidos a partir de Ags citoplasmáticos se realiza mediante una proteólisis por proteasoma, el cual puede generar una amplia variedad de péptidos. Los péptidos generados son trasladados al retículo endoplásmico por las proteínas transportadoras TAP donde se encuentran las moléculas MHC clase I recién sintetizadas. La síntesis y el ensamblaje de las moléculas MHC clase I implican un proceso de varios pasos. Las cadenas α y β_2 -microglobulina de MHC clase I se sintetizan en el retículo endoplásmico y su plegamiento es asistido por proteínas chaperonas como calnexina y calreticulina. Dentro del retículo endoplásmico, la molécula MHC clase I recién formada se une a TAP de manera no covalente mediante una proteína enlazadora llamada tapasina. Luego de que los péptidos ingresan en el retículo endoplásmico a través de TAP, se unen a moléculas MHC clase I después de lo cual se libera de tapasina y es capaz de salir del retículo endoplásmico para ser transportados a la superficie celular en vesículas exocíticas. Una vez expresados en la superficie celular, los complejos MHC clase I/péptido pueden ser reconocidos por linfocitos T CD8⁺ específicos a dicho Ag.

La generación de péptidos asociados a MHC clase II a partir de Ags endocitados implica la degradación proteolítica de las proteínas (o microbios) internalizadas y la unión de los péptidos

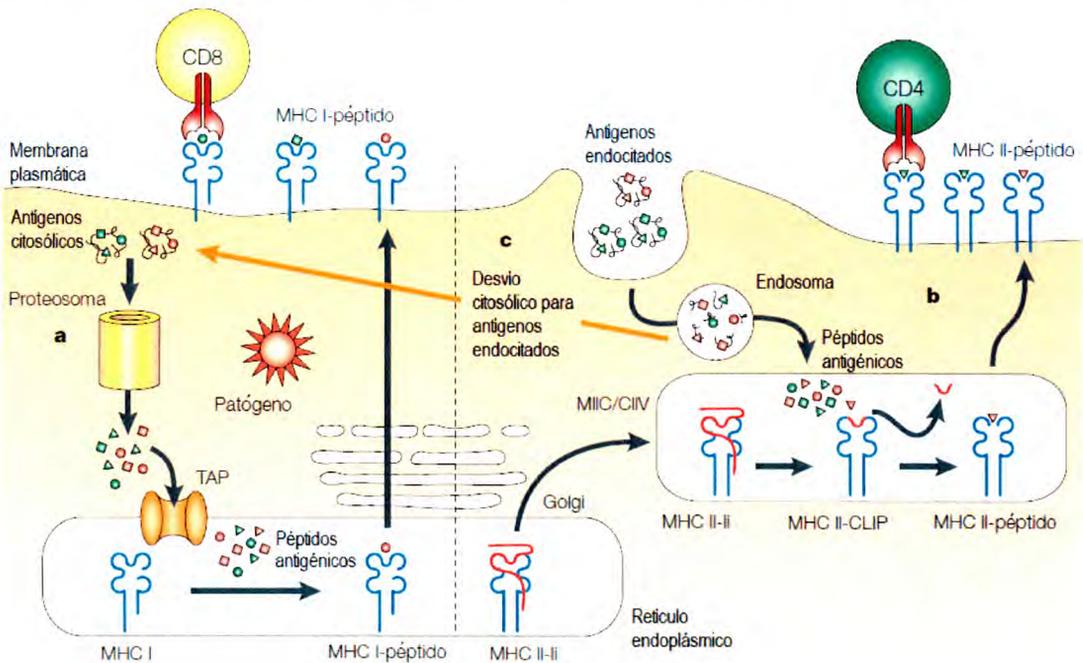


FIGURA 4. Diferentes vías de presentación antigénica. (A). Moléculas MHC clase I presentan péptidos principalmente derivados de proteínas sintetizadas endógenamente, degradadas por el proteosoma y transportadas a través de TAP al retículo endoplásmico para la unión con moléculas MHC clase I. **(B).** Por el contrario, moléculas MHC clase II presentan proteínas que entran en la célula a través de la vía endocítica. Durante la maduración de las moléculas MHC clase II, se les impide la unión a Ags endógenos en el retículo endoplásmico por la asociación con la cadena invariante (Ii). MHC clase II-Ii se mueve a través del aparato de Golgi al compartimento de carga MIIC/CIIV donde Ii se degrada a CLIP. CLIP se libera del complejo al intercambiarse con péptidos antigénicos. **(C).** Las DCs pueden endocitar Ags y realizar presentación cruzada a linfocitos T CD8⁺. En la mayoría de los casos, estos Ags también serán procesados en la vía de MHC clase II para el reconocimiento de las células T CD4⁺ cooperadoras. (Modificado de Heath y colaboradores, 2001 (39)).

generados a moléculas MHC clase II en endofagosomas (Figura 4B). Los pasos iniciales para la de Ags extracelulares son la unión de la proteína a una CPA, su internalización y localización en endofagosomas que contienen enzimas proteolíticas. La degradación de las proteínas es un proceso activo mediado por proteasas que actúan a un pH ácido. Diferentes enzimas pueden participar en dicha degradación siendo las más comunes las catepsinas. Las cadenas α y β de las moléculas de MHC clase II son sintetizadas y ensambladas en el retículo endoplásmico y para su plegado se requieren proteínas chaperonas como calnexina. Una proteína llamada cadena invariante (Ii) se une a las moléculas MHC clase II recién

sintetizadas en el retículo endoplásmico lo que impide que péptidos presentes en el mismo se unan a éstas. Las vesículas que contienen moléculas MHC clase II surgen del complejo de Golgi y se dirigen hacia fagolisosomas donde se fusionan con los endosomas que contienen los Ags internalizados y procesados. li debe ser removida por las mismas enzimas proteolíticas que generan péptidos debido a que bloquea el sitio de unión de péptidos a la molécula MHC clase II. Esta ruptura deja un fragmento remanente de sólo 24 aminoácidos llamado péptido de cadena invariante asociado a clase II (CLIP, del inglés *Class II-associated li peptide*), cuya eliminación se logra por la acción de una molécula llamada HLA-DM en humanos (H-2M en ratón) que actúa como intercambiador de péptidos. Una vez expresadas en la superficie de la CPA, los complejos MHC clase II/péptido son reconocidos por linfocitos T CD4⁺ específicos a ese Ag.

La defensa inmune contra patógenos intracelulares o tumores es mediada entre otros, por CTLs. Estas células activadas reconocen péptidos específicos presentados por moléculas MHC clase I sobre la superficie de células infectadas o transformadas y las destruyen para evitar la propagación de la infección o cáncer. Los CTLs son inducidos a partir de la activación de células T CD8⁺ vírgenes por medio de DCs maduras. La expansión clonal y diferenciación de estas células T vírgenes requiere la unión específica de su TCR y del correceptor CD8 al complejo MHC clase I/péptido que se encuentra sobre la CPA. Dicha interacción Ag específica se denomina señal 1. Sin embargo esto no es suficiente. Se requiere, además, una fuerte señal coestimuladora proporcionada por la misma CPA denominada señal 2 y una señal 3 dada por las citoquinas secretadas que polarizan el tipo de respuesta (40). Las moléculas coestimuladoras mejor caracterizadas son las glicoproteínas B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86).

Para evitar la muerte de células sanas no infectadas, que han endocitado restos virales de células infectadas o restos tumorales, este material no suele entrar en la maquinaria de carga de MHC clase I en el retículo endoplásmico, vía que está reservada para los péptidos derivados de proteínas sintetizadas intracelularmente. Sin embargo, esta restricción para los Ags extracelulares para unirse a MHC clase I tiene una excepción: los Ags de patógenos intracelulares incapaces de infectar las DCs. Los linfocitos T CD8⁺ vírgenes necesitan ser activados por CPAs profesionales, por lo general DCs, para que puedan ejercer sus funciones efectoras citotóxicas. Si un patógeno intracelular no infecta a la CPA, se compromete su presentación por vía MHC clase I y la activación de linfocitos T CD8⁺. Una situación semejante se observa con Ags de células tumorales. Los CTLs contra Ags derivados de patógenos intracelulares o células tumorales sólo pueden activarse si la CPA es capaz de internalizar Ags exógenos e incorporarlos a la vía de procesamiento y presentación de Ag asociado a las moléculas de MHC clase I.

Este proceso es denominado presentación cruzada de Ags (Figura 4C) y fue descubierto en la década de 1970 por Bevan y colaboradores (41), quienes mostraron que Ags de células inyectadas por vía intravenosa ingresaban en la vía de MHC clase I de las CPAs del huésped para activar CTLs (41). Ha sido demostrado que la presentación cruzada de Ags es necesaria para la defensa contra muchos virus y tumores, y es esencial para las vacunas con Ags de proteínas en las que se necesita la inducción de una respuesta mediada por CTLs. Los Ags propios también son presentados mediante presentación cruzada pero en lugar de activar CTLs (*cross-priming*), se produce normalmente la supresión de CTLs autorreactivos, en un proceso denominado tolerancia cruzada (*cross-tolerance*) (42).

PRESENTACIÓN CRUZADA DE ANTÍGENOS

Para la iniciación de la respuesta inmune citotóxica contra Ags exógenos, las DCs, las CPA más potentes, deben realizar presentación cruzada de Ags fagocitados a linfocitos T CD8⁺ (43, 44). Gracias a este mecanismo las DCs pueden ingerir patógenos, células infectadas, células tumorales o células muertas y así obtener péptidos antigénicos. Las DCs son el principal tipo de células que realizan presentación cruzada de Ags *in vivo* (45, 46). *In vitro*, sin embargo, otros tipos celulares (incluidos macrófagos y células B) pueden también presentar Ags por esta vía (47-49), pero hasta ahora no está claro si los mecanismos intracelulares utilizados por estas células son similares a los empleados por las DCs. Aún en las DCs, los compartimentos intracelulares involucrados en la presentación cruzada de Ags no están completamente definidos.

Se han descrito dos mecanismos principales mediante los cuales ocurriría la presentación cruzada de Ags exógenos: una vía citosólica y una vía vacuolar (50).

La vía citosólica de presentación cruzada de Ags exógenos propone que las proteínas antigénicas presentes en los compartimentos endosómicos escapan al citosol, donde son degradadas por el proteasoma. Los péptidos generados de esta degradación, son luego recortados por aminopeptidasas presentes en el citosol o el retículo endoplásmico (51, 52) obteniendo el tamaño final adecuado para su unión a las moléculas MHC clase I. Finalmente los péptidos generados son transportados al retículo endoplásmico mediante TAP para su unión a las moléculas MHC clase I (53). Algunos trabajos han propuesto que la carga de los péptidos también podría ocurrir en los compartimentos endocíticos, ya que se ha descrito que existe reclutamiento del complejo TAP y MHC clase I en endosomas y

fagosomas (54, 55). Según las evidencias actualmente disponibles, la vía citosólica sería la vía predominante en la presentación cruzada de Ags (50, 56).

En la vía vacuolar de presentación cruzada de Ags la carga del Ag exógeno en las moléculas MHC clase I ocurre en los compartimentos endocíticos sin pasar en ningún momento por el citosol. Esto sugiere que el procesamiento de los Ags hasta alcanzar el tamaño adecuado para su unión en las moléculas MHC clase I es llevado a cabo por proteasas lisosomales. La presentación cruzada mediante la vía vacuolar es resistente a la acción de los inhibidores de proteasoma e independiente de TAP (57).

Algunas de las vías anteriormente descritas sugieren que la presentación cruzada de Ags se lleva a cabo en un compartimento intracelular especializado. Este compartimento puede ser un endosoma o fagosoma dependiendo del tamaño y modo de internalización del Ag (58). Los Ags que son internalizados por endocitosis o fagocitosis se someten a una degradación proteolítica gradual en su paso por endosomas tempranos y fagosomas hasta lisosomas. Una vez en los lisosomas, los Ags son degradados por proteasas lisosomales, que podrían destruir potenciales epitopes cruciales para la activación de células T. Las DCs evitan este problema mediante la expresión de bajos niveles de proteasas lisosomales (59). Además, como la mayoría de estas proteasas funcionan de manera óptima a un pH ácido, el mantenimiento de un pH alcalino en el compartimento de presentación cruzada, inhibiría la actividad de dichas proteasas, impidiendo así la degradación rápida de los antígenos. Para este fin, se informó que las DCs poseen un alto pH fagosomal, alcanzando valores de 7,5 a 8, en contraste con los macrófagos que acidifican rápidamente sus fagosomas, alcanzando valores de 4,5 a 5 luego de fagocitar perlas de látex inertes. La alcalinización en las DCs sería mediada por la NADPH oxidasa NOX2, y es importante en la presentación cruzada de Ags particulados en los fagosomas y de Ags solubles en los endosomas (60, 61).

Por otra parte, se ha observado que la eficacia en la presentación cruzada de Ags exógenos por parte de las DCs está relacionada con la capacidad de los Ags para escapar de la degradación lisosomal y ser exportados al citosol donde serán procesados por el proteasoma u otras proteasas citosólicas y de esta forma ser presentados vía MHC clase I a las células T CD8⁺ (62, 63).

Como ya se ha indicado anteriormente, las DCs son las CPAs más importantes en cuanto a la realización de presentación cruzada de Ags. Entre las diferentes subpoblaciones de DCs, las que expresan los marcadores de superficie CD24, CD8 α y CD103 son las que usualmente realizan presentación cruzada de Ags en ratones (64-67). En condiciones inflamatorias en los tejidos de las mucosas y en los tumores,

las DCs que carecen de expresión de CD24, CD103 y CD8 α pueden también realizar presentación cruzada en ratones (68-72).

Una respuesta inmunológica requiere que las DCs capturen el Ag asociado con PAMPs indicativos de la presencia de microorganismos o de otras señales de peligro. Además de la ya descrita maduración de las DCs, la señalización por TLRs mejora la carga de péptidos a las moléculas MHC clase I mediante la inducción de la reubicación de los componentes de la maquinaria de carga de péptidos a los endosomas en los que se realiza la presentación (55). Además, la activación de RLRs y NLRs potencia las respuestas CTLs y la evidencia sugiere que estos sensores citoplasmáticos pueden estimular la presentación cruzada de Ags. Las DCs requieren además señales de linfocitos T CD4⁺ cooperadores específicos para poder activar CTLs. La necesidad de ayuda específica de células T CD4⁺ se puede ver como una estrategia de seguridad antes de la programación de CTLs para cumplir funciones citotóxicas. De esta manera, se reduce la probabilidad de un evento autoinmune ya que es necesario el encuentro de tres poblaciones celulares diferentes: DC, linfocito T CD8⁺ y linfocito T CD4⁺. Las DCs actúan como un puente temporal entre linfocitos cooperadores (CD4⁺) y CTLs (CD8⁺).

Actualmente está ampliamente aceptado que los ligandos de los TLRs no sólo estimulan la transcripción de citoquinas y moléculas coestimuladoras, sino también una serie de respuestas que afectan al sistema de membranas vacuolares, el citoesqueleto y la maquinaria de traducción y degradación de proteínas (73). Es por eso que un aspecto de la presentación cruzada que está siendo analizado es su relación con DCs estimuladas con los ligandos de TLRs. Ha sido descrito que la presentación cruzada puede ser estimulada por patrones moleculares microbianos, en particular por ligandos de TLR (74-77), cuyos efectos incluyen la inducción de la maduración de DCs, aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras y aumento de la captura de Ag y su procesamiento (8, 78-83).

Se ha demostrado que los ligandos de TLR7 resiquimod o imiquimod son débiles inductores de la activación de linfocitos T CD8⁺ mediante presentación cruzada (77, 84, 85). Recientemente algunos autores, demostraron que otros ligandos de TLR7 como polyUs21 (del inglés *phosphorothioate-linked 21-mer polyU RNA*), una línea celular infectada con influenza y polyU (ácido poliuridílico), pueden estimular la presentación cruzada en DCs generando una fuerte respuesta inmune citotóxica (86-88).

4. SISTEMA INMUNE Y ENVEJECIMIENTO

“Para 2050, en los países desarrollados habrá el doble de personas de edad avanzada que de niños, y en los países en desarrollo está previsto que se duplique el número total de personas mayores. Esta tendencia tendrá consecuencias trascendentales tanto para los países como para los individuos”.

*Mensaje del Secretario General de la ONU, Ban Ki-moon,
con motivo del Día Internacional de las Personas de Edad
1 de octubre de 2013.*

Debido al aumento de la esperanza de vida y a la disminución de la tasa de fecundidad, la proporción de personas mayores de 60 años está aumentando más rápidamente que cualquier otro grupo de edad en casi todos los países, según datos de la OMS.

En la Argentina, según el último Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2010, la población de *65 años o más* correspondería al 10,2 % del total y la de *60 años o más*, al 14,3 %, haciendo que nuestro país sea el tercer país más envejecido de América Latina después de Uruguay y Cuba.

El deseo del ser humano de vivir una vida más prolongada y saludable ha impulsado desde siempre a estudiar el proceso de envejecimiento. Un sistema inmune funcional es de vital importancia para que el organismo gane la lucha diaria contra el ataque de agentes patógenos. La importancia que tiene para la salud pública conocer más en detalle aspectos de la respuesta inmune de un sector de la población en continuo crecimiento es evidente.

En humanos y otras especies, es conocido que el sistema inmune sufre alteraciones con el envejecimiento, fenómeno que se conoce como inmunosenescencia (89-91). El consenso general es que la función del sistema inmune disminuye con la edad, sin embargo, algunos parámetros permanecen inalterados mientras que otros aumentan. Las principales evidencias que indican una disminución en la función del sistema inmune con la edad, son los hallazgos clínicos en los que se observa que con el envejecimiento se produce un aumento de la susceptibilidad a las infecciones, un aumento de la incidencia de cáncer y enfermedades autoinmunes, y una pobre respuesta a la vacunación (92-99).

Las enfermedades infecciosas siguen siendo una importante causa de muerte en las personas mayores. Se observa que esta población sufre de infecciones cada vez más severas como las

neumocócicas, por virus influenza o por virus sincicial respiratorio. También se observa un aumento de la susceptibilidad a las infecciones bacterianas de los pulmones, tracto urinario y piel (96-98).

Muchas alteraciones relacionadas con la edad han sido establecidas tanto en la inmunidad innata como la adaptativa (92, 100, 101), siendo principalmente reconocidas las alteraciones en la producción y función de los linfocitos, que son los principales mediadores de la inmunidad adaptativa (100, 102, 103). Sin embargo, estudios recientes demuestran que el envejecimiento también altera la función de las células madre hematopoyéticas (104). Al ser estas células las que dan origen a linajes mieloides y linfoides, esto podría relacionarse con las alteraciones que se encuentran en el sistema inmune innato y adaptativo con la edad.

a. CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS Y ENVEJECIMIENTO

En médula ósea, el número de células madre hematopoyéticas (HSCs, del inglés *Haematopoietic stem cells*) aumenta de dos a diez veces con el envejecimiento, tanto en ratones como humanos (104). Esto podría considerarse intuitivamente como beneficioso, sin embargo bajo condiciones de estrés y de regeneración las HSCs presentan varios defectos funcionales. Estudios en ratones han mostrado que el potencial regenerativo de las HSCs se encuentra reducido con el envejecimiento, y tras la mieloablación por trasplante, no logran reconstituir eficientemente el compartimento hematopoyético del receptor. Además, la diferenciación de las HSCs de un ratón envejecido se encuentra sesgada hacia linaje mieloides a expensas del linfoides. Evidencias similares han sido observadas en HSCs de donantes humanos mayores (105, 106). Los mecanismos subyacentes a estos hallazgos probablemente incluyen tanto alteraciones celulares intrínsecas asociadas con el envejecimiento como cambios en el microambiente. Por ejemplo mutaciones en el ADN mitocondrial, daño oxidativo producido principalmente por especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive oxygen species*), daño en el ADN genómico, acortamiento de telómeros, cambios epigenéticos o factores secretados por el propio nicho de la médula ósea o a nivel sistémico (104).

b. INMUNIDAD ADAPTATIVA Y ENVEJECIMIENTO

La inmunidad adaptativa, también conocida como inmunidad adquirida, es específica para diferentes Ags microbianos y no microbianos y su respuesta aumenta con la exposición repetida al antígeno (memoria inmunológica). Existen dos tipos de respuesta inmune adaptativa: la inmunidad

humoral y la inmunidad celular, las cuales están mediadas por diferentes componentes del sistema inmune y cuya función es eliminar distintos tipos de microorganismos. La inmunidad humoral está mediada por los linfocitos B y sus productos de secreción—los anticuerpos— y actúa como el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y sus toxinas. A su vez, la inmunidad celular está mediada por los linfocitos T y sus productos —las citoquinas— y resulta esencial en la defensa frente a microorganismos intracelulares, favoreciendo la destrucción de los microorganismos que residen en los fagocitos o células infectadas, con el fin de eliminar los reservorios de la infección. Los linfocitos, ya sean T o B, son las únicas células del organismo capaces de reconocer y distinguir específicamente diferentes determinantes antigénicos y, por lo tanto, son responsables de las dos características que definen la respuesta inmune adaptativa: especificidad y memoria (107). Dado el importante papel que los linfocitos tienen en la respuesta inmune, la mayor parte de los estudios sobre la inmunosenescencia, tanto en humanos como en animales de experimentación, se han centrado en el análisis del efecto del envejecimiento sobre la inmunidad adaptativa mediada por estas células (90, 108).

LINFOCITOS T

Uno de los paradigmas más ampliamente aceptado es que el compartimento de células T se deteriora progresivamente con la edad, como consecuencia inevitable de la involución tímica que inicia poco antes del año de vida y se completa al final de la sexta década de la vida. Esta modificación tímica está acompañada por una disminución en el número de células T vírgenes que emigran del timo hacia la periferia (109). Asimismo, se ha reportado que en adultos mayores estas células presentan también numerosos defectos funcionales, incluyendo acortamiento de telómeros, repertorio de receptor de células T (TCR) restringido, menor producción de IL-2 y deficiencias en su diferenciación y proliferación hacia células efectoras, lo que conlleva a una disminución de su capacidad para mediar de manera efectiva la respuesta inmune contra nuevos Ags (103, 109). Esta disminución en el número de células T vírgenes relacionada con la edad, se acompaña de un aumento en el número de células T de memoria y células T efectoras, como consecuencia de la exposición repetida a diversos patógenos a lo largo de la vida (110). Sin embargo, estas células T efectoras también presentan cambios fenotípicos, como la pérdida de la molécula coestimuladora CD28 que se ha considerado como un predictor clave de incompetencia inmune en los adultos mayores. Asimismo, en las células T CD4⁺ la pérdida de la molécula CD28 se acompaña, además, por un defecto en la expresión de CD154 (CD40L); de ahí que su capacidad

de estimular a las células B para su subsecuente proliferación y producción de anticuerpos se encuentre disminuida (109).

Trabajos recientes encontraron que células T reguladoras (Treg), un subtipo de células T CD4⁺, se encuentran incrementadas con el envejecimiento tanto en humanos como en ratón. Además, se encontró recientemente, que Treg de ratones envejecidos tienen mayor capacidad supresora que Treg de ratones jóvenes (111).

LINFOCITOS B

El envejecimiento se acompaña de cambios importantes en el repertorio de células B y, en consecuencia, en la función de la respuesta inmune humoral. Similar al compartimento de células T, el compartimento de células B se llena de células de memoria a expensas de un desplazamiento simultáneo de células B vírgenes (112). El porcentaje de células B vírgenes, que se definen por la ausencia de CD27, se reduce de manera significativa con la edad. En contraste, las células B de memoria que muestran una disminución de la susceptibilidad a la apoptosis (113) se acumulan en personas de edad avanzada, lo que lleva a la expansión clonal de algunas células B específicas (114). Estas expansiones pueden limitar la diversidad del repertorio e influir en el resultado de la vacunación en personas de edad avanzada. También se han observado defectos intrínsecos en las células B con el envejecimiento, como defectos en el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y en la hipermutación somática. Aunque los niveles de inmunoglobulinas son estables en suero durante el envejecimiento, se ha documentado un aumento en los títulos de autoanticuerpos. Estos autoanticuerpos no están generalmente asociados con enfermedades autoinmunes, posiblemente por la baja afinidad de los mismos (115, 116).

c. INMUNIDAD INNATA Y ENVEJECIMIENTO

Al igual que el sistema inmune adaptativo, se ha demostrado que el envejecimiento también tiene un impacto sobre la respuesta inmune innata, ya que muchas de sus funciones, sufren cambios importantes con la edad, contribuyendo así al deterioro general del sistema inmune. A pesar de que ha sido descrito un aumento en el número de precursores mieloides en la médula ósea de personas de edad avanzada, el estallido oxidativo y la capacidad fagocítica de macrófagos y neutrófilos están disminuidos en estos individuos (117, 118). Por otra parte, los niveles de mediadores solubles del

sistema inmune se alteran con el envejecimiento. Han sido descritas concentraciones plasmáticas elevadas de varias citoquinas, tales como IL-6, TNF- α y la IL-1 β , como marcadores predictivos de morbilidad y mortalidad en los ancianos. Se cree que estos factores son el resultado de un estado inflamatorio subclínico asociado al envejecimiento descrito como *inflammaging*, que impulsaría el desarrollo y la progresión de enfermedades relacionadas con la edad tales como la osteoporosis y trastornos neurodegenerativos (119).

NEUTRÓFILOS

El tamaño de la mayoría de las poblaciones celulares de la inmunidad innata parece permanecer estable o bien disminuir con la edad. En particular, algunos estudios han reportado ningún cambio o sólo una leve disminución en el número de neutrófilos (120). Distintos trabajos indican que la capacidad fagocítica así como la capacidad microbicida intracelular de los neutrófilos están disminuidas en el envejecimiento, lo cual estaría asociado con alteraciones en la transducción de señales (121, 122). Defectos en distintas vías de señalización, incluyendo la generación del estallido respiratorio y las vías de apoptosis, resultarían en una menor protección contra infecciones microbianas. Aunque al principio se creía que la función de los neutrófilos de ratón se encontraba conservada con el envejecimiento, un estudio reciente en ratones envejecidos indica que los neutrófilos infectados *in vitro* con *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), mostraron una disminución en la producción del ligando de la quimioquina CXC-1 (CXCL1) y CXCL2 (121), y en la formación de trampas extracelulares (NET, del inglés *Neutrophil extracellular traps*). La quimiotaxis (movimiento direccional en respuesta a un gradiente de un estímulo) de los neutrófilos de humanos y ratón también parece estar afectada con el envejecimiento (123, 124).

CÉLULAS NK Y NKT

Las células asesinas naturales (NK, del inglés *Natural Killer cells*) muestran una disminución de la citotoxicidad, la infiltración pulmonar y la producción de IFN- γ en un modelo de infección por virus influenza en ratones de edad, en comparación con ratones jóvenes (125). En un modelo de virus de la viruela de ratón, células NK de ratones envejecidos mostraron defectos en la migración a ganglios linfáticos regionales (126). La citotoxicidad de las células NK inducida por IFNs de tipo I parece estar disminuida en ratones envejecidos, al igual que la producción de IFN- γ y granzima B en respuesta a una

combinación de citoquinas específicas (127). En humanos, las células NK se pueden dividir ampliamente en una población CD56^{low} que tiene principalmente actividad citotóxica y una población CD56^{high} que es más eficiente como productora de citoquinas (128). Las células NK CD56^{high} parecen disminuir en proporción, y en la secreción de citoquinas y quimioquinas con el envejecimiento. En los adultos mayores, el compartimento de células NK CD56^{low} aumenta, pero su capacidad citotóxica disminuye (129, 130).

Las células T asesinas naturales (NKT, del inglés *Natural Killer T cells*) representan una población única y heterogénea de células T que comparten algunas características fenotípicas y funcionales con las células NK (131, 132). Las células principalmente estudiadas son las células NKT clásicas o invariantes (iNKT, del inglés *invariant NKT*) que expresan un receptor de células T alfa-beta (TCR $\alpha\beta$) y que están restringidas a las moléculas CD1d del MHC. El número de células iNKT en ratones envejecidos se encuentran incrementados en comparación con los ratones jóvenes (133), por el contrario, en humanos disminuyen con la edad y muestran una proliferación disminuida en respuesta al ligando de CD1d α -galactosilceramida (134, 135).

MACRÓFAGOS

Varios informes han demostrado una disminución en la producción de óxido nítrico (ON) por macrófagos de ratón asociado al envejecimiento. Al mismo tiempo, también se ha reportado un aumento en la producción de PGE2 (prostaglandina E2) y en la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) (136). Por el contrario, otros estudios han mostrado que macrófagos peritoneales de ratones BALB/c envejecidos estimulados con CpG-ODN son capaces de producir no sólo ON, sino también IL-12 (137). La evaluación de los efectos del envejecimiento en la fagocitosis ha producido resultados contradictorios. Aunque varios estudios informan una fagocitosis bacteriana conservada en macrófagos de ratones envejecidos, estudios de monocitos humanos sugieren que hay un deterioro en la fagocitosis asociada a la edad (138). La fagocitosis de células apoptóticas por macrófagos de ratones envejecidos se encuentra reducida (139). También se ha observado una disminución generalizada en la producción de citoquinas en respuesta a la activación de TLR2/6, 3, 4, 5, y 9 en macrófagos esplénicos y peritoneales de ratones C57BL/6 asociado con una disminución en la expresión génica de los TLR (98). Sin embargo, en ratones BALB/c envejecidos, se informó una disminución de la transducción de señales de TLR, por ejemplo a través de la vía de las MAPK y JNK, en lugar de una disminución en la expresión de TLRs (101).

CÉLULAS DENDRÍTICAS

En general, los estudios de DCs muestran un deterioro en su función asociado con el envejecimiento (140-142). Sin embargo, otros trabajos demuestran que no existe ninguna alteración (143, 144). En un modelo tumoral de melanoma, BMDCs de ratones envejecidos, no pudieron controlar el crecimiento tumoral, en comparación con BMDCs de ratones jóvenes (145). Al evaluar la respuesta inmune *in vivo* frente a un modelo de infección por *Listeria monocytogenes*, Li y colaboradores (146) demostraron alteraciones asociadas con el envejecimiento en las cDC CD8 α ⁺ esplénicas murinas, caracterizadas por una expresión reducida de moléculas coestimuladoras en los primeros momentos después de la infección, pero no después de la incubación *in vitro* con LPS. En humanos se encontró una secreción reducida de IFN tipo I en pDC de personas mayores en respuesta al virus de influenza (17, 96), virus que activa pDCs a través de TLR7. Otro estudio también reportó una reducción en las respuestas de IFN tipo I y tipo III en pDC de personas de edad avanzada en comparación con los jóvenes frente a la estimulación *in vitro* con virus de la influenza (147), un patógeno que induce mayor mortalidad en las personas de edad avanzada (148). Además, este estudio también encontró defectos en la fosforilación de IRF7 en pDC de ancianos en comparación con pDC de jóvenes pero no encontró alteraciones en la expresión de TLR7 o TLR9 con el envejecimiento. Otro estudio encontró que pDC y cDC de personas de edad avanzada también muestran una reducida producción de IFN tipo I en respuesta a la infección por virus del Nilo Occidental, un virus ARN de simple cadena, en comparación con jóvenes (149). En humanos, las cDCs parecen no sólo tener alteradas sus funciones básicas como endocitosis, quimiotaxis, producción de IL-12, sino también su habilidad para activar células T CD4⁺ naïve (93, 150). Esto se ha atribuido a una menor actividad de PI3K (151). Se ha reportado que las DC de personas mayores presentan mayor producción de citoquinas proinflamatorias y un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras en respuesta a Ags propios (152). En contraste, un estudio posterior, observó una reducción en la producción de IL-6 y TNF- α en cDC de personas mayores en respuesta a una amplia gama de activadores de TLR (153). Esta discrepancia podría estar relacionada con la diferencia en la preparación de las células.

Algunas contradicciones encontradas en estos estudios, pueden atribuirse a la falta de una definición clara de las poblaciones de DCs estudiadas, la sensibilidad de las DCs a la manipulación *ex vivo* y el limitado número de células que puede ser recuperado a partir de ciertos órganos. Se han utilizado varias poblaciones de CPAs, que van desde células adherentes cultivadas *in vitro*, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) a DCs diferenciadas *in vitro*

derivadas de médula ósea o BMDCs y más recientemente poblaciones definidas *ex vivo* por marcadores de superficie. El uso de diferentes fuentes de células dificulta la comparación de los estudios. También se desconoce cómo los datos obtenidos de modelos de DCs diferenciadas *in vitro* se traducen al comportamiento de estas células *in vivo*.

En los estudios de DCs de humano, el estado de salud en individuos de edad, es una fuente de discrepancia, y aún así utilizando protocolos con tantos criterios de exclusión que limitan los estudios a los individuos más sanos, como el SENIEUR de uso internacional, el 85 % de la población queda fuera de los estudios (154). Por otra parte, la heterogeneidad de estas observaciones puede así reflejar la naturaleza estocástica del proceso de envejecimiento en sí mismo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Numerosas evidencias indican que el proceso de envejecimiento se caracteriza por una alteración en la función del sistema inmune, afectando células de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa.

Las DCs poseen una poderosa maquinaria que les permite ser las CPAs más eficientes. Por lo tanto, si parte de esta maquinaria se encontrara alterada con el envejecimiento, esto podría ser una de las causas de la respuesta T deficiente observada en individuos envejecidos.

La hipótesis de trabajo planteada en esta tesis doctoral considera que la DC se encuentra afectada por el proceso de envejecimiento a través de alteraciones funcionales relacionadas con su rol fundamental: la presentación antigénica a Linfocitos T.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el estado funcional de las DCs en ratones viejos y evaluar su contribución a las alteraciones del sistema inmune durante el envejecimiento

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la capacidad de DCs de ratones viejos para montar una respuesta mediada por Linfocitos T CD8⁺ frente a antígenos exógenos.
2. Evaluar la capacidad de DCs de ratones viejos para capturar, procesar y presentar antígenos exógenos a Linfocitos T CD8⁺.
3. Evaluar la capacidad de DCs de ratones viejos para ser activadas *in vitro* e *in vivo* frente a ligandos de los TLRs.

RESULTADOS

Efecto del envejecimiento sobre la capacidad de las DCs de inducir una respuesta inmune efectora

1. MODELO EXPERIMENTAL DE ENVEJECIMIENTO

El estudio del envejecimiento de seres humanos resulta complicado por diversas razones, como por ejemplo cuestiones éticas según el tipo de estudio a realizar, la larga duración de la vida natural, las influencias ambientales, etc. Además, el estudio del envejecimiento y el sistema inmune en humanos ha dado frecuentemente resultados contradictorios. Una de las mayores fuentes de discrepancia tiene que ver con la elección de los donantes que puedan tener alguna enfermedad de base que influye en la respuesta inmune y de allí, en los resultados de la investigación. Para obtener datos del efecto del envejecimiento sobre el sistema inmune es entonces de gran importancia que el verdadero proceso de envejecimiento esté libre de la influencia de enfermedades y del uso de medicación.

Una característica interesante del envejecimiento en mamíferos es el hecho de que los cambios que ocurren son muy similares entre distintas especies incluso cuando la vida media entre ellas varía considerablemente. Esto ha permitido el trabajo en modelos animales para realizar estudios sobre envejecimiento. Los ratones son bastante similares a los seres humanos en gran parte de su fisiología y función celular, y en menor grado incluso en su anatomía. El sistema musculoesquelético, inmunológico, endócrino y digestivo de los ratones y los seres humanos son similares tanto en función como en arquitectura (155). Además, los ratones son fáciles de manipular y se puede controlar estrictamente la dieta, los antecedentes genéticos, el estado de salud, el medio ambiente.

En nuestro laboratorio utilizamos ratones hembra C57BL/6 de 20 a 22 meses y de 2 a 3 meses de edad como ratones viejos y jóvenes, respectivamente, para poder estudiar el desarrollo espontáneo del envejecimiento “saludable”.

2. INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CITOTÓXICA *IN VIVO*

Como se mencionó previamente en la introducción, es conocido que la presentación cruzada de Ags, puede ser estimulada por ligandos de TLR. Ha sido demostrado que polyU, un ligando de TLR7, es particularmente importante en promover la presentación cruzada de Ags en DCs. Basado en estos antecedentes, en este trabajo de tesis se utilizó polyU, en la mayoría de los experimentos como ligando

de TLR activador de DCs. Cabe destacar que para realizar los distintos ensayos, el polyU fue estabilizado con un lípido policatiónico como el DOTAP de manera de protegerlo de la degradación por ARNasas.

En primer lugar, para determinar si el envejecimiento afectaba una respuesta citotóxica Ag-específica *in vivo*, ratones jóvenes y viejos fueron inmunizados por vía endovenosa con perlas de poliestireno conjugadas a OVA (perlas OVA) como modelo de Ag, junto con polyU/DO. Como controles, se inyectaron grupos adicionales de ratones jóvenes y viejos con solución salina. Siete días posteriores a la inyección, se midieron los niveles de lisis específica en cada animal mediante un ensayo de citotoxicidad *in vivo* (Figura 5). Para ello, los ratones inmunizados fueron inyectados vía endovenosa con una mezcla de esplenocitos provenientes de ratones normales, preincubados con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ y marcados con CFSE a una alta concentración (células blanco) y de esplenocitos preincubados con RPMI, marcados con una baja concentración de CFSE para utilizar como referencia interna (células control). A las 24 horas se recuperaron las células totales de bazo y se analizó por citometría de flujo el porcentaje de lisis específica para cada ratón. Para el cálculo del porcentaje de lisis específica se utilizó la siguiente fórmula: $[(1 - R^{\text{control}}/R^{\text{inmunizado}}) \times 100]$, siendo $R = (\% \text{ células control CFSE}^{\text{low}} / \% \text{ células blanco CFSE}^{\text{high}})$ para cada ratón evaluado.

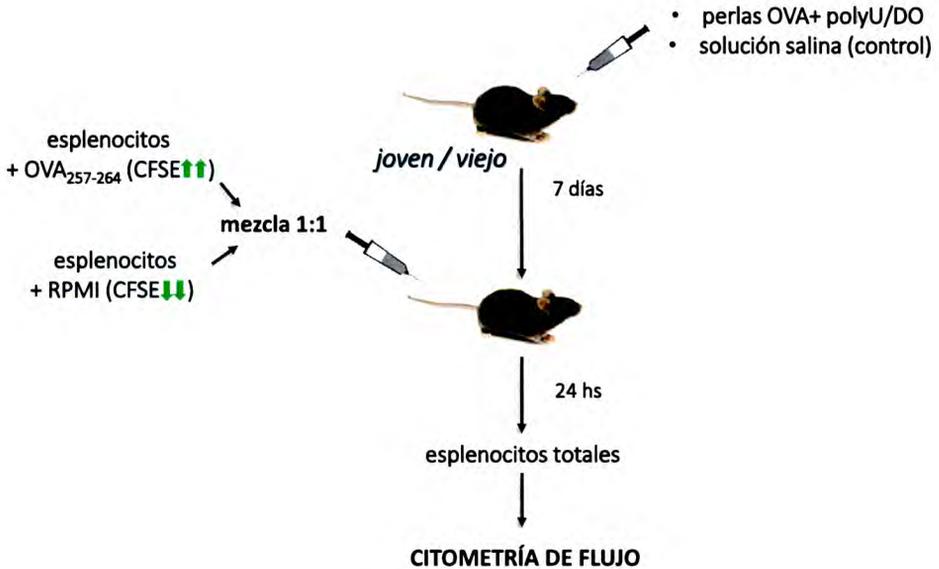


FIGURA 5. Ensayo de citotoxicidad *in vivo*. Ratones C57BL/6 jóvenes y viejos fueron inmunizados con una única inyección endovenosa de $2,5 \times 10^9$ perlas OVA en $100 \mu\text{g}$ polyU/DO. Grupos adicionales de ratones jóvenes y viejos fueron inyectados con solución salina como control. Siete días después se determinaron los niveles de lisis específica en cada animal mediante un ensayo de citotoxicidad *in vivo*.

Los ratones jóvenes inmunizados con perlas OVA + polyU/DO presentaron un alto porcentaje de lisis específica, revelando una fuerte respuesta citotóxica, mientras que la respuesta detectada en ratones viejos fue significativamente menor (Figura 6A-B). Como era de esperarse, no se observó respuesta en los ratones control.

Además, se determinó la secreción de IFN- γ en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos provenientes de los grupos de ratones arriba mencionados, luego de haber sido reestimulados *in vitro* con OVA o con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ por 72 horas. Los esplenocitos de ratones jóvenes inmunizados, secretaron mayores cantidades de IFN- γ en comparación con los de ratones viejos inmunizados (datos no mostrados).

Para determinar si las DCs estaban implicadas en la menor respuesta citotóxica observada en ratones viejos, ratones jóvenes fueron inyectados con DCs purificadas de bazo de ratones jóvenes y viejos preincubadas con OVA + polyU/DO. Se usaron animales jóvenes como receptores de DCs de cada grupo, para así poder excluir el efecto del envejecimiento sobre los linfocitos T CD8⁺. Los ratones control, recibieron DCs sin estímulo. Siete días posteriores a la inyección, se realizó un ensayo de citotoxicidad *in vivo*. Los ratones que recibieron DCs de ratones jóvenes desarrollaron una fuerte y específica respuesta citotóxica contra las células blanco cargadas con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄, mientras que los ratones control no mostraron una respuesta significativa (Figura 6C). En contraste, DCs de ratones viejos estimuladas mostraron una capacidad reducida para inducir una respuesta citotóxica, ya que se observó un bajo porcentaje de lisis específica en comparación con los jóvenes.

En conjunto, estos resultados indicaron que la menor inducción de una respuesta citotóxica efectiva contra OVA en ratones viejos, es el resultado al menos en parte, de una menor capacidad de sus DCs para inducir esta respuesta luego de la inmunización.

3. CAPACIDAD PARA ACTIVAR LINFOCITOS T CD8⁺ VÍRGENES *IN VITRO*

Con el fin de estudiar si la menor capacidad de las DCs de ratones viejos para inducir una respuesta inmune efectora podría deberse a diferencias en la capacidad de inducir la activación de linfocitos T CD8⁺, comparamos la capacidad de DCs de ratones jóvenes y viejos para activar linfocitos T CD8⁺ vírgenes a través de un ensayo de proliferación *in vitro* por dilución de un colorante intracelular, CFSE.

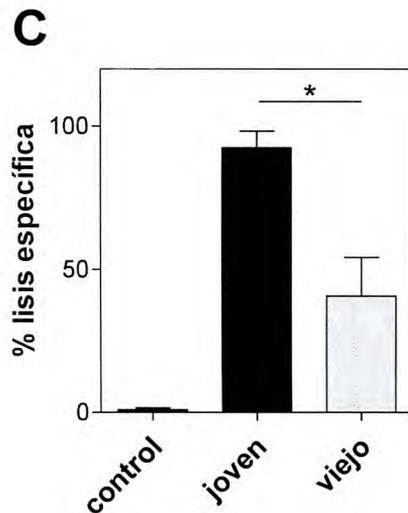
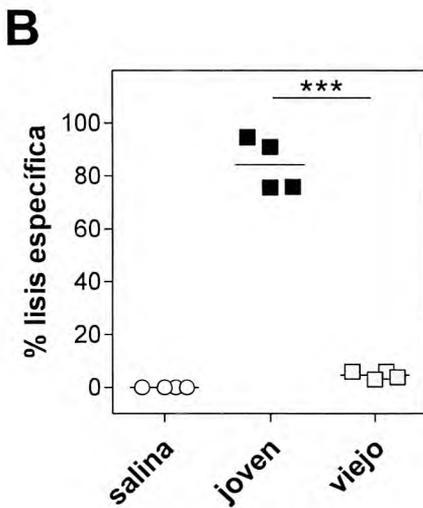
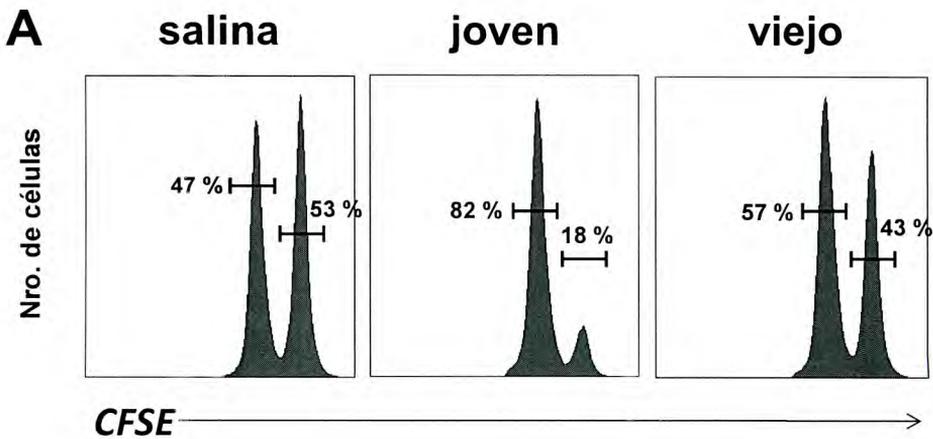


FIGURA 6. Efecto del envejecimiento en la inducción de una respuesta citotóxica. (A, B) Ratones C57BL/6 jóvenes y viejos fueron inmunizados con una única inyección endovenosa de $2,5 \times 10^9$ perlas OVA en $100 \mu\text{g}$ polyU/DO. Grupos adicionales de ratones jóvenes y viejos fueron inyectados con solución salina como control. Siete días después se determinaron los niveles de lisis específica en cada animal mediante un ensayo de citotoxicidad *in vivo*. **(A)** Histogramas representativos de células CFSE^{low} y CFSE^{high} de ratones control e inmunizados. **(B)** Porcentaje de lisis específica observado para cada ratón individual. **(C)** DCs purificadas de bazo de ratones C57BL/6 jóvenes y viejos fueron incubadas con 20mg/ml OVA en $20 \mu\text{g/ml}$ polyU/DO, o con RPMI únicamente (control) por 90 minutos, luego fueron lavadas 2 veces. Un millón de DCs de cada grupo fueron inyectadas vía endovenosa en ratones jóvenes C57BL/6. Siete días después se determinó la respuesta citotóxica *in vivo*. En todos los casos, los controles jóvenes y viejos arrojaron similares resultados, por lo que sólo se graficó el resultado de ratones jóvenes control. Se muestra el porcentaje de lisis específica expresado como la media \pm SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes (4 ratones/grupo etario/experimento).

El CFSE es un reactivo ampliamente utilizado para el análisis de proliferación celular. Éste difunde libremente al interior celular, y no es fluorescente hasta que sus grupos acetato son procesados por esterasas intracelulares para formar un fluoróforo de alta intensidad. El CFSE (ya fluorescente) se une de forma espontánea e irreversible tanto a proteínas intracelulares como de la superficie, a través de una reacción con las cadenas laterales de lisina y otros grupos aminos disponibles. Cuando la célula se divide, este marcaje se distribuye de forma equitativa entre las células hijas, de modo que la intensidad de fluorescencia decae a la mitad con respecto a la célula que le dio origen. Como resultado, cada generación queda marcada con una fluorescencia concreta dentro de una población de células en constante proliferación que puede ser monitoreada por citometría de flujo.

Para llevar a cabo este ensayo, se obtuvieron DCs de bazo de ratones jóvenes y viejos mediante un enriquecimiento de la población CD11c⁺ utilizando anticuerpos unidos a perlas magnéticas. Luego, las DCs fueron preincubadas con OVA + polyU/DO, posteriormente lavadas y cocultivadas durante 3 días con linfocitos T CD8⁺ marcados con CFSE purificados de bazo de ratones jóvenes OT-I. Los ratones OT-I poseen la mayoría de sus células T CD8⁺, con un TCR transgénico que reconoce los residuos de OVA₂₅₇₋₂₆₄ en el contexto de MHC clase I. Los linfocitos T CD8⁺, con un 98 % de pureza, fueron purificados de ratones jóvenes OT-I para así poder analizar estrictamente el efecto del envejecimiento en DCs, sin ser afectado el experimento por la capacidad limitada de linfocitos T de ratones viejos para activarse y proliferar. Finalizado el tiempo de cultivo, se recogieron las células totales y por citometría de flujo fue determinada la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ a través de la dilución del contenido de CFSE en células CD3⁺ 7-AAD⁻. En las mismas células se midió también por citometría de flujo, la expresión de la cadena alfa del receptor de IL-2 (CD25) como otro indicador de activación celular. A todas las muestras se les agregó 7-AAD antes de realizar la citometría de flujo, para descartar las células muertas durante el análisis. Conjuntamente se recolectaron los sobrenadantes de cultivo para evaluar por ELISA la secreción de IFN- γ , citoquina secretada por linfocitos T CD8⁺ activados.

En presencia de DCs de ratones jóvenes estimuladas, un alto porcentaje de células T CD8⁺ proliferaron (Figura 7A-B) y aumentaron la expresión de CD25 (Figura 7C) a diferentes relaciones DC: célula T. En contraste, células T CD8⁺ incubadas con DCs de ratones viejos estimuladas, proliferaron pobremente y fallaron en incrementar la expresión de CD25. Por lo tanto, DCs de ratones viejos fueron menos eficientes en inducir la proliferación de linfocitos T CD8⁺ en comparación con las DCs de ratones jóvenes. Linfocitos T CD8⁺ cultivados con DCs de ratones jóvenes o viejos incubadas con RPMI solamente (control), no proliferaron. Para evaluar otro parámetro de activación celular, se determinó la habilidad

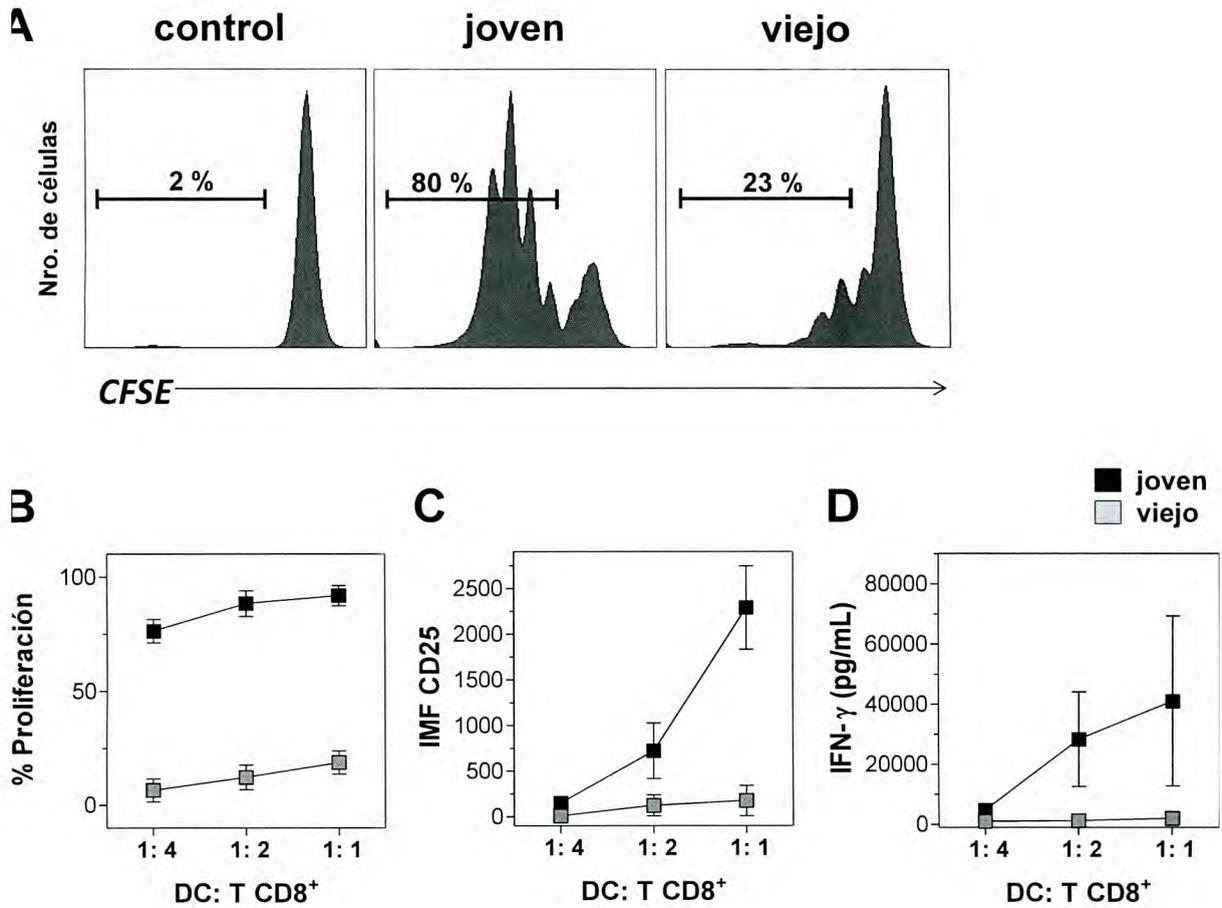


FIGURA 7. DCs de ratones viejos son poco eficientes en activar linfocitos T CD8⁺ vírgenes *in vitro*. DCs purificadas de ratones jóvenes y viejos fueron incubadas con 1mg/ml de OVA + 20 μ g/ml polyU/DO por 90 minutos. Grupos adicionales de DCs de ratones jóvenes y viejos fueron incubados con RPMI como control. Las DCs fueron lavadas y co-incubadas durante 3 días con linfocitos T CD8⁺ marcados con CFSE, aislados de bazo de ratones OT-I. La activación se midió como proliferación de linfocitos y su expresión de CD25 por citometría de flujo, así como su secreción de IFN- γ por ELISA. Se indica la relación DC: T CD8⁺ utilizada en cada punto. **(A)** Histogramas representativos de proliferación de células T CD8⁺ para una relación 1:1. Control joven y viejo mostraron resultados similares por lo que sólo se grafica el resultado de control joven **(B)** Porcentaje de proliferación de células T CD8⁺, **(C)** expresión de CD25 y **(D)** niveles de IFN- γ en sobrenadantes de cultivo de células OT-I cultivadas con DCs. Se muestran los datos como la media \pm SEM. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes. (2 ratones/grupo etario/experimento).

de células T para diferenciarse y secretar IFN- γ luego de la incubación con DCs estimuladas. Linfocitos T CD8⁺ cultivados con DCs de ratones jóvenes estimuladas, secretaron altos niveles de IFN- γ , mientras que aquellos cultivados con DCs de ratones viejos estimuladas secretaron bajos o indetectables niveles (Figura 7D). Linfocitos T CD8⁺ cultivados con DCs incubadas con RPMI solamente, no fueron capaces de secretar niveles detectables de IFN- γ ni expresar de CD25 (datos no mostrados).

Estos resultados demuestran claramente, que *in vitro*, DCs de ratones viejos son menos eficientes para activar linfocitos T CD8⁺ vírgenes, que DCs de ratones jóvenes.

4. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE DCs EN RATONES JÓVENES Y VIEJOS

Dentro de las distintas subpoblaciones de DCs presentes en bazo, es conocido que la cDC CD8 α^+ , es la principal CPA que activa linfocitos T CD8⁺ y la más eficiente en realizar presentación cruzada de Ags (50). Como en los experimentos anteriores se utilizaron DCs convencionales totales de bazo (CD11c^{high}), el siguiente objetivo fue evaluar el contenido y distribución de las subpoblaciones presentes en bazo de ratones jóvenes y viejos, ya que una menor proporción de las cDC CD8 α^+ podría ser causa de la menor inducción de la respuesta T CD8⁺ efectora previamente encontrada.

Una vez removidos los bazos, se encontró por citometría de flujo, una reducción significativa de cDCs CD8 α^+ en bazo de ratones viejos en comparación con los jóvenes, tanto en su número absoluto como en porcentaje (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de subpoblaciones de DCs en bazo de ratones jóvenes y viejos

Tipo DC	Porcentaje		Número Absoluto x 10 ⁶	
	joven	viejo	joven	viejo
cDC CD8 α^+	0,65 \pm 0,09	0,25 \pm 0,03 **	0,7 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1 **
cDC CD8 α^-	1,3 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1 ns	1,4 \pm 0,2	1,1 \pm 0,2 ns
pDC	0,29 \pm 0,03	0,18 \pm 0,01 *	0,33 \pm 0,04	0,22 \pm 0,02 ns

Porcentaje y número absoluto de cDC CD8 α^+ (CD11c^{high} CD8 α^+), cDC CD8 α^- (CD11c^{high} CD8 α^-) y pDC (CD11c^{low} B220⁺ PDCA1⁺) presentes en bazo de ratones C57BL/6 jóvenes y viejos. Los valores se expresan como la media \pm SEM. *p < 0,05; **p < 0,01; ns (diferencia no significativa). Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes (4 ratones/grupo etario/experimento).

A diferencia de la población cDC CD8 α^+ , el número absoluto y el porcentaje de las cDC CD8 α^- no mostraron diferencias significativas entre jóvenes y viejos. El porcentaje pero no el número absoluto de pDCs presentes en bazo de ratones viejos fue menor que en los jóvenes.

Además, comparamos el contenido de DCs convencionales totales (CD11c^{high}) en distintos tejidos de ratones C57BL/6 jóvenes y viejos. Bazo, médula ósea, hígado y ganglios mesentéricos y poplíteos fueron removidos de ratones jóvenes y viejos vírgenes, posteriormente se evaluó el contenido relativo de DCs convencionales por citometría de flujo. El porcentaje de DCs en bazo de ratones viejos fue significativamente menor que en los jóvenes (Figura 8A). Sin embargo, no se encontraron diferencias en el número absoluto. Resultados similares fueron hallados en ratones Balb/c (datos no mostrados). En contraste, en la médula ósea de ratones viejos se observó una mayor proporción de DCs que en los jóvenes (Figura 8B). No se encontraron diferencias en DCs de hígado, ganglios mesentéricos y poplíteos de ratones jóvenes y viejos (Figura 8B).

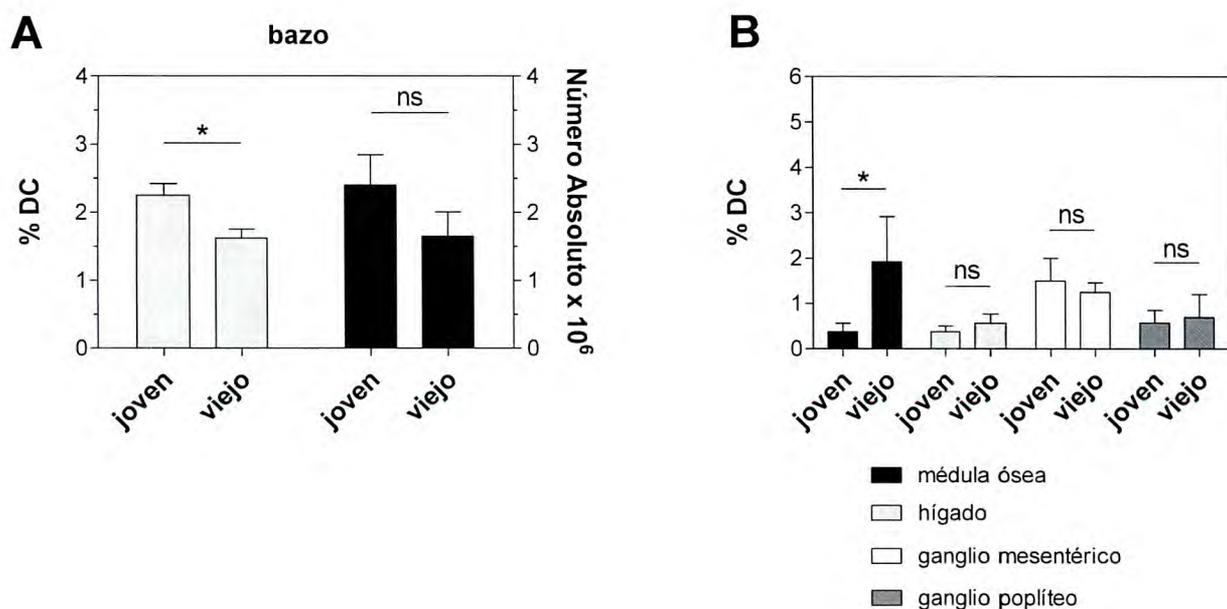


FIGURA 8. Contenido de DCs en ratones viejos. Bazo, médula ósea, hígado, ganglios poplíteos y mesentéricos, de ratones vírgenes jóvenes y viejos, fueron removidos para la obtención de suspensiones celulares que fueron marcadas para detectar DCs por citometría de flujo. **(A)** Porcentaje y número de células DCs CD11c^{high} en bazo de ratones jóvenes y viejos. **(B)** Porcentaje de DCs CD11c^{high} en médula ósea, hígado, ganglios mesentéricos y poplíteos de ratones jóvenes y viejos. Los datos se expresan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns (diferencia no significativa). Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes (4 ratones/grupo etario/experimento).

5. EL ENVEJECIMIENTO AFECTA LA CAPACIDAD DE LAS cDCs CD8 α ⁺ PARA ACTIVAR LINFOCITOS T CD8⁺ VÍRGENES *IN VITRO*

Debido al defecto cuantitativo hallado en la subpoblación de cDCs CD8 α ⁺ en bazo de ratones viejos, comparamos la capacidad de cDCs CD8 α ⁺ de ratones jóvenes y viejos para activar linfocitos T CD8⁺ vírgenes a través del mismo ensayo de proliferación *in vitro* utilizado anteriormente en el inciso 3. Se obtuvieron cDCs CD8 α ⁺ de bazo de ratones jóvenes y viejos mediante un enriquecimiento de la población CD11c⁺ utilizando anticuerpos unidos a perlas magnéticas y posteriormente fueron purificadas por FACS (ver materiales y métodos). Una vez obtenidas fueron preincubadas con OVA + polyU/DO, luego lavadas y cocultivadas durante 3 días con linfocitos T CD8⁺ marcados con CFSE purificados de bazo de ratones jóvenes OT-I. Finalizado el tiempo de cultivo, se recogieron las células totales y por citometría de flujo fue determinada la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ a través de la dilución del contenido de CFSE en células CD3⁺ 7-AAD⁻. A todas las muestras se les agregó 7-AAD antes de realizar la citometría de flujo, para descartar las células muertas durante el análisis.

En presencia de cDCs CD8 α ⁺ de ratones jóvenes estimuladas, un alto porcentaje de células T CD8⁺ proliferaron (Figura 9A-B) a diferentes relaciones DC: célula T. En contraste, las cDCs CD8 α ⁺ de ratones viejos estimuladas indujeron la proliferación de un menor porcentaje de células T CD8⁺. Linfocitos T CD8⁺ cultivados con cDCs CD8 α ⁺ de ratones jóvenes o viejos incubadas con RPMI solamente (control), no proliferaron.

6. CONCLUSIONES CAPÍTULO 1

Los resultados mostrados en este capítulo nos permiten concluir que utilizando OVA como modelo de Ag y polyU como adyuvante, DCs de bazo de ratones viejos tienen una reducida capacidad para montar una respuesta citotóxica Ag específica *in vivo*, en comparación con las DCs de bazo de ratones jóvenes.

Además se observó que frente al mismo estímulo, DCs de bazo de ratones viejos activan pobremente linfocitos T CD8⁺ vírgenes *in vitro*.

Por último, se observó una significativa alteración en la proporción de las subpoblaciones de DCs presentes en bazo de ratones viejos, en comparación con los jóvenes. Para destacar, además de su reducción en número absoluto y porcentaje en bazo de ratones viejos, la población de cDCs CD8 α ⁺ presentó defectos funcionales para activar linfocitos T CD8⁺ vírgenes *in vitro*, en comparación con las cDCs CD8 α ⁺ de ratones jóvenes.

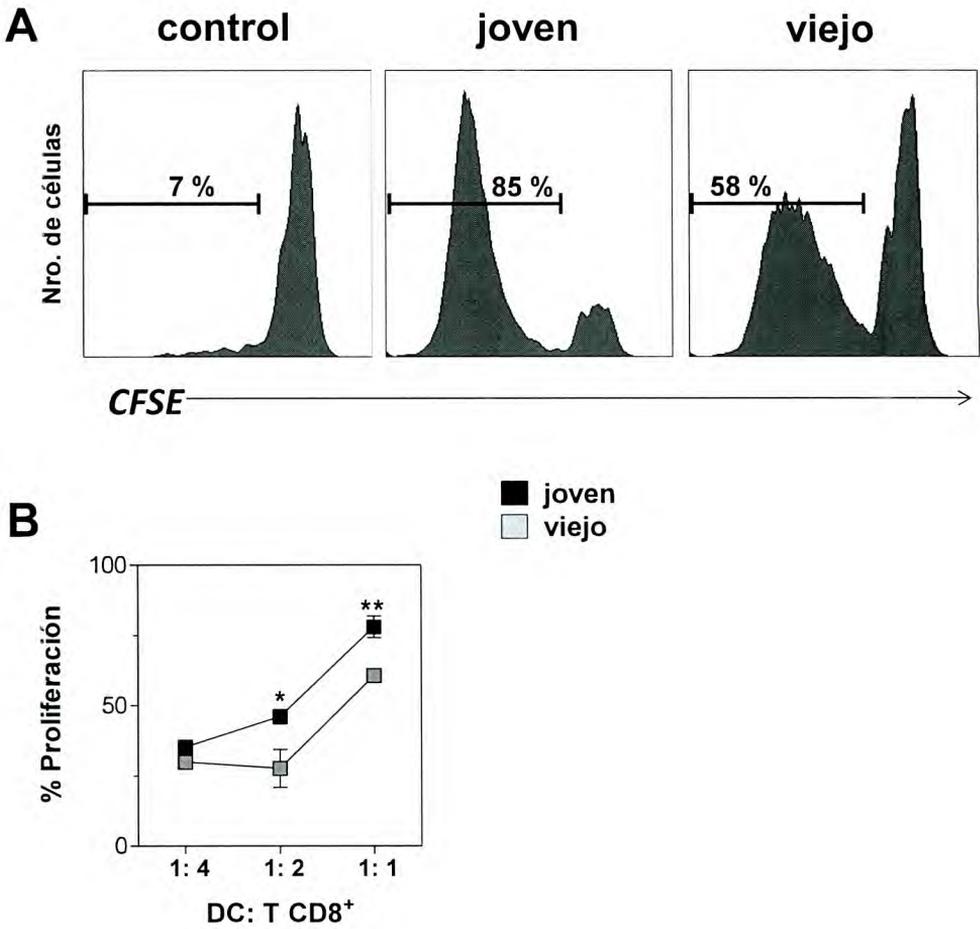


FIGURA 9. cDCs CD8 α^+ de ratones viejos inducen menor activación de linfocitos T CD8 $^+$ vírgenes *in vitro*. cDCs CD8 α^+ purificadas de ratones jóvenes y viejos fueron incubadas con 1mg/ml de OVA + 20 μ g/ml polyU/DO por 90 minutos. Grupos adicionales de DCs de ratones jóvenes y viejos fueron incubados con RPMI como control. Las DCs fueron lavadas y co-incubadas durante 3 días con linfocitos T CD8 $^+$ marcados con CFSE, aislados de bazo de ratones OT-I. La activación se midió como proliferación de linfocitos por citometría de flujo. **(A)** Histogramas representativos de proliferación de células T CD8 $^+$ para una relación DC: T CD8 $^+$ 1:1. Control joven y viejo mostraron resultados similares por lo que sólo se grafica el resultado de control joven **(B)** Porcentaje de proliferación de células T CD8 $^+$. Se indica la relación DC: T CD8 $^+$ utilizada en cada punto. Se muestran los datos como la media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes. (4 ratones/grupo etario/experimento).

CAPÍTULO 2

La maquinaria de procesamiento antigénico de DCs se altera con el envejecimiento

1. DETERMINACIÓN DE LA PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA EN MHC CLASE I

Las DCs tienen la habilidad de capturar Ags exógenos, procesarlos en péptidos de 8-9 aminoácidos de largo para ser presentados en moléculas de MHC clase I, y además proveer las señales coestimulatorias y citoquinas necesarias para la activación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes. Este proceso se denomina presentación cruzada de Ags, y es crucial para la generación de respuestas de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) contra Ags derivados de patógenos intracelulares o células tumorales.

Para la activación de los linfocitos T CD8⁺, es necesario que los complejos MHC I/péptido, sean presentados en la superficie de la DC. Es posible determinar de manera indirecta la capacidad de las DCs de presentar los complejos H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ sobre su superficie, utilizando un hibridoma B3Z de linfocitos T CD8⁺ que expresan un TCR específico que reconoce el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ asociado a la molécula K^b del MHC clase I. El hibridoma B3Z posee un plásmido conteniendo la secuencia de la enzima β-Galactosidasa bajo el control del promotor de la IL-2. Cuando el hibridoma recibe la señal antigénica a través de su TCR, se activa la expresión del gen de IL-2 y, paralelamente, el gen de β-Galactosidasa. La expresión de β-Galactosidasa puede luego ser determinada por una reacción colorimétrica, y es un índice de activación del hibridoma frente al complejo H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄. Las células del hibridoma B3Z no son linfocitos vírgenes y se encuentran en constante proliferación espontánea, por lo que no requieren señales coestimulatorias para su activación.

En primer lugar, se evaluó la habilidad de las DCs de ratones viejos para presentar Ags a linfocitos T CD8⁺ en condiciones *ex vivo*. Con este propósito, ratones jóvenes y viejos fueron inyectados por vía endovenosa con perlas OVA y 90 minutos después se purificaron las DCs y se incubaron con el hibridoma B3Z. La presencia de los complejos H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ en DCs fue monitoreada a través de la activación del hibridoma B3Z, por medio de una reacción colorimétrica (ver Materiales y Métodos). Se encontró que las DCs purificadas de bazo de ratones jóvenes activaron eficientemente el hibridoma. La activación del hibridoma fue mayor mientras mayor número de DCs se utilizaron (Figura 10A). En cambio, las DCs de ratones viejos fueron poco eficientes en activar el hibridoma, sólo lo hicieron con la más alta cantidad de DCs utilizadas (Figura 10A).

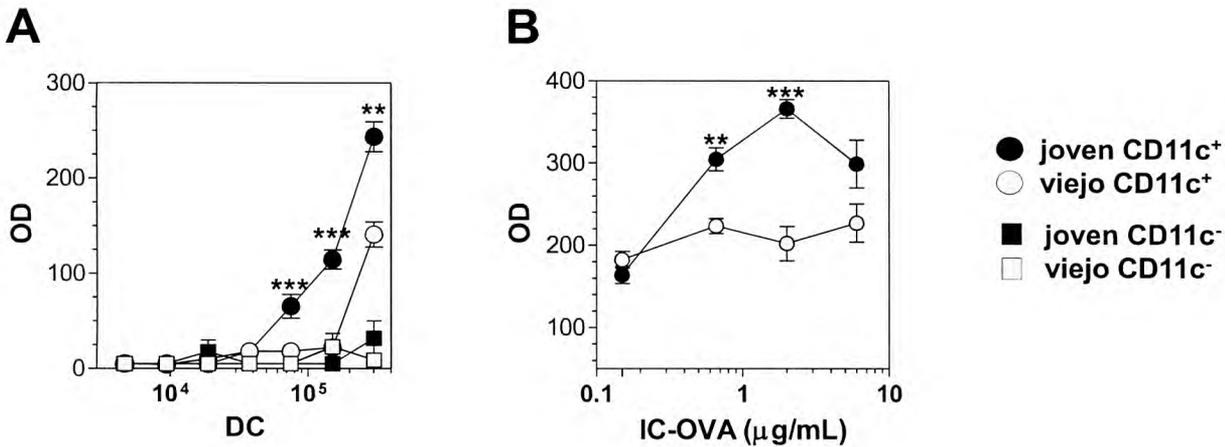


FIGURA 10. La presentación de OVA en MHC clase I se encuentra afectada en DCs de ratones viejos. (A) Ensayo de presentación *ex vivo*. Perlas OVA fueron inyectadas vía endovenosa en ratones jóvenes y viejos. 90 minutos después las DCs fueron purificadas e incubadas toda la noche con el hibridoma B3Z. Como control se utilizaron células CD11c⁻ de ratones jóvenes y viejos. La activación de las células B3Z se grafica frente a distintos números de DCs utilizados y fue monitoreada por la actividad de β-galactosidasa a través de un test colorimétrico con 0,15 mM clorofenol rojo-β-D-galactopiranosido (CPRG) como sustrato, expresado como densidad óptica (OD) a λ=595. **(B)** Ensayo de presentación *in vitro*. DCs purificadas de bazo de ratones jóvenes y viejos fueron incubadas con distintas concentraciones de OVA formando IC-OVA por 4 horas y luego fueron lavadas e incubadas con células B3Z toda la noche. Se grafica la actividad de β-galactosidasa frente a distintas concentraciones de OVA formando IC-OVA. Se muestran los datos como la media ± SEM. **p < 0,01; ***p < 0,001. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes. (4 ratones/grupo etario/experimento).

Las fracciones de células CD11c⁻ de ambos ratones joven y viejo, incubadas en las mismas condiciones, fueron incapaces de activar el hibridoma B3Z, lo cual indica que en los ratones viejos ninguna otra población estaría compensando la deficiencia de la DC como CPA.

Luego se realizó el ensayo *in vitro* para probar la habilidad intrínseca de la DC para llevar a cabo la presentación antigénica en MHC clase I. DCs de ratones jóvenes y viejos fueron incubadas con distintas concentraciones de OVA formando inmunocomplejos (IC-OVA) durante 4 horas a 37°C para permitir su internalización y procesamiento. Luego las células fueron lavadas y enfrentadas al hibridoma. Las DCs de ratones jóvenes presentaron de manera eficiente el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ a las células B3Z, mientras que la presentación por parte de las DCs de ratones viejos fue menor (Figura 10B). Como control positivo de los experimentos, se utilizó como Ag el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄, que se une a H-2K^b con alta afinidad sin necesidad de ningún procesamiento o digestión previa, y se observó la correcta activación del hibridoma (datos no mostrados).

2. COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD PARA CAPTURAR ANTÍGENOS

El procesamiento de Ags exógenos para su presentación a linfocitos T CD8⁺, se inicia con la captura de Ags por las DCs a través de mecanismos de fagocitosis, endocitosis mediada por receptor y/o micropinocitosis.

Para evaluar si en las DCs de ratones viejos existe una alteración en la capacidad de captura de Ags que pudiera explicar el defecto observado en la presentación antigénica, se evaluó el efecto del envejecimiento en la capacidad para capturar Ags *in vitro* utilizando OVA soluble conjugada a FITC (OVA-FITC), u OVA-FITC formando inmunocomplejos con un anticuerpo anti-OVA (IC-OVA-FITC) como modelo de endocitosis mediada por receptores Fc. En primer lugar, esplenocitos de ratones jóvenes y viejos fueron incubados con distintas concentraciones de OVA-FITC. Posteriormente, las células fueron lavadas y marcadas con anticuerpo anti-CD11c para su análisis por citometría de flujo. La captura de OVA-FITC fue igualmente eficiente en DCs de ratones jóvenes y viejos, ya que no se observaron diferencias en la intensidad media de fluorescencia (IMF) leída en el canal FITC (Figura 11A) ni en el porcentaje de DCs OVA-FITC⁺ (Figura 11B). Resultados similares se observaron con esplenocitos incubados con IC-OVA-FITC (Figura 11C y D). Para descartar diferencias que pudieran existir en el pH fagosomal entre DCs de ratones jóvenes y viejos, los mismos experimentos fueron repetidos empleando OVA conjugada a Alexa Fluor 647, un fluorocromo insensible al pH. Pero nuevamente, no se encontraron diferencias en la captura de Ags entre DCs de ratones jóvenes y viejos (datos no mostrados).

Las DCs endocitan Ags solubles a través de 2 mecanismos distintos, por macropinocitosis o por endocitosis mediada por clatrina. La endocitosis mediada por clatrina en DCs incluye la endocitosis de receptores, como la del receptor Fc, receptor de transferrina, receptor de manosa (CD206), DEC 205 (CD205) y DC-SIGN. Se ha visto que en DCs, la endocitosis de OVA es realizada predominantemente por CD206. Sin embargo, en este trabajo no se encontraron diferencias en la expresión del receptor CD206 entre DCs de ratones jóvenes y viejos (Figura 12A). Al determinar la expresión de FcγRII/III (CD32/CD16), el cual captura IC, se encontró una menor expresión en DCs de ratones viejos en comparación con las DCs de ratones jóvenes (Figura 12B).

Al mismo tiempo, las DCs pueden fagocitar Ags particulados, como las perlas OVA de poliestireno, utilizadas en uno de los experimentos de citotoxicidad (Figura 6A-B) y en uno de los ensayos de presentación antigénica (Figura 10B). Por ello, también se analizó la capacidad de capturar Ags *in vivo* a través de la captura de perlas de poliestireno acopladas al fluorocromo Yellow Green (perlas YG). Ratones jóvenes y viejos fueron inyectados vía endovenosa con perlas YG. Se encontró que el porcentaje

de DCs YG⁺ en bazo de ratones viejos fue la mitad aproximadamente del observado en jóvenes, lo que indicaría que *in vivo* hay menos DCs capaces de capturar Ags particulados (Figura 13A). Esto podría explicar en parte la menor presentación antigénica observada en el ensayo *ex vivo* de la Figura 10B. En la figura 13B se muestra un histograma representativo de DCs que capturan perlas YG. Cuando se analizó la cantidad de células totales presentes en bazo que capturaron perlas YG también se observó un menor porcentaje de esplenocitos YG⁺ en el bazo de ratones viejos (Figura 13C).

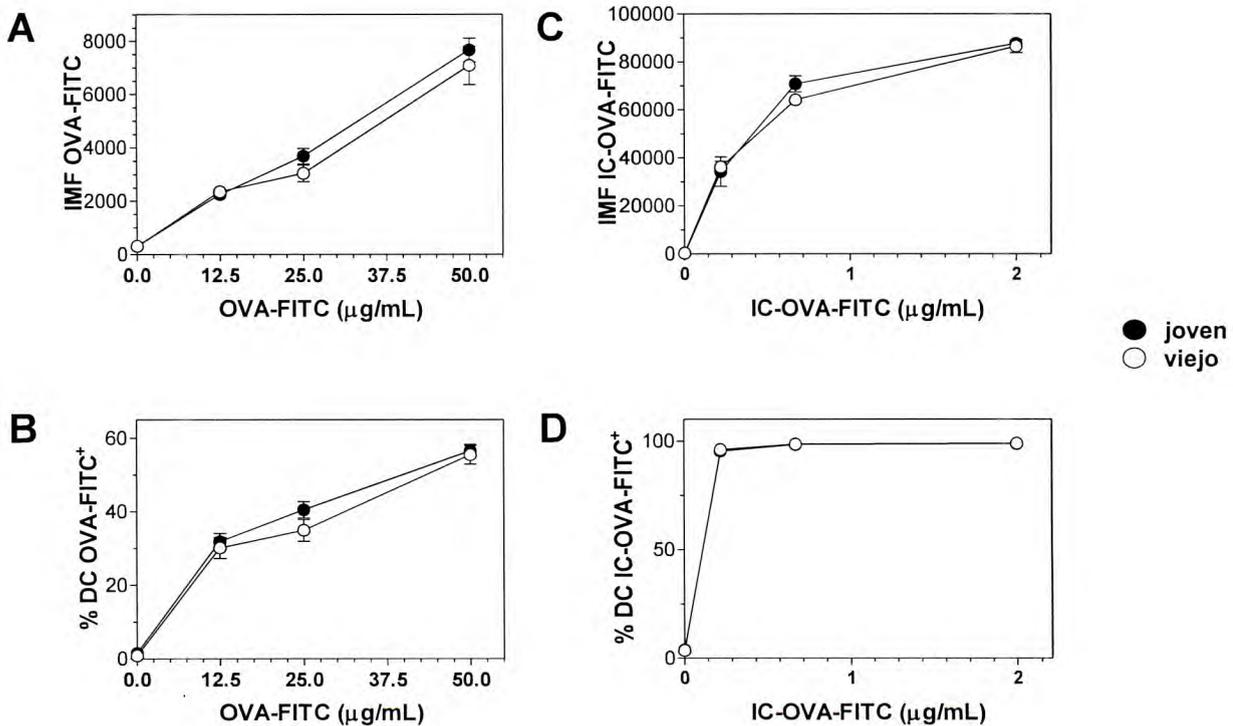


FIGURA 11. El envejecimiento no afecta la capacidad de DCs para endocitar antígenos *in vitro*. Esplenocitos de ratones jóvenes y viejos fueron tratados con colagenasa/DNAsa I e incubados 90 minutos a 37°C con OVA-FITC (A) y (B) o IC-OVA-FITC (C) y (D). Luego las células fueron lavadas y marcadas con anticuerpo anti-CD11c para su análisis por citometría de flujo. Los resultados se expresan como la media ± SEM de las IMF del canal FITC analizando la región de DCs CD11c^{high} (A) y (C) y como el porcentaje de DC OVA-FITC⁺ (B) y DC IC-OVA-FITC⁺ (D). Resultados representativos de al menos 2 experimentos independientes (4 ratones/grupo etario/experimento).

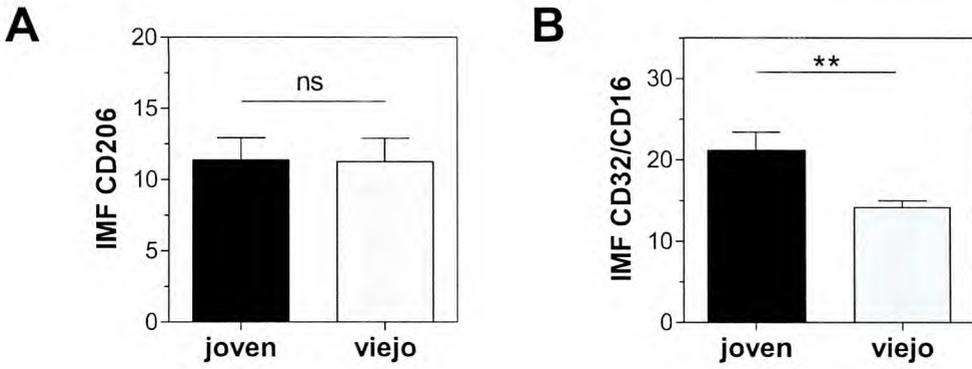


FIGURA 12. Expresión de receptores involucrados en la captura de antígenos. Esplenocitos de ratones jóvenes y viejos fueron tratados con colagenasa/DNasa I y marcados con anticuerpos anti-CD206 (A) o anti-CD32/CD16 (B) para análisis por citometría de flujo. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de la IMF analizando la región de DCs CD11c^{high}. ** $p < 0,01$; ns (diferencia no significativa). Resultados representativos de 2 experimentos independientes (4 ratones/grupo etario/experimento).

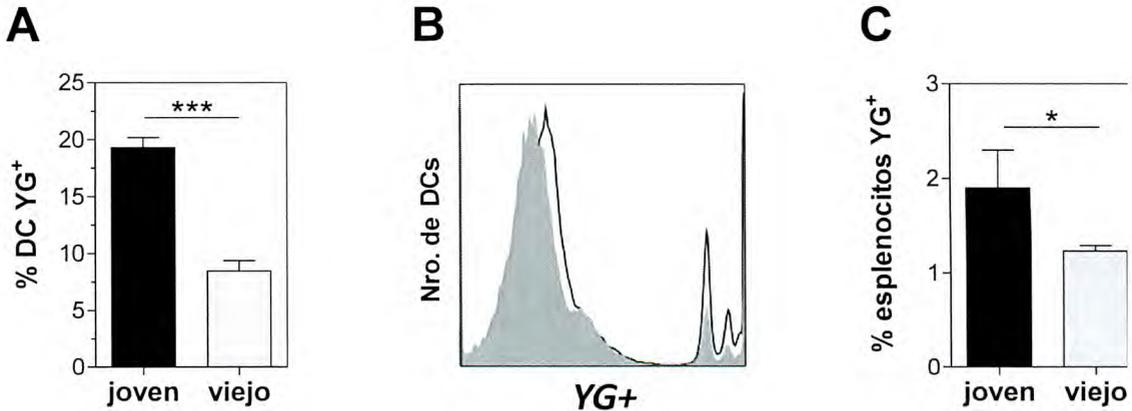


FIGURA 13. Ensayo de captura *in vivo*. Ratones jóvenes y viejos fueron inyectados con $2,5 \times 10^9$ perlas YG por vía endovenosa. Dos horas después, los esplenocitos fueron obtenidos y tratados con colagenasa/DNasa I. Posteriormente las células fueron incubadas con anticuerpo anti-CD11c para análisis por citometría de flujo. (A) Porcentaje de DC YG⁺ expresado como la media \pm SEM. (B) Se muestra un histograma representativo de DCs de ratones jóvenes (histograma vacío) y viejos (histograma lleno) que capturaron perlas YG. (C) Porcentaje de esplenocitos YG⁺ expresado como la media \pm SEM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes (3-4 ratones/grupo etario/experimento).

3. EL ENVEJECIMIENTO AFECTA LA CAPACIDAD DEGRADATIVA DE OVA MEDIADA POR DCs

Debido a que las DCs de ratones viejos pudieron capturar OVA *in vitro* de manera eficiente (Figura 11), pero la presentación a linfocitos T CD8⁺ *in vitro* fue menor que en los jóvenes (Figura 10), el siguiente paso fue evaluar la degradación intracelular de OVA como Ag. Para ello se determinó por Western Blot la persistencia de OVA en lisados de DCs a distintos tiempos. DCs de bazo de ratones jóvenes y viejos, fueron pulsadas con OVA + polyU/DO durante 60 minutos, luego de varios lavados se incubaron libres de Ag por 0 y 4 horas. En la Figura 14A, se observa que luego de 60 minutos de pulso (0 horas), los lisados de DCs de ambos grupos de ratones mostraron una banda similar de 45 kDa correspondiente a OVA. Cuatro horas después, la banda de OVA desapareció casi por completo en los lisados de DCs de ratones jóvenes, mientras que los lisados de DCs de ratones viejos mostraron una banda de OVA persistente. Esto indicaría, como se muestra en el análisis densitométrico de la Figura 14B, que las DCs de ratones viejos no pudieron degradar completamente la OVA en los tiempos estudiados, sugiriendo una menor habilidad para procesar Ags exógenos.

4. CONCLUSIONES CAPÍTULO 2

En este capítulo se analizaron algunos de los cambios funcionales en los mecanismos de presentación antigénica afectados por el envejecimiento en DCs. Dichos cambios afectarían la así llamada señal 1, que reciben los linfocitos T para activarse.

Cuando se analizó la presencia de los complejos H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄, se observó que las DCs de ratones viejos poseen una menor capacidad de presentación antigénica evaluado por una menor capacidad para activar un hibridoma de linfocitos T CD8⁺ tanto *ex vivo* como *in vitro* con Ags exógenos. Este defecto podría ser causado en parte, por una menor capacidad de las DCs de ratones viejos para degradar Ags, como fue observado al comparar la degradación de OVA por DCs de ratones jóvenes y viejos.

In vitro, la capacidad de capturar Ags exógenos solubles o en forma de inmunocomplejos no se vio afectada en las DCs ratones viejos. Se encontró una expresión similar del receptor CD206 en DCs de ratones jóvenes y viejos, sin embargo la expresión del receptor Fc a través del cual la DC captura IC-OVA, fue menor en DCs de ratones viejos.

La captura de Ags particulados *in vivo* fue menor por parte de DCs de ratones viejos, como también por parte del total de células presentes en el bazo de ratones viejos.

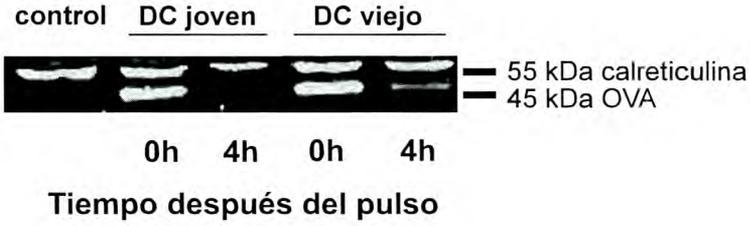
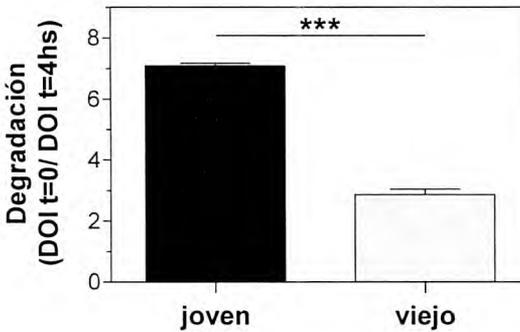
A**B**

FIGURA 14. Menor degradación de OVA por DCs durante el envejecimiento. (A) Persistencia de la proteína OVA en lisados celulares de DCs purificadas de bazo de ratones jóvenes y viejos determinada por Western Blot luego de 1 hora de pulso (tiempo 0, 0h) y 4 horas de incubación con RPMI sin OVA (4h). Como control de carga se utilizó calreticulina. Se muestra una banda control correspondiente a lisados de DCs sin estímulo. **(B)** Análisis densitométrico expresado como densidad óptica integrada (DOI) a tiempo 0 en relación a DOI a tiempo de incubación. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de cultivos por duplicado y son representativos de 2 experimentos independientes. *** $p < 0,001$.

CAPÍTULO 3

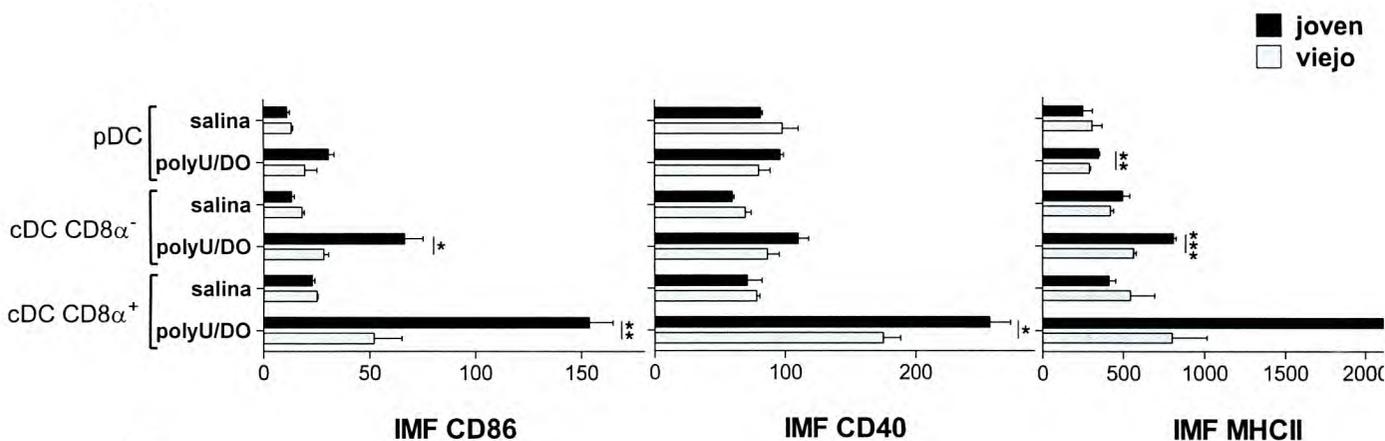
El envejecimiento disminuye la activación de DCs frente a ligandos TLR

1. MADURACIÓN DCs *IN VITRO* E *IN VIVO* FRENTE A polyU/DO

Para que una respuesta inmune pueda iniciarse de manera apropiada, el estado de activación de la DC resulta de gran importancia, ya que según el microambiente local y el estímulo madurativo que reciba, una DC inducirá inmunidad o tolerancia (40). Defectos en la capacidad de las DCs para ser activadas, podrían explicar la menor activación de linfocitos T CD8⁺ efectores inducida por DCs de bazo de ratones viejos. Para comparar la habilidad de DCs de ratones jóvenes y viejos para ser activadas frente a polyU/DO, se estudió por citometría de flujo, el aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras en las distintas subpoblaciones de DCs presentes en bazo, frente al estímulo con polyU/DO. Como se muestra en la Figura 15A, luego de 18 horas de una inyección intravenosa con polyU/DO, se observó un aumento en la expresión de las moléculas CD86, CD40 y MHC clase II en DCs convencionales (cDCs) de ratones jóvenes, mientras que las pDC de ratones jóvenes sólo mostraron un modesto incremento de CD86. Si bien en los ratones viejos inyectados con polyU/DO, las cDCs CD8 α exhibieron un leve aumento en la expresión de CD86 y MHC clase II, esta expresión fue significativamente más baja respecto a la expresión observada en su contraparte joven. Las pDC de ratones viejos no aumentaron la expresión de ninguna molécula frente al estímulo con polyU/DO. Para remarcar, las cDCs CD8 α ⁺ de los ratones viejos inyectados con polyU/DO exhibieron un aumento en la expresión de CD86, CD40 y MHC clase II, sin embargo esta expresión fue significativamente más baja respecto a la expresión observada en su contraparte joven. En los controles inyectados con solución salina, la expresión de ninguna de las moléculas estudiadas fue significativamente diferente entre DCs de ratones jóvenes y viejos control. Además, se analizó la expresión de una molécula implicada en la inhibición de la respuesta T, PDL1, frente a las mismas condiciones. Luego de 18 horas de una inyección intravenosa con polyU/DO, se observó un aumento en la expresión de PDL1 en las subpoblaciones de DCs de ratones jóvenes (Figura 15B). Si bien en los ratones viejos inyectados con polyU/DO, aumentó la expresión de PDL1 en las distintas poblaciones, esta expresión en pDC y cDCs CD8 α ⁺ fue significativamente más baja respecto a la observada en su contraparte joven. En los controles inyectados con solución salina, la expresión de PDL1 fue similar en las poblaciones de DCs de ratones jóvenes y viejos.

Por otro lado, se realizó un ensayo de maduración de DCs *in vitro*, para evaluar la secreción de citoquinas por ELISA. DCs purificadas de bazo de ratones jóvenes y viejos fueron estimuladas con polyU/DO por 24 horas. En los sobrenadantes de DCs de ratones viejos estimuladas, se observó menor cantidad de TNF- α , IL-6, IL-12p40 e IL-12p70 y mayor contenido de IL-10, respecto a los sobrenadantes de DCs de ratones jóvenes (Figura 16A). Notablemente, se observaron niveles levemente incrementados de IL-6 en sobrenadantes de cultivo de DCs de ratones viejos no estimuladas, en comparación con las DCs de ratones jóvenes no estimuladas (Figura 16B). Esto último, concuerda con el estado inflamatorio subclínico reportado en individuos de edad avanzada (119).

A



B

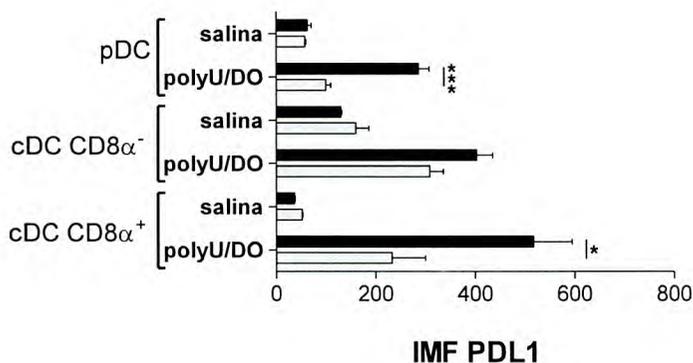


FIGURA 15. Menor activación de DCs de ratones viejos *in vivo*. Ratones jóvenes y viejos fueron inyectados vía endovenosa con 100 μ g polyU/DO. Luego de 18 horas, los esplenicitos fueron obtenidos y tratados con collagenasa/DNasa I. Posteriormente, las células fueron incubadas con anticuerpos marcadores de subpoblaciones de DCs y de las moléculas coestimuladoras CD86, CD40 y MHC clase II (A) o de la molécula PDL1 (B) y analizadas por citometría de flujo. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de la IMF para cada molécula y son representativos de dos experimentos independientes (4 ratones/grupo etario/experimento). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

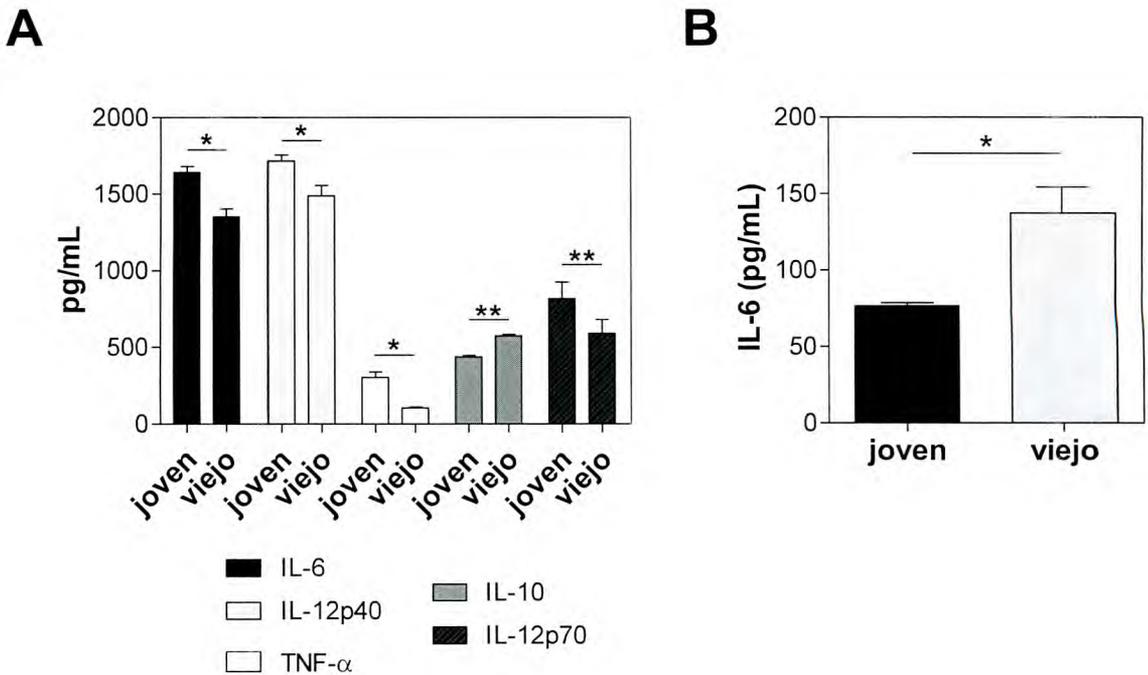


FIGURA 16. Menor activación de DCs de ratones viejos *in vitro*. (A) 1×10^6 DCs purificadas de bazo de ratones jóvenes y viejos fueron estimuladas con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polyU/DO. Luego de 24 horas, se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo para medir la producción de citoquinas por ELISA. Se muestran los valores obtenidos luego de restar los valores basales (DCs de ratones jóvenes y viejos incubadas sin estímulo). (B) Se muestran los valores de IL-6 obtenidos en sobrenadantes de DCs de bazo de ratones jóvenes y viejos incubadas por 24 horas sin estímulo. Los resultados se expresan como la media \pm SEM y son representativos de 2 experimentos (3-4 ratones/grupo etario/experimento). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

2. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ARNm DE TLR7

Debido a los resultados detallados en los párrafos anteriores, en los que se observó una menor activación de DCs de ratones viejos estimuladas con polyU/DO, tanto *in vivo* como *in vitro*, el siguiente objetivo fue cuantificar los niveles del receptor de polyU, TLR7, en DCs de ratones jóvenes y viejos. Inicialmente se intentó realizar la cuantificación proteica de TLR7 en extractos celulares por Western Blot. Sin embargo, los anticuerpos comerciales utilizados fueron incapaces de revelar el contenido de TLR7. Debido a esto, se analizaron mediante qRT-PCR los niveles de ARNm de TLR7 en las distintas subpoblaciones de DCs purificadas de bazo de ratones jóvenes y viejos. Se observó una notable reducción en los niveles del ARNm en todas las poblaciones de DCs de bazo de ratones viejos estudiadas, respecto a las jóvenes (Figura 17).

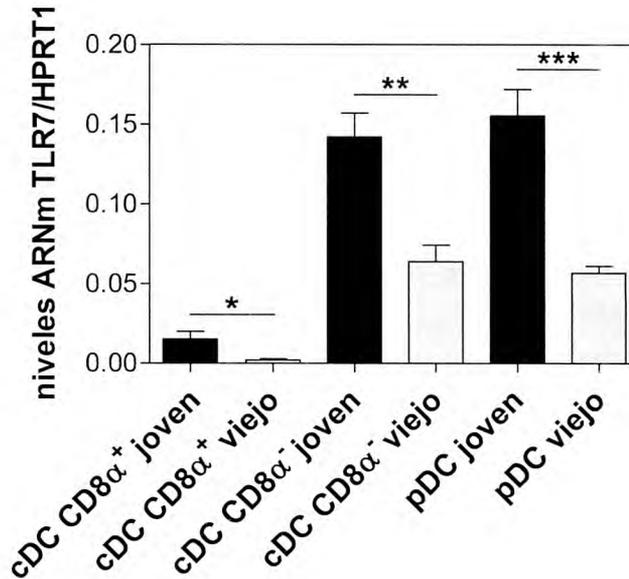


FIGURA 17. Menor nivel de ARNm de TLR7 en DCs de ratones viejos. Subpoblaciones de DCs de bazo de ratones jóvenes y viejos fueron purificadas y procesadas para extracción del ARN total de 1×10^6 células. Se cuantificaron los niveles del ARNm para TLR7 por qPCR normalizados con HPRT1. Los resultados se expresan como la media \pm SEM y son representativos de 2 experimentos (3-4 ratones/grupo etario/experimento). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3. SEÑALIZACIÓN TLR7

La activación de NF- κ B es crucial en la maduración de DCs mediada por TLR7 (156). Como se explicó en la introducción, frente a la estimulación celular, IKK se activa y fosforila I κ B, el cual es posteriormente poliubiquitinado y degradado por el proteasoma. La degradación de I κ B permite la translocación de NF- κ B al núcleo, donde se une a sus sitios blanco (156, 157).

Como índice de activación de NF- κ B, se determinó por Western Blot, la fosforilación de I κ B- α en DCs de ratones jóvenes y viejos estimulados con polyU/DO. Como se puede observar en la Figura 18 A y B, DCs de ratones jóvenes no estimuladas, no mostraron la banda correspondiente a I κ B- α fosforilado (pI κ B- α). Luego de 15 minutos de estímulo con polyU/DO, DCs de ratones jóvenes mostraron una banda correspondiente a pI κ B- α , la cual disminuyó rápidamente a los valores basales. En las DCs de ratones viejos sin estímulo, se observó una banda de pI κ B- α , pero se requirieron 30 minutos después del estímulo con polyU/DO, para mostrar un incremento en la fosforilación del I κ B- α . Estos resultados indicarían que las DCs de ratones viejos presentan una cinética de fosforilación del I κ B- α diferente a la

observada en DCs de ratones jóvenes, lo que podría sugerir que en las DCs de ratones viejos la señalización a través de TLR7 se encuentre alterada.

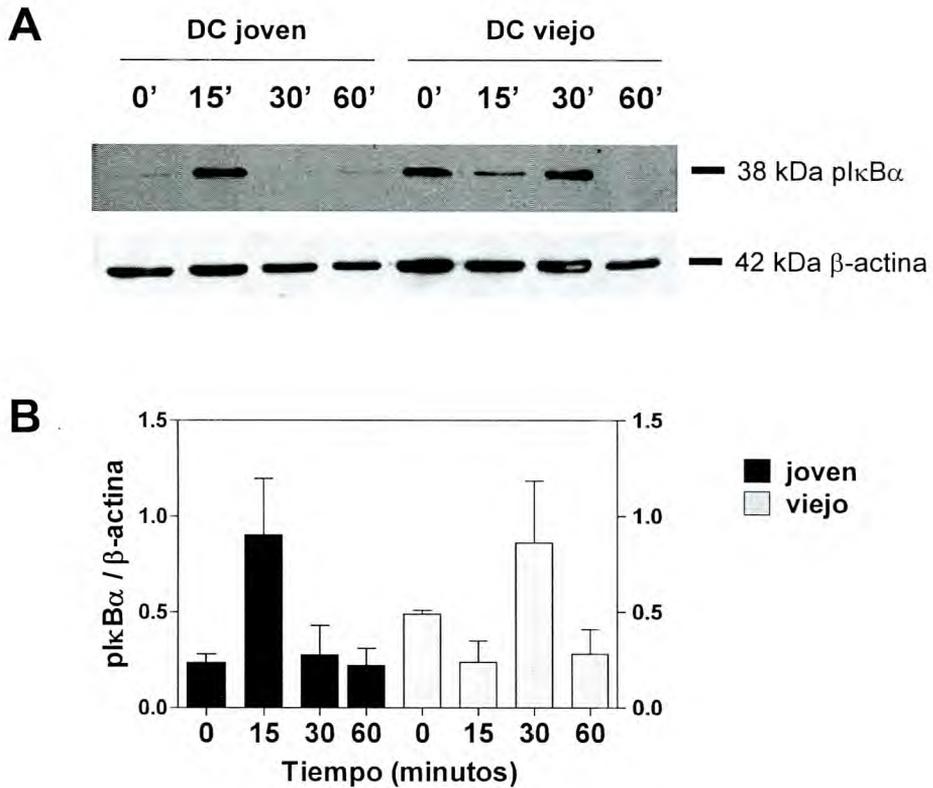


FIGURA 18. La cinética de fosforilación de IκB-α es diferente en DCs de ratones jóvenes y viejos. **(A)** DCs de bazo de ratones jóvenes y viejos fueron purificadas e incubadas con 20 μg/mL de polyU/DO durante los tiempos indicados. Luego se lisaron las células y se evaluaron por Western Blot los niveles de fosforilación de IκB-α, utilizando un anticuerpo anti-pIκB-α. Se utilizó β-actina como control de carga. **(B)** Se muestra la densidad óptica integrada (DOI) de pIκB-α normalizados con β-actina. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 2 experimentos independientes unidos (3-4 ratones/grupo etario/experimento).

Con el objetivo de corroborar la fuerte fosforilación de IκB-α observada en las DCs de ratones viejos sin estímulo, se evaluó por inmunofluorescencia la presencia de NF-κB en el núcleo de DCs purificadas de bazo de ratones jóvenes y viejos sin estímulo. En la figura 19, se observan imágenes representativas en las que en DCs de ratones jóvenes sin estímulo, la distribución de NF-κB es citoplasmática, en cambio en las DCs de ratones viejos sin estímulo se observa un patrón nuclear de localización de NF-κB.

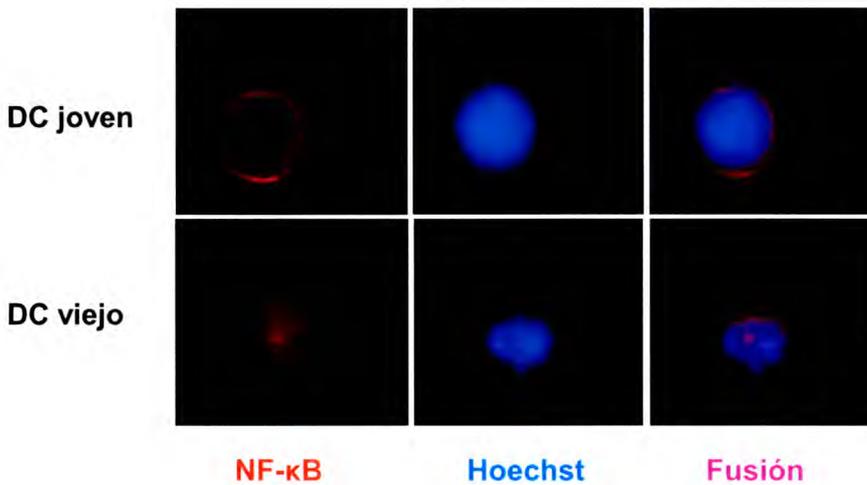


FIGURA 19. Activación basal de NF- κ B en DCs de ratones viejos. DCs de bazo de ratones jóvenes y viejos fueron purificadas y posteriormente fijadas en portaobjetos sin utilizar ningún estímulo. Se muestra la inmunorreactividad de la subunidad p65 de NF- κ B (rojo) en las DCs determinada por inmunofluorescencia. Para visualizar el núcleo celular se utilizó Hoeschst (azul). Se muestran imágenes representativas de 2 experimentos independientes.

4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN POR TLR4

Para evaluar la capacidad de activación de DCs de ratones viejos frente a otro ligando de TLR, se utilizó LPS, ligando de TLR4. En primer lugar, se estudió por citometría de flujo, el aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras en las distintas subpoblaciones de DCs presentes en bazo de ratones jóvenes y viejos luego de la estimulación *in vivo* con LPS. Como se muestra en la Figura 20A, luego de 18 horas de una inyección intravenosa con LPS, se observó un aumento en la expresión de las moléculas CD86 y CD40 en cDCs y pDCs de ratones jóvenes. Si bien en los ratones viejos inyectados con LPS, las distintas subpoblaciones exhibieron un leve aumento en la expresión de CD86, en las pDC y cDC CD8 α^+ esta expresión fue significativamente más baja respecto a la expresión observada en su contraparte joven. En los ratones viejos inyectados con LPS, la expresión de CD40, sólo aumentó en las cDC CD8 α^+ pero esta expresión fue significativamente menor respecto a su contraparte joven. En los controles inyectados con solución salina, la expresión de ninguna de las moléculas estudiadas fue significativamente diferente entre DCs de ratones jóvenes y viejos control.

Cuando se midieron los niveles de TLR4 en DCs de ratones jóvenes y viejos, se observaron menores niveles del ARNm de TLR4 a través de qRT-PCR, en DCs purificadas de ratones viejos respecto a los jóvenes (Figura 20B).

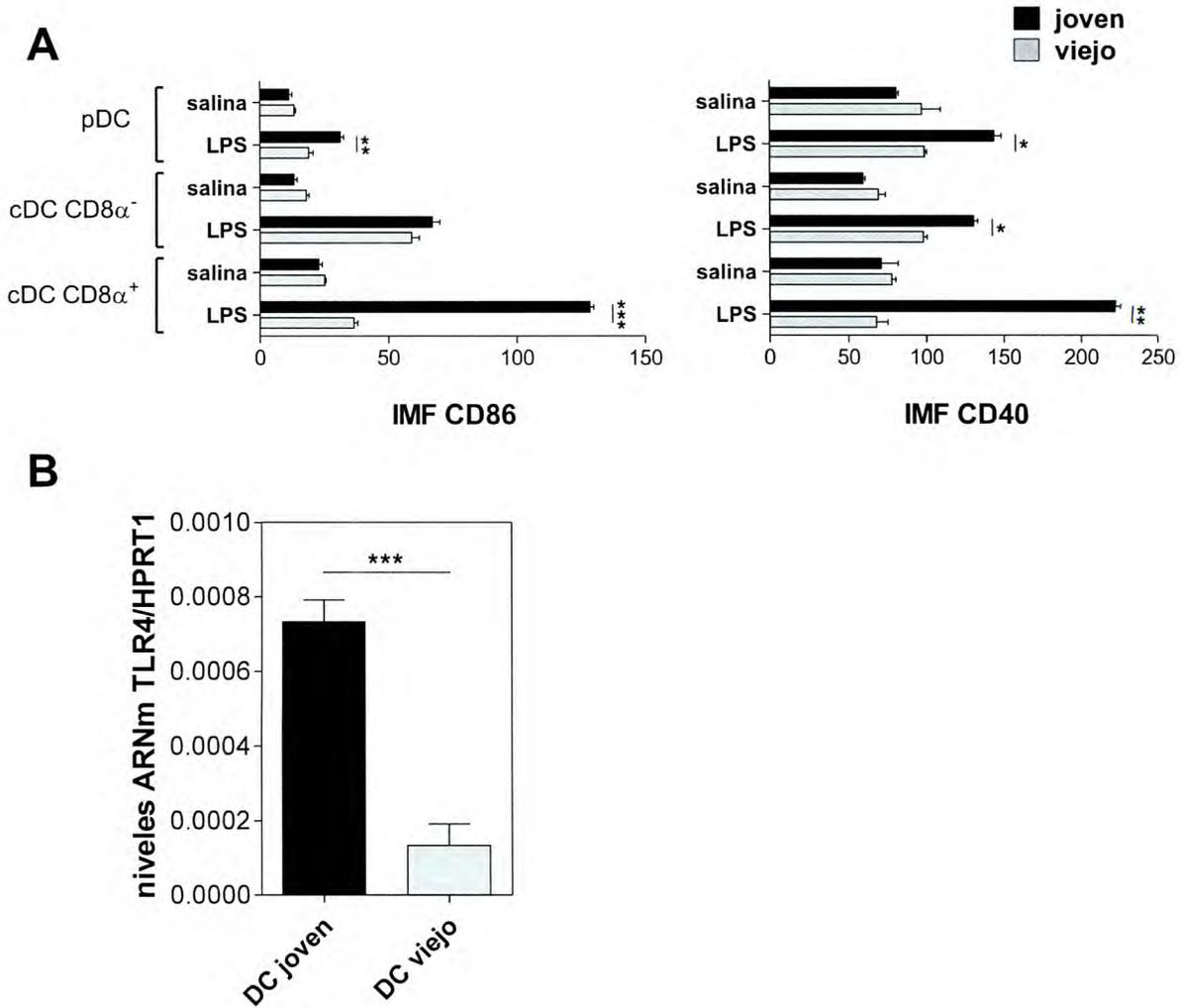


Figura 20. La maduración de DCs con LPS también se encuentra afectada con el envejecimiento. **(A)** Ratones jóvenes y viejos fueron inyectados vía endovenosa con 10 μ g de LPS. Luego de 18 horas, la expresión de CD86 y CD40 fue determinada en subpoblaciones de DCs de bazo por citometría de flujo. **(B)** DCs de bazo de ratones jóvenes y viejos fueron purificadas y el ARN total de 1×10^6 DCs fue extraído. Se muestran los niveles de ARNm TLR4 cuantificados por qPCR y normalizados con HPRT1. Los resultados se expresan como la media \pm SEM y son representativos de 2 experimentos (3-4 ratones/grupo etario/experimento). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

5. CONCLUSIONES CAPÍTULO 3

En este capítulo se evaluaron cambios en DCs de ratones viejos que afectarían las señales 2 (moléculas coestimuladoras) y 3 (citoquinas que polarizan el tipo de respuesta) que reciben los linfocitos T para activarse.

Al evaluar la activación de las DCs frente al estímulo *in vivo* ya sea con polyU/DO y también con LPS, se observó que en DCs de ratones viejos se indujo una menor expresión de moléculas coestimuladoras respecto a los jóvenes. Pero no se observaron diferencias en la expresión basal de estas moléculas entre DCs de ratones jóvenes y viejos.

Cuando las DCs fueron estimuladas *in vitro* con polyU/DO, las DCs de ratones viejos secretaron menos citoquinas proinflamatorias que las DCs de ratones jóvenes. Sin embargo se observaron niveles levemente incrementados de IL-6 en los sobrenadantes de cultivo de DCs de ratones viejos sin estímulo.

Por último, se observaron menores niveles de ARNm de TLR7 y TLR4 en DCs de ratones viejos, lo que podría explicar, en parte, la menor respuesta observada en DCs de ratones viejos frente al estímulo con los ligandos polyU/DO y LPS. Sin embargo, al evaluar indirectamente, el paso final en la cascada de señalización del TLR7, como lo es la activación de NF- κ B, medido por la fosforilación de I κ B- α , se encontró una cinética diferente en DCs de ratones viejos estimuladas con polyU/DO respecto a las DCs de ratones jóvenes, por lo que este cambio también podría contribuir a la menor activación de DCs de ratones viejos frente a polyU/DO.

DISCUSIÓN

La DC juega un rol crítico en la regulación de la respuesta inmune y la tolerancia. Debido a la heterogeneidad de las DCs, y a los numerosos estímulos que las activan, distintos autores han encontrado resultados contradictorios en cuanto al efecto del envejecimiento sobre la función de las mismas. Por lo que en el presente trabajo de tesis se consideró relevante evaluar el efecto del envejecimiento en DCs utilizando una población de células primarias provenientes de bazo y definiendo claramente el contexto activador para evaluar su función de CPA (tipo de Ag y ligando activador utilizado). Con esa estrategia fue posible poner en evidencia el impacto del envejecimiento sobre la función de las DCs durante la activación por TLR7, focalizándonos en DCs convencionales.

Utilizando polyU/DO, ligando activador de DCs a través de TLR7, encontramos que DCs de ratones viejos exhiben una menor habilidad para madurar, secretando menores niveles de citoquinas proinflamatorias e induciendo una menor expresión de moléculas coestimuladoras, con respecto a las DCs de ratones jóvenes. Además, hemos demostrado que DCs de ratones viejos inducen una menor presentación cruzada de Ags, esto es, tienen una reducida habilidad para activar linfocitos T CD8⁺ vírgenes específicos de Ags no expresados por las CPAs. También hemos demostrado que en ratones viejos, el porcentaje de subpoblaciones de DCs de bazo se encuentra alterada de manera significativa. Estas alteraciones afectan particularmente a las cDCs CD8 α ⁺, mientras que las otras subpoblaciones de DCs parecen encontrarse menos afectadas por el envejecimiento. Sin embargo, el estudio del efecto del envejecimiento en pDC ha sido abordado por otros grupos que revelaron una reducción de las mismas en sangre periférica y una disminución en la producción de IFN tipo I (96, 153, 158).

Para una eficiente presentación antigénica e inducción de una respuesta inmune específica por DCs, el número y la estabilidad de los complejos MHC clase I-péptido son de crucial importancia. Nuestros resultados indican que DCs de ratones viejos tienen una menor capacidad para presentar los complejos H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ a células T CD8⁺. Como encontramos que la capacidad de capturar OVA *in vitro*, no está alterada en DCs de ratones viejos, las diferencias en la presentación antigénica y la activación de células T CD8⁺ pueden atribuirse a diferencias en el procesamiento antigénico así como a deficiencias en la activación de las DCs. Observamos que DCs de ratones viejos, tienen una menor habilidad para degradar OVA a tiempos cortos, en comparación con las DCs de ratones jóvenes. Aunque las DCs de ambos grupos degradan completamente toda la OVA a las 24 horas (datos no mostrados). Por lo que resulta factible pensar, que lo que sucede rápidamente luego de la internalización de OVA y del estímulo de TLR7, plantea una diferencia entre DCs de ratones jóvenes y viejos. La presentación cruzada de Ags se ve favorecida por una menor degradación de Ags en endosomas tempranos y persistencia del Ag en los

mismos, sin embargo nosotros encontramos menor presentación cruzada de OVA y menor degradación de OVA en DCs de ratones viejos. La degradación de OVA fue medida en lisados totales de DCs en lugar de endosomas puros, ya que los estudios endosomales requerían cantidades de células difíciles de obtener a partir de los bazo de ratones viejos. Una posibilidad a considerar es que la degradación proteasomal en DCs de ratones viejos, podría estar particularmente afectada, impidiendo la degradación final de OVA en el citosol y evitando de este modo una efectiva presentación cruzada de Ags. Considerando que ha sido reportado que el envejecimiento afecta al sistema ubiquitina-proteasoma (159-163), esta hipótesis debería ser confirmada con más estudios. Otra posibilidad es que haya una baja degradación de OVA endosomal en DCs de ratones viejos, pero que el pasaje de péptidos hacia el citoplasma se encuentre impedido. Si hubiera una menor degradación de OVA en los endosomas de las DCs de ratones viejos, esto podría atribuirse a menores niveles de proteasas en los compartimentos endocíticos o a una menor actividad de las proteasas causada por una alcalinización de los endosomas y fagosomas.

Además es importante considerar otras posibilidades que puedan explicar una menor presentación cruzada de Ags por DCs de ratones viejos, que aún no hemos estudiado y que tienen que ver con la eficiencia de la misma *per se*. Hemos cuantificado indirectamente la presentación cruzada de Ags en términos de activación del TCR de células transgénicas T CD8⁺ o de hibridomas de células T CD8⁺, en lugar de medirlo directamente. Una manera de evaluar la presentación cruzada de OVA directamente, es utilizar un anticuerpo específico de los complejos H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄, sin embargo se han reportado inconvenientes metodológicos con la utilización de este anticuerpo (50), por lo que no hemos podido evaluar la cinética y formación de los complejos H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ en nuestro modelo.

Las diferentes funciones de las DCs *in vivo*, son en parte conferidas por las distintas subpoblaciones de DCs. Cuando se obtienen las DCs a partir de una diferenciación *in vitro*, no es posible recuperar todas las subpoblaciones que se encuentran presentes *in vivo*. Las cDCs CD8 α ⁺ son altamente eficientes para realizar presentación cruzada de Ags e inducir respuestas T CD8⁺, mientras que las cDCs CD8 α ⁻ son más efectivas induciendo respuestas T CD4⁺ (50). Las pDCs, por otro lado, son caracterizadas por producir interferón tipo I y jugarían un rol significativo en la tolerancia inmunológica (164, 165). En el presente trabajo, demostramos una alteración significativa en la proporción de las subpoblaciones de DCs presentes en bazo de ratones viejos. Encontramos que el número absoluto y el porcentaje de cDCs CD8 α ⁺ y el porcentaje de pDCs disminuyen en bazo de ratones viejos. Una reducción similar en el porcentaje de las cDCs CD8 α ⁺ fue observada por Wong y colaboradores (94), mientras que Stout-

Delgado y colaboradores (158) no encontraron diferencias en el porcentaje de pDC. Sioh-Yang Tan y colaboradores (143) no observaron diferencias en la incorporación de BrdU entre cDC de ratones jóvenes y viejos. Esto indica que las cDC de distintos órganos (bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y poplíteos, timo, pulmón) de ratones jóvenes y viejos exhiben una cinética de recambio similar. Considerando estos y nuestros hallazgos, quedaría por evaluar la susceptibilidad a la apoptosis de las cDC de bazo de ratones viejos ya que numerosos estudios han visto una correlación entre apoptosis y envejecimiento (166, 167). Otros estudios documentaron que con el envejecimiento el porcentaje de CPAs presentes en piel, conjuntiva, mucosa y cavidad oral de ratones y humanos se encuentra reducida (168, 169). Mientras que las cDC residentes en tejido linfoide derivan de precursores que llegan desde la sangre y continuamente son renovadas a lo largo de la vida, las células de Langerhans se producen dentro de un margen temprano en la vida y se mantienen por recambio local en ausencia de inflamación (170). La médula ósea de ratones viejos contiene mayor porcentaje de células madre hematopoyéticas multilíneas, con potencial hacia diferenciación mielóide (171-173). En concordancia con estos estudios, nosotros hemos observado también un mayor porcentaje de células CD11c⁺ en médula ósea de ratones viejos.

Considerando las distintas funciones propuestas para las subpoblaciones de DCs, las alteraciones en la proporción de las subpoblaciones que encontramos en bazo de ratones viejos, podrían tener consecuencias importantes en la activación de la célula T. Las cDCs CD8 α ⁺ son especializadas para realizar presentación cruzada de Ags y han desarrollado adaptaciones específicas en la vía endocítica para tal fin, incluyendo alto pH y baja degradación de proteínas a nivel endosomal así como el pasaje de proteínas al citosol (50). Previamente hemos reportado que la estimulación de DCs totales y cDCs CD8 α ⁺ con polyU induce cambios en la vía endocítica de las mismas que facilitan la presentación cruzada de Ags y la activación de linfocitos T CD8⁺ (88). En el presente trabajo encontramos que además de una reducción en el número de las mismas, las cDCs CD8 α ⁺ de ratones viejos son menos eficientes en realizar presentación cruzada de OVA a linfocitos T CD8⁺, lo cual induciría una pobre respuesta citotóxica contra OVA en ratones viejos.

Además de una reducida presentación antigénica a linfocitos T CD8⁺, también hemos observado una menor secreción de citoquinas proinflamatorias por DCs de bazo de ratones viejos estimuladas con polyU/DO y también lo observamos con LPS (datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con reportes en los que se observan diferencias en la producción de TNF- α entre DCs de bazo de ratones jóvenes y viejos frente al estímulo con LPS (94). Observamos una menor inducción en la expresión de

moléculas CD86, CD40 y MHC clase II en las subpoblaciones de DCs de bazo de ratones viejos estimuladas con polyU y LPS, en comparación con los jóvenes. La subpoblación CD8 α^+ de ratones viejos mostró una inhabilidad particular para aumentar la expresión de moléculas coestimuladoras frente a la estimulación de TLR7. Li y colaboradores (146) encontraron resultados similares al observar que cDCs CD8 α^+ de ratones viejos mostraron un pobre aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras a tiempos cortos, luego de la infección con *Listeria monocytogenes*. Previamente observamos que la estimulación con polyU es crucial para que las cDCs CD8 α^+ realicen presentación cruzada de OVA en ratones jóvenes y que la cDC CD8 α^+ es la principal población blanco frente al estímulo con polyU entre las subpoblaciones de DCs (88). Nuestros resultados muestran que las cDC CD8 α^+ de ratones viejos responden pobremente a la estimulación con ligandos TLR, con una activación defectuosa. Estos hallazgos con polyU y LPS se correlacionan con los menores niveles en DCs de ratones viejos de ARNm de TLR7 y TLR4 respectivamente. Por lo que la menor activación de las DCs de ratones viejos luego del estímulo con polyU, podría deberse, al menos en parte, a una reducción en los niveles de TLR7, afectando significativamente a la cDC CD8 α^+ .

Por otra parte, NF- κ B ha sido propuesto como causante del estado inflamatorio sistémico, crónico y de bajo grado, asociado con el envejecimiento conocido como *inflammaging* (Salminen y colaboradores (174). Encontramos un nivel bajo de fosforilación del κ B- α en DCs de ratones viejos sin estimular, indicativo de una activación basal del NF- κ B. Esto mismo fue corroborado a través de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra la subunidad p65 de NF- κ B. Además, observamos una cinética de fosforilación de κ B- α diferente en DCs de ratones viejos luego de la estimulación de TLR7, en comparación con los jóvenes. Consideramos que esta podría ser otra razón por la que DCs de ratones viejos, secretan menos citoquinas proinflamatorias e inducen una menor expresión de moléculas coestimuladoras frente al estímulo con polyU/DO. Proponemos que una reducida habilidad para responder a ligandos activadores resultaría finalmente en la inducción de una pobre respuesta citotóxica.

Como se mencionó en la introducción, la DC es la CPA más poderosa capaz de activar linfocitos T vírgenes e inducir una respuesta inmune adaptativa. Para que los linfocitos T sean activados requieren tres señales dadas por la CPA. La señal uno está dada por la presentación antigénica, en la que el péptido antigénico unido a moléculas de MHC expresadas en la superficie de la DC se une a los receptores TCR presentes en la célula T y determina así una respuesta Ag específica. La señal dos proviene del fino balance entre señales coestimuladoras positivas y negativas (como por ejemplo la

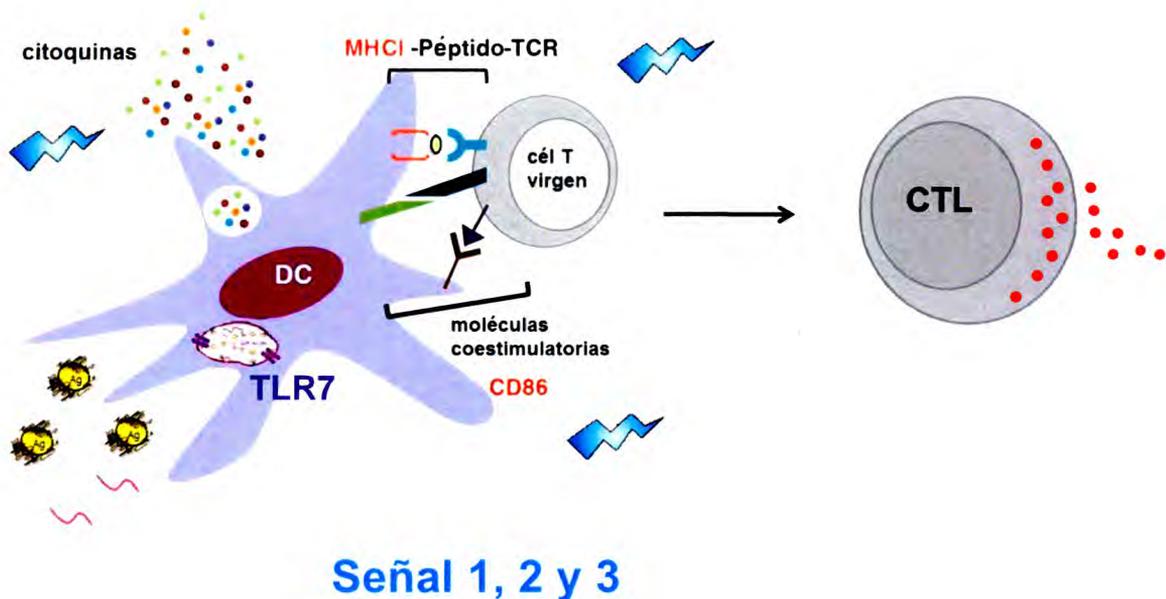
interacción con CD28 y CTLA4 en la célula T y las moléculas CD80 y CD86 en la DC). La ausencia de esta señal 2 vuelve anérgica a la célula T. Por último, la señal tres consiste en las citoquinas secretadas por las DCs y otras células, que van a polarizar el tipo de respuesta que los linfocitos T van a desarrollar.

Claramente, nuestros resultados muestran que las alteraciones observadas en DCs de ratones viejos afectan las 3 señales requeridas para activar los linfocitos T CD8⁺ vírgenes. (Figura 21).

La señalización por TLR7 juega un rol esencial en la inducción de una respuesta citotóxica luego de la inmunización con virus influenza inactivado (175) y durante la infección (176). Las infecciones severas por virus influenza son muy comunes durante la vejez y usualmente se acompañan de infecciones bacterianas concomitantes que pueden ser letales (177-180). La capacidad antiviral de las células T CD8⁺ ha sido asociada a la protección contra influenza en personas ancianas (181). Por lo tanto, una reducida respuesta T CD8⁺ inducida por DCs activadas por TLR7 en individuos ancianos, debiera tener consecuencias en la respuesta inmune contra las infecciones, en particular contra virus. Nuestros hallazgos sugieren que DCs de ratones viejos inducen una menor activación de linfocitos T CD8⁺ como resultado, en parte, de una alteración en la señalización por TLR7. Esto podría sugerir que el incremento en la frecuencia y severidad de infecciones por influenza en pacientes ancianos, se asociaría a defectos funcionales de la DC. Esta hipótesis también fue propuesta por Liu y colaboradores, quienes reportaron que la menor producción de TNF- α por parte de las DCs de pacientes ancianos, induce una menor respuesta T CD8⁺ frente a la infección por influenza (182).



JOVEN



VIEJO

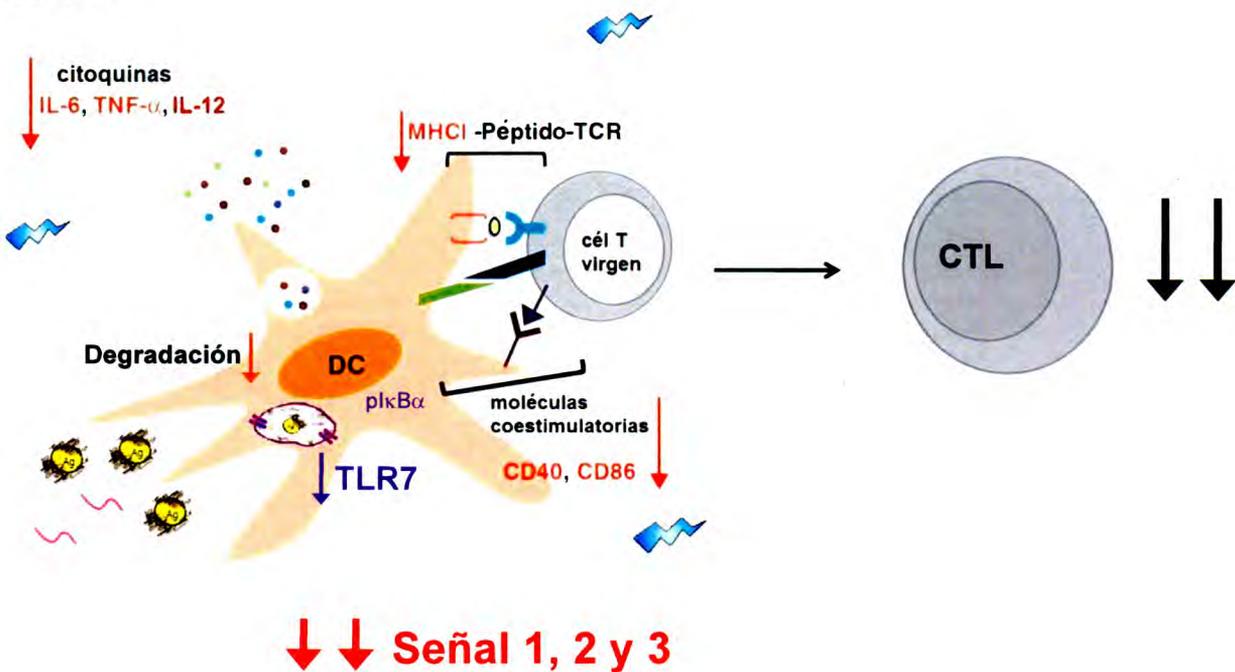


Figura 21. Cambios funcionales con la edad en DCs. JOVEN. Una vez que la DC internalizó un Ag exógeno y fue activada a través de un ligando TLR, se encuentra capacitada para activar linfocitos T CD8⁺ vírgenes y conferirles funciones citotóxicas. Para llevar a cabo esta función se necesitan 3 señales otorgadas por las CPA. La primera señal es la presentación antigénica a través de MHC clase I, la señal 2 está dada por las moléculas coestimuladoras expresadas en las CPA y la señal 3 dada por las citoquinas que estimulan la expansión y diferenciación de linfocitos T CD8⁺ (IL-12, IFN- γ , IL-2), polarizando así el tipo de respuesta. VIEJO. En el modelo de envejecimiento, la DC de ratón viejo provee una pobre señal 1, ya que la presentación de OVA a linfocitos T CD8⁺ es baja y esto se debe en parte a una menor capacidad de degradación de OVA. La señal 2 también se encuentra disminuida ya que frente al ligando de TLR7, la DC de ratón viejo induce una menor expresión de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86. Además la secreción de citoquinas como IL-12 necesarias para la inducción de una respuesta citotóxica también es menor.

CONCLUSIÓN

A partir de este trabajo de investigación se pudo concluir:

La DC se encuentra afectada por el proceso de envejecimiento ya que presenta alteraciones funcionales que comprometen la presentación de Ags exógenos a linfocitos T CD8⁺.

Este defecto podría ser causado por la menor capacidad para degradar Ags exógenos y por menor activación de las DCs a través de polyU/DO.

Los defectos en la activación de DCs de ratones viejos observados con polyU/DO se deberían a los menores niveles de ARNm de TLR7 o bien a los defectos observados en la señalización del TLR7.

De manera que la reducción en el número de cDCs CD8 α ⁺ hallada en bazo de ratones viejos no sería únicamente responsable de la menor capacidad de inducción de una respuesta citotóxica, sino que juegan un rol preponderante los defectos funcionales intrínsecos hallados en esta subpoblación, sobre todo en las cDCs en general.

Considerando estos hallazgos, este trabajo de tesis aporta conocimientos que pueden ayudar a comprender el deterioro en la función del sistema inmune en personas de edad avanzada. Además, conocer los defectos funcionales que presentan las DCs con el envejecimiento puede ser de gran importancia al momento de diseñar vacunas que generen una respuesta citotóxica robusta.

MATERIALES Y MÉTODOS

RATONES

Se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 (H-2^b) de 6 a 8 semanas de edad (jóvenes) y de 20 a 22 meses de edad (viejos). Fueron adquiridos en la Fundación Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (Argentina). Los ratones transgénicos OT-I, en los que el receptor de sus células T (TCR) reconocen los residuos de OVA₂₅₇₋₂₆₄ en el contexto de MHC clase I (H-2K^b) (183), fueron donados por el Dr. F.A. Goldbaum (Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina).

Los ratones fueron mantenidos en el Bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas donde dispusieron de alimento balanceado y agua *ad libitum*.

Los protocolos de uso de animales estuvieron en acuerdo con la Guía para el uso y cuidado de animales de experimentación publicada por el Consejo Canadiense de Cuidado de Animales (expediente N° A5802-01) asignado por la oficina de Bienestar de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (expediente N° 15-07-44195 y resolución del Honorable Consejo Directivo 450/07 de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba).

Los ratones viejos fueron excluidos de los ensayos si exhibían signos de enfermedad (aletargamiento, pérdida de peso, ojos hinchados y/o con secreción), tumores visibles, esplenomegalia o alteraciones en el tamaño o apariencia de cualquier otro órgano.

MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo completo consistió en RPMI 1640 (Life Technologies Cell Culture Systems) suplementado con 1 % de L-Alanil-L-Glutamina (GlutaMAX I, Life Technologies Cell Culture Systems), 10% de suero fetal bovino (SFB) (Natocor S.A), 5x10⁻⁵ M 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y antibióticos: penicilina 100 U/ml con estreptomycinina 100 µg/ml (PAA Laboratories GmbH). Todas las células fueron incubadas en una estufa a 37 °C, atmósfera controlada con 5 % CO₂.

LÍNEAS CELULARES

B3Z es un hibridoma de células T CD8⁺ específicas para los residuos de OVA₂₅₇₋₂₆₄ presentados en el contexto de MHC clase I (H-2K^b) (184), cedido por el Dr. N. Shastri (University of California, Berkeley, CA).

Esta línea celular se mantuvo en medio completo con los antibióticos necesarios para su selección: Higromicina B (0,4 mg/ml) y Geneticina (0,5 mg/ml).

ANTÍGENOS Y PÉPTIDOS

Como Ag para los diferentes experimentos se utilizó albúmina de huevo de gallina (OVA) grado V (Sigma Aldrich) u OVA purificada por cromatografía (Worthington Biochemical), solubilizada en PBS y dializada. También se utilizaron Ags particulados formados a partir de OVA: en forma de complejos inmunes con IgG de conejo anti-OVA (IC-OVA) (ver en métodos de ensayos) o unida de manera covalente a perlas de poliestireno (perlas OVA). Las perlas OVA fueron preparadas como se describe en Boisgerault y colaboradores (185). En resumen, microesferas monodispersas de poliestireno *Polybead® Amino*, (Polysciences) fueron activadas con 8 % de glutaraldehído y unidas de manera covalente con 0,4 mg/ml de OVA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para los estudios de endocitosis, se empleó OVA conjugada a FITC (Molecular Probes, Invitrogen) y perlas de poliestireno conjugadas al fluorocromo Yellow Green (Polysciences, Inc.).

También se empleó un péptido correspondiente al fragmento 257-264 de OVA, sintetizado por el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina).

AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE TLR

Como ligando de TLR7 se utilizó ácido poliuridílico (polyU, Sigma-Aldrich), siempre acompañado con metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi) propil]-N,N,N-trimetilamonio, DOTAP (Roche Diagnostics). Para evaluar el contenido de endotoxinas se realizó un ensayo estándar LAL (*Limulus ameobocyte lysate*) (BioWhittaker Inc, Walkersville MD, EE.UU.) que indicó que los niveles de endotoxina eran menores a 1 EU/ml.

Como ligando de TLR4 se utilizó lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (*E. coli*) serotipo 011:B4 (Sigma-Aldrich).

ANTICUERPOS

Todos los anticuerpos utilizados fueron obtenidos en Becton Dickinson Argentina o eBioscience. Fueron conservados según indicaciones del fabricante y titulados antes de utilizar en los ensayos descritos.

MÉTODOS DE ENSAYO

1. Obtención de suspensiones celulares

Células de bazo

Los bazos fueron removidos quirúrgicamente y colocados en placas bacteriológicas de 60 mm de diámetro conteniendo RPMI con antibiótico y 2 % SFB. Las suspensiones celulares se obtuvieron por disgregación mecánica, seguido de tratamiento con *buffer* de lisis (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar los glóbulos rojos. Luego de un lavado, las células se resuspendieron en medio completo y se realizó el recuento celular con líquido de Turk. Las células así obtenidas fueron utilizadas en cultivo celular o citometría de flujo, entre otros ensayos.

Purificación de DCs (CD11c⁺) de bazo

La purificación de células CD11c⁺ se efectuó como se describe por Morón y colaboradores (46). Se realizó una selección positiva utilizando la metodología de separación magnética (MACS). En resumen, los bazos de ratones fueron perfundidos y tratados durante 45 minutos con 0,4 U/ml de *Liberase Blendzyme 2* más 100 U/ml de ADNasa I (ambos de Roche Diagnostics). Después de la inhibición de la actividad de las enzimas con 6 mM de EDTA, los bazos fueron disgregados y las suspensiones de células individuales se incubaron con anticuerpo MACS anti-CD11c (clon N418, Miltenyi Biotec) en un *buffer* PBS 0,5 % SFB (Natocor), 2,5 mM EDTA, antibióticos (*buffer* MACS). Después de 20 minutos de incubación a 4-6°C, las células fueron lavadas y seleccionadas en una columna LS MACS (Miltenyi Biotec). La pureza de las células CD11c⁺ fue rutinariamente mayor al 70 % (Figura 22, panel del medio).

En algunos experimentos, luego de la separación con MACS, las células fueron marcadas durante 20 minutos a 4°C con anti-CD16/32 (clon 2.4G2) y anti-CD11c (clon HL-3) conjugado a algún fluorocromo, lavadas con *buffer* MACS, para luego ser separadas por citometría de flujo mediante separación por

fluorescencia (FACS, del inglés Fluorescence-activated Cell Sorting) en un separador de células FACS Aria II (BD). La pureza de las células CD11c⁺ fue rutinariamente mayor al 98 % (Figura 22, panel derecho).

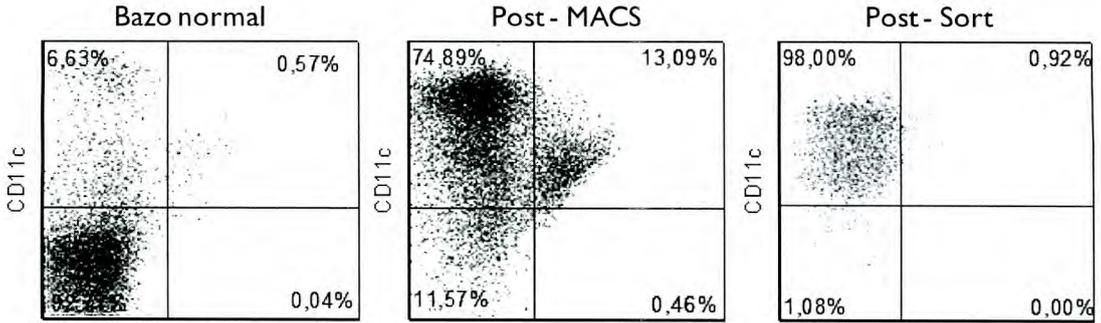


Figura 22. Doble purificación de DCs a partir del bazo de un ratón normal. Esplenocitos fueron obtenidos de los ratones normales, procesados y separados por MACS y luego FACS. Gráficos representativos donde se observa el porcentaje de células CD11c⁺ en un bazo normal (panel derecho), el enriquecimiento obtenido por la técnica de MACS (panel del medio) y luego utilizando el FACS Aria II (panel izquierdo).

Purificación de subpoblaciones de DCs de bazo

Utilizando la separación por FACS, fue posible obtener diferentes subpoblaciones de DCs por separado. Luego de la separación por MACS, las células fueron incubadas durante 20 minutos a 4 °C con anti-CD11c (clon HL-3), anti-B220 (clon RA3-6B2), anti-CD8 (clon 53-6.7) y anti-PDCA-1 (clon 129c) todos conjugados a diferentes fluorocromos, y anti-CD16/32 (clon 2.4G2). Posteriormente, se realizó un lavado con *buffer* MACS, para luego ser separadas en el equipo FACS Aria II (BD). Se obtuvieron tres poblaciones celulares, todas con un porcentaje de pureza mayor al 98 %: pDCs (CD11c^{int} B220⁺ PDCA-1⁺), cDCs CD8⁺ (CD11c⁺ B220⁻ CD8⁺) y cDCs CD8⁻ (CD11c⁺ B220⁻ CD8⁻).

Purificación de linfocitos T CD8⁺

Para purificar linfocitos T CD8⁺ se utilizó separación por citometría de flujo. Para este fin, esplenocitos totales de ratones OT-I fueron incubados durante 20 minutos a 4°C con anti-CD16/32 (clon 2.4G2) y anti-CD8β (clon H35-17.2) conjugado a algún fluorocromo (BD Biosciences), lavadas con *buffer*

MACS, para luego ser separadas y recogidas en FACSaria II (BD). La pureza de las células CD8 β ⁺ fue rutinariamente mayor al 94 % (Figura 23).

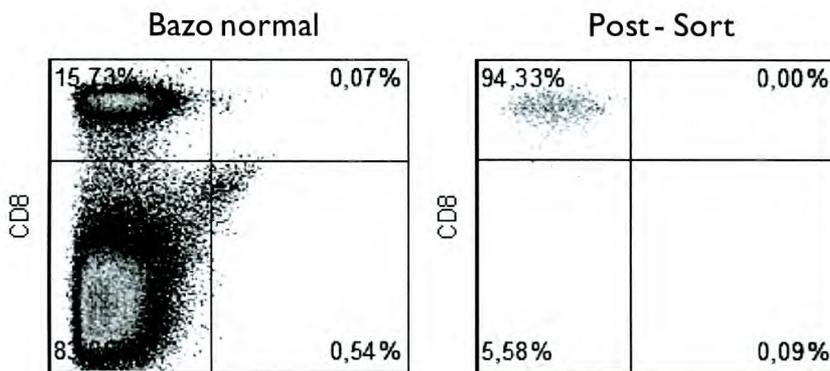


Figura 23. Purificación de linfocitos T CD8⁺ a partir del bazo de un ratón OT-I. Esplenocitos fueron obtenidos de los ratones OT-I, procesados y separados por FACS. Gráficos representativos donde se observa el porcentaje de células CD8⁺ previo y post-separación por fluorescencia (Sort).

2. Estimulación de DCs

Maduración *in vivo*

Ratones jóvenes fueron inyectados por vía endovenosa con 100 μ g de polyU estabilizado con 60 μ g de DOTAP en *buffer* Hepes 20mM o con 10 μ g LPS en solución salina. Para formar el complejo polyU/DO, a una mezcla de 60 μ l de DOTAP (1 mg/ml) con 40 μ l de *buffer* 20 mM de Hepes en solución salina, se le agregó 100 μ l de polyU (1mg/ml). La mezcla se incubó en un tubo libre de ARNasas durante 15 minutos a temperatura ambiente. La cantidad inyectada para ratones viejos se ajustó según su peso corporal. Como controles, se inyectaron ratones jóvenes y viejos con solución salina o con *buffer* Hepes en solución salina según correspondiera. 18 horas después de haber inyectado se obtuvieron los bazos para analizar las DCs por citometría de flujo.

Maduración *in vitro*

1,5x10⁶ DCs puras fueron estimuladas con 20 μ g/mL de polyU/DO y luego de 24 horas se obtuvieron los sobrenadantes para ser analizados por ELISA.

3. Evaluación de la endocitosis de antígenos en DCs

In vitro:

DCs esplénicas (2×10^5) fueron incubadas durante 90 minutos a 37 °C con distintas concentraciones de OVA-FITC o con distintas concentraciones de OVA-FITC formando inmunocomplejos con un anticuerpo anti-OVA (IC-OVA-FITC) en presencia o ausencia de 20 µg/ml de polyU/DO, en una placa de cultivo fondo en U con medio completo. Luego las células fueron lavadas y marcadas para analizar las DCs por citometría de flujo con anticuerpo anti CD11c.

In vivo:

Ratones jóvenes fueron inyectados por vía endovenosa con $2,5 \times 10^9$ perlas de poliestireno conjugadas a Yellow Green (perlas YG). La cantidad inyectada para ratones viejos se ajustó según su peso corporal. 2 horas después de haber inyectado, se obtuvieron los bazos para analizar las DCs por citometría de flujo con anticuerpo anti CD11c.

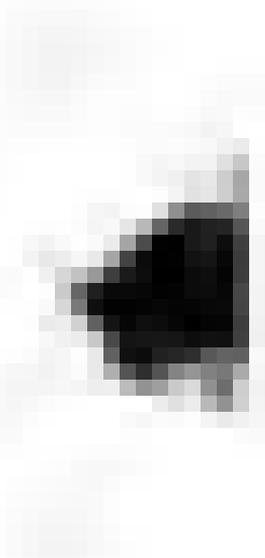
4. Evaluación de la presentación cruzada de antígenos en DCs

Presentación cruzada de antígenos: hibridoma B3Z

Para el ensayo *in vitro*, DCs esplénicas (0.1 a 1×10^5 células por pocillo) fueron pulsadas con IC-OVA durante 4 horas a 37 °C en placas de cultivo. Luego, las células fueron lavadas y coincubadas a 37 °C durante toda la noche con 10^5 células del hibridoma T CD8⁺ B3Z. Para el ensayo *ex vivo*, ratones jóvenes y viejos fueron inyectados vía endovenosa con $2,5 \times 10^9$ perlas OVA. La cantidad inyectada para ratones viejos se ajustó según su peso corporal. 90 minutos después, las DCs esplénicas fueron purificadas e incubadas con el hibridoma B3Z toda la noche. Finalmente, la activación del hibridoma B3Z se midió a través de una reacción colorimétrica determinando la actividad de β-galactosidasa. En primer lugar, se lavaron las células dos veces con PBS y se agregaron 125 µl de una solución de PBS conteniendo: 0.15 mM de colorante rojo de clorofenol-β-D-galactopiranosido (CPRG) (Roche Diagnostics Corporation), 100 mM de 2-β-mercaptoetanol, 9 mM de MgCl₂, 0,125 % de NP40 (IGEPAL CA 630, Sigma-Aldrich). Luego de 4 horas de incubación a 37°C en oscuridad, se leyó la densidad óptica a 595 nm en un lector de placas.

5. Activación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes

Cocultivo y ensayo de proliferación de linfocitos T CD8⁺ con CFSE



Se realizó un cocultivo de linfocitos T CD8 β ⁺ purificados de ratones OT-I con DCs previamente estimuladas. Para ello, DCs purificadas (0.5, 1 o 2x10⁵ células por pocillo) fueron incubadas con 1 mg/ml de OVA en ausencia o presencia de 20 μ g/ml de polyU/DO, durante 90 minutos a 37 °C en medio completo. Luego las DCs fueron lavadas y se agregaron a la placa los linfocitos T CD8⁺ (2x10⁵ células por pocillo) previamente coloreados con 5 μ M de CFSE en PBS al 2,5 % de SFB. Se incubaron a 37 °C durante 72 horas. Finalmente se obtuvieron los sobrenadantes para cuantificar la secreción de IFN- γ por ELISA y las células obtenidas del cultivo fueron lavadas, marcadas para citometría de flujo con anticuerpos anti-CD3 para identificar a los linfocitos T y con anti-CD25. Previo a la adquisición de las células en el citómetro, se agregó 7-AAD (BD Biosciences) para excluir las células muertas, ya que este marcador fluorescente se intercala con las hebras de ADN de células muertas o en apoptosis. Durante cada división celular, la intensidad relativa de fluorescencia correspondiente al CFSE disminuye a la mitad. Así, la proliferación celular fue evidenciada por la dilución del CFSE y por la expresión de la cadena alfa del receptor de IL-2 (CD25).

6. Citotoxicidad específica a antígeno *in vivo*

Para las inmunizaciones, ratones jóvenes fueron inyectados por vía endovenosa con 2,5x10⁹ perlas OVA en 100 μ g de polyU estabilizado con 60 μ g DOTAP (polyU/DO), en *buffer* Hepes 20 mM. La cantidad inyectada para ratones viejos se ajustó según su peso corporal. Como controles, se inyectaron ratones jóvenes y viejos con *buffer* Hepes. Para algunos experimentos, ratones jóvenes recibieron 1-2x10⁶ DCs purificadas de bazo de 3 ratones jóvenes o de 3 ratones viejos, previamente incubadas con 20 mg/ml OVA y 20 μ g/ml de polyU/DO durante 90 minutos en RPMI sin suero.

Para el ensayo de citotoxicidad, esplenocitos de ratones normales singénicos con los inmunizados, fueron incubados con 10 μ g/ml de OVA₂₅₇₋₂₆₄ durante 30 minutos a 37 °C en RPMI sin suero (células blanco). Luego fueron lavados y coloreados con CFSE disuelto en PBS a una concentración alta (3 μ M). Por otro lado, esplenocitos de los mismos animales que no fueron incubados con el péptido, fueron coloreados con una concentración baja de CFSE disuelto en PBS (0,5 μ M) (control interno). Finalmente, ambas suspensiones celulares fueron resuspendidas en solución salina, mezcladas en partes iguales y la mezcla resultante se inyectó vía endovenosa (20x10⁶ células) en los ratones inmunizados. 24 horas después se obtuvieron los bazos de los animales inyectados y el porcentaje de células CFSE⁺ remanente en los mismos se determinó por citometría de flujo. En la Figura 24 se muestra una imagen

representativa de lo que se observa cuando se realiza la citometría de flujo en ratones controles (panel izquierdo) o inmunizados (panel derecho). Para el cálculo del porcentaje de lisis específica se realizó la siguiente operación: $[(1 - R^{\text{control}}/R^{\text{inmunizado}}) \times 100]$, siendo $R = (\% \text{ células control} - \% \text{ células OVA})$ para cada ratón evaluado.

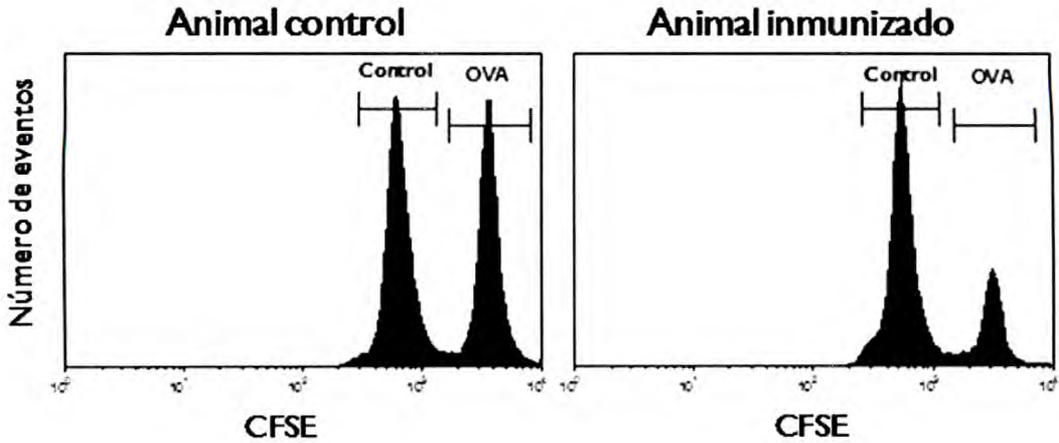


Figura 24. Ensayo de citotoxicidad específica a antígeno *in vivo*. Esplenocitos marcados con diferentes concentraciones de CFSE fueron inyectados vía endovenosa en ratones inmunizados. Gráfico representativo que muestra la disminución en el número de eventos de la población celular que fue pre-incubada con OVA₂₅₇₋₂₆₄ (marcada con la concentración más alta de CFSE) en el animal inmunizado, con respecto al animal control.

Reestimulación de linfocitos T *in vitro*

Esplenocitos de ratones inmunizados fueron incubados ($1,25 \times 10^6$ por pocillo) con 0,1 mg/ml de OVA, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de OVA₂₅₇₋₂₆₄ o sólo medio completo como control, en placas de cultivo de 48 pocillos durante 72 horas a 37 °C en un volumen final de 0,5 ml de medio completo. Luego se tomaron los sobrenadantes para evaluar el contenido de IFN- γ , IL-17 e IL-5 por ELISA.

7. Determinación de citoquinas mediante un ELISA sándwich

Placas de 96 pocillos fondo plano para microtécnica fueron sensibilizadas con 25 μl de anticuerpo de captura específico para la citoquina a determinar, diluido en un *buffer* fosfato, por toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Al día siguiente, los pocillos fueron bloqueados con 100 μl de *buffer* de bloqueo

(PBS/10 % SFB) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Luego de cuatro lavados con PBS/Tween 0,05 %, se agregaron 50 μ l del sobrenadante de cultivo de las muestras problemas. En paralelo se realizó la curva del testigo con 50 μ l de diluciones seriadas de una solución de la citoquina recombinante de interés de concentración conocida. Se incubó durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Se realizaron cinco lavados y se incubó con 50 μ l de anticuerpo de detección biotinilado por 90 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron seis lavados y se agregaron 50 μ l de estreptavidina marcada con peroxidasa (BD Biosciences). La presencia de peroxidasa fue revelada con el reactivo BD OptEIA™ TMB+ Substrate-Chromogen (BD Biosciences).

TABLA 3. Anticuerpos empleados en ELISA de citoquinas.

Especificidad	Clon	Marca	Empresa/Origen
IFN-γ	R4-6 A2	S/marca	BD Biosciences
	XMG1.2	Biotina	BD Biosciences
IL-10	JES5-2 A5	S/marca	BD Biosciences
	JES5- E16E3	Biotina	BD Biosciences
IL-12p40	C15.6	S/marca	BD Biosciences
	C17.8	Biotina	BD Biosciences
IL-12p70	9A5	S/marca	BD Biosciences
	C17.8	Biotina	BD Biosciences
IL-6	MP5-20F3	S/marca	BD Biosciences
	MP5-32C11	Biotina	BD Biosciences
TNF-α	1F3F3D4	S/marca	e-Bioscience
	XT3/XT22	Biotina	e-Bioscience

8. Reacción de transcripción reversa de ARNm y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR)

Se purificaron DCs y subpoblaciones y se evaluó la expresión de TLR7 y TLR4. La evaluación de la expresión de ARNm de HPRT1, TLR7 y TLR4 se realizó utilizando oligonucleótidos específicos de secuencias (*primers*): *HPRT1*, sentido, 5'-AAGCTTGCTGGTAAAAGGA-3', antisentido 5'-TCCAACAAAGTCTGGCCTGT-3'; *TLR7*, sentido, 5'-GGATCTGCCATCCAGCTTAC-3', antisentido, 5'-ATTAGGTGGCAAAGTGGTGG-3' y *TLR4*, sentido, 5'-ATGGCATGGCTTACACCACC-3', antisentido, 5'-

GAGGCCAATTTTGTCTCCACA-3'. El ARN total (1×10^6 células) se extrajo con TRIzol® (Life Technologies, Gibco) y se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm. La reacción de transcripción reversa se realizó tomando 2 µg del ARN total e incubando con 0,5 µg de oligo (dT) (Promega) por 5 minutos a 70 °C y se dejó reposar 5 minutos en hielo. Las muestras se incubaron 1 hora a 42 °C con 25 U del inhibidor de ribonucleasas (RNasin) (Promega), 1 mM deoxinucleótidos trifosfatos (Invitrogen, Life Technologies) y 200 U M-MLV de transcriptasa reversa (Promega) en el *buffer* de reacción M-MLV 5X (Promega). La qPCR se realizó en un volumen total de 25 µl en *buffer* de PCR (Invitrogen, Life Technologies). Se incubaron 15 ng de ADNc con SYBR® *Green PCR Core Reagents* y los *primers* sentido y antisentido. Las condiciones utilizadas fueron 1 ciclo de 10 minutos a 95 °C seguido por 40 ciclos que consistieron en 15 segundos a 95 °C seguido por 1 minuto a 60 °C. Para analizar la expresión relativa del gen de *TLR7* y *TLR4*, se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ previamente descrito (186), y *HPRT1* como gen constitutivo.

9. Western Blot

Para la detección de IκB-α fosforilado, DCs purificadas de bazo de 3 ratones/grupo fueron incubadas con 20 µg/mL de polyU/DO por 0, 15, 30 y 60 minutos. Luego, las células fueron lavadas con PBS para remover las proteínas séricas. Para obtener los lisados celulares, se utilizó solución *buffer* SDS y se llevaron a ebullición por 3 minutos. Los lisados de 5×10^5 células fueron sembrados en geles de poliacrilamida al 15 % y sometidos a electroforesis en un aparato Miniprotean III (Bio-Rad) a 150 V (voltaje constante). Como control, se corrió en paralelo un marcador molecular preteñido para un amplio rango de pesos moleculares (Bio-Rad).

Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Millipore) por 60-80 minutos a 100 V (voltaje constante). Luego se bloquearon las membranas con PBS al 3-5 % leche descremada por 2 horas a temperatura ambiente y se incubaron posteriormente con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron lavados y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa disuelto en PBS-Tween-leche descremada por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción se reveló con *SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate* (Pierce, Rockford, IL). Como control de carga se utilizó β-actina.

Para los experimentos de degradación de OVA, 5×10^5 DCs purificadas de bazo de 3 ratones/grupo fueron pulsadas por 1 hora a 37°C con OVA + polyU/DO. Para remover los restos de Ag las DCs fueron posteriormente lavadas 3 veces con medio de cultivo e incubadas libres de Ag a 37°C por 0 y 4 horas. Luego se obtuvieron los lisados celulares como se explicó anteriormente y la siembra se realizó en geles

de poliacrilamida al 10 %. Corrida electroforética y transferencia se realizaron como anteriormente y la membrana se incubó con 2 anticuerpos primarios simultáneamente. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario y la señal se detectó mediante fluorescencia infrarroja utilizando un equipo Odyssey. Como control de carga se utilizó calreticulina.

TABLA 4. Anticuerpos empleados en Western Blot

Especificidad	Marca	Empresa/Origen
Phospho- IκB-α de conejo	S/marca	Cell Signaling
β- Actina de ratón	s/marca	Sigma-Aldrich
Calreticulina de conejo	S/marca	ABR Affinity BioReagents
OVA de conejo	S/marca	Natocor
Anti IgG de conejo	POD	Cell Signaling
Anti IgG de ratón	POD	Sigma-Aldrich
Anti IgG de conejo	IRDye 800CW	LI-COR Biosciences

POD: peroxidasa.

10. Citometría de flujo

Determinación de antígenos de superficie

Entre $1-1,5 \times 10^6$ células fueron incubadas con anticuerpos anti-CD16/CD32 (para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos a los receptores de la porción Fc de las inmunoglobulinas) más los anticuerpos monoclonales correspondientes (disueltos de acuerdo a concentraciones pre establecidas en la solución *buffer* para citometría: HBSS - 2 % SFB – 5 mM EDTA y 0,1 % de azida sódica) durante 20 minutos a 4 °C. Se lavó con la solución *buffer* a 4 °C. Posteriormente, las células fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson Argentina S.R.L). Finalmente, los datos obtenidos se analizaron con el programa FlowJo (Tree Star, Inc.) o FCS Express V3 (DeNovo Software).

TABLA 5. Anticuerpos empleados en citometría de flujo

Especificidad	Clon	Marca	Empresa/Origen
CD3	145-2C11	PE-Cy7	BD Biosciences
		APC	BD Biosciences
	17A2	APC-eFluor 780	BD Biosciences
B220	RA3-6B2	APC	BD Biosciences
CD11c	HL-3	PE	BD Biosciences
		APC	BD Biosciences
		FITC	BD Biosciences
		PE-Cy7	e-Bioscience
		APC-Cy7	e-Bioscience
CD8 α	53-6.7	PE	BD Biosciences
		APC	BD Biosciences
CD8 β	H35- 17.2	PE	BD Biosciences
PDCA-1 (CD317)	129c	PE	e-Bioscience
CD32/CD16	2.4G2	s/ marca	Hibridoma <i>in house</i>
CD40	HM40-3	FITC	BD Biosciences
CD80 (B7.1)	16-10A1	FITC	BD Biosciences
CD86 (B7.2)	GL-1	FITC	BD Biosciences
I-A ^b (MHC II)	25-9-17	FITC	BD Biosciences
	M5/114.15.2	PE	BD Biosciences
CD25 (IL-2R)	PC61.5	PE-Cy7	e-Bioscience

11. Inmunofluorescencia

Las DCs puras fueron resuspendidas en 100 μ l de *buffer* MACS en una concentración de 0.5 a 1 millón/ 100 μ l y posteriormente aplicadas sobre portaobjetos mediante centrifugación a 600-800 rpm durante 3 minutos (Cytospin 2, Shandon, Astmoor, United Kingdom). Posteriormente se fijó con metanol durante 10 minutos a -20°C. Luego de 2 lavados con PBS se procedió a permeabilizar con Tritón X-100 al 0,01 % en PBS por 10 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS y luego se realizó el bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda con PBS conteniendo 4 % SFB y Tween 20 (0,05 %). Posterior al lavado, se incubó con anticuerpo primario anti NF- κ B p65 de conejo (e-Bioscience) durante toda la

noche a 4°C. Luego con anticuerpo secundario anti IgG conejo – Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) y los núcleos marcados con Hoescht 33258 (Molecular Probes) durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Finalmente, se realizaron 3 lavados en PBS, se cubrió con cubreobjetos con medio de montaje (MOBIOL) y se analizó usando un microscopio óptico de fluorescencia Nikon TE2000-U.

12. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism version 5.00 (Graph-Pad Software, San Diego, CA). Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. Se utilizó la prueba t de Student para comparar ambos grupos. Todas las diferencias fueron consideradas como estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

SOLUCIONES**1. Soluciones *buffer****a. Solución *buffer* salino de fosfatos (PBS) pH 7,2-7,4*

NaCl	7,20 g
KH ₂ PO ₄	0,43 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	14,80 g
H ₂ O.....	c.s.p. 1000 ml

b. Solución salina balanceada de Hank's (HBSS)

KCl.....	0,40 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
Na ₂ HPO ₄	0,05 g
NaCl	8,00 g
Glucosa	1,00 g
H ₂ O.....	c.s.p. 1000 ml

2. Soluciones utilizadas para contar células*a. Líquido de Turk*

Solución de violeta de genciana o azul de metileno en ácido acético glacial al 3 % en H₂O.

b. Azul de tripán

Solución A: 0,05 % de azul de tripán en H₂O.

Solución B: 0,425 % de NaCl en H₂O.

Solución de trabajo: 1 ml de solución B + 4 ml de solución A + 45 ml de PBS.

3. Soluciones madres utilizadas en citometría de flujo*a. EDTA (Cicarrelli)*

Solución 0,5 M en H₂O, pH 8.

b. Azida sódica (Sigma-Aldrich)

Solución 10 % en H₂O.

4. Soluciones utilizadas para mediciones de citoquinas por ELISA*a. Buffer fosfato pH 9 (Sensibilización)*

Solución A: 0,1 M de Na₂HPO₄ en H₂O.

Solución B: 0,1 M de NaH₂PO₄ en H₂O.

Ajustar el pH de la solución A a pH=9 con la solución B.

b. Solución de bloqueo

PBS con SFB al 10 %. Filtrar con membrana de 0,22 µm.

c. Solución de lavado

PBS con Tween 20 al 0,05 %.

d. Solución para disolver las muestras

PBS con SFB al 10 % más Tween 20 al 0,05 %.

5. Soluciones utilizadas en SDS-PAGE y Western blot

a. Tampón para sembrar las muestras (sample buffer)6X

Tris-HCl 0,5M pH 6,8.....	2,1 ml
Glicerol	0,9 ml
SDS.....	0,3 g
Azul de Bromofenol.....	0,36 g

En el momento de usar se agregan 20 μ l de 2-ME para 100 μ l de preparación y 10 μ l DTT 10X

b. Soluciones para preparar los geles

Tris-HCl pH 8,8 (Tris 1,5M = 18,16 g/ 100 ml) – Llevar a pH con HCl.

Tris-HCl pH 6,8 (Tris 0,5M = 6,05 g/ 100 ml) – Llevar a pH con HCl puro.

SDS 10 %. Conservar a 4°C.

Acrilamida/ Bisacrilamida 30 %:

Acrilamida.....	14,6 g
Bisacrilamida	0,4 g
H ₂ O.....	c.s.p. 50 ml
Persulfato de amonio	10 %

c. Tampón para la corrida electroforética (1X pH 8,3)

Tris	3,0 g
Glicina	14,4 g
SDS.....	1,0 g
H ₂ O.....	c.s.p. 1000 ml

d. Tampón para la transferencia (1X pH 8,1-8,4)

Tris 3,0 g

Glicina 14,4 g

Metanol 200 ml

H₂O..... c.s.p. 1000 ml

BIBLIOGRAFÍA

1. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989;54 Pt 1:1-13. PubMed PMID: 2700931. Epub 1989/01/01. eng.
2. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):805-20. PubMed PMID: 20303872.
3. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science.* 2010 Jan 15;327(5963):291-5. PubMed PMID: 20075244. Epub 2010/01/16. eng.
4. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010 May;11(5):373-84. PubMed PMID: 20404851. Epub 2010/04/21. eng.
5. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:229-65. PubMed PMID: 19302040. Epub 2009/03/24. eng.
6. Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2009 Jan;227(1):221-33. PubMed PMID: 19120487. Epub 2009/01/06. eng.
7. Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol.* 2011 Apr 23;29:185-214. PubMed PMID: 21219183. Epub 2011/01/12. eng.
8. Schulz O, Diebold SS, Chen M, Naslund TI, Nolte MA, Alexopoulou L, et al. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature.* 2005 Feb 24;433(7028):887-92. PubMed PMID: 15711573. Epub 2005/02/16. eng.
9. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1529-31. PubMed PMID: 14976261. Epub 2004/02/21. eng.
10. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1526-9. PubMed PMID: 14976262. Epub 2004/02/21. eng.
11. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 13;101(15):5598-603. PubMed PMID: 15034168. Pubmed Central PMCID: 397437. Epub 2004/03/23. eng.
12. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol.* 2002 Feb;3(2):196-200. PubMed PMID: 11812998. Epub 2002/01/29. eng.
13. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):783-801. PubMed PMID: 16497588. Epub 2006/02/25. eng.
14. Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, et al. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med.* 2005 Mar;11(3):263-70. PubMed PMID: 15723075. Epub 2005/02/22. eng.

15. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*. 2010 Mar 26;32(3):305-15. PubMed PMID: 20346772. Epub 2010/03/30. eng.
16. Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, Ploegh HL. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature*. 2008 Mar 13;452(7184):234-8. PubMed PMID: 18305481. Epub 2008/02/29. eng.
17. Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008 Nov;1143:1-20. PubMed PMID: 19076341.
18. Fukui R, Saitoh S, Matsumoto F, Kozuka-Hata H, Oyama M, Tabeta K, et al. Unc93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing. *J Exp Med*. 2009 Jun 8;206(6):1339-50. PubMed PMID: 19451267. Pubmed Central PMCID: 2715051. Epub 2009/05/20. eng.
19. Ewald SE, Lee BL, Lau L, Wickliffe KE, Shi GP, Chapman HA, et al. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature*. 2008 Dec 4;456(7222):658-62. PubMed PMID: 18820679. Pubmed Central PMCID: 2596276. Epub 2008/09/30. eng.
20. Park B, Brinkmann MM, Spooner E, Lee CC, Kim YM, Ploegh HL. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat Immunol*. 2008 Dec;9(12):1407-14. PubMed PMID: 18931679. Pubmed Central PMCID: 2735466. Epub 2008/10/22. eng.
21. Asagiri M, Hirai T, Kunigami T, Kamano S, Gober HJ, Okamoto K, et al. Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science*. 2008 Feb 1;319(5863):624-7. PubMed PMID: 18239127. Epub 2008/02/02. eng.
22. Negishi H, Fujita Y, Yanai H, Sakaguchi S, Ouyang X, Shinohara M, et al. Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 10;103(41):15136-41. PubMed PMID: 17018642. Pubmed Central PMCID: 1586247. Epub 2006/10/05. eng.
23. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*. 2005 Mar 10;434(7030):243-9. PubMed PMID: 15665823. Epub 2005/01/25. eng.
24. Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, et al. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):1061-8. PubMed PMID: 15361868. Epub 2004/09/14. eng.
25. Shinohara ML, Lu L, Bu J, Werneck MB, Kobayashi KS, Glimcher LH, et al. Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol*. 2006 May;7(5):498-506. PubMed PMID: 16604075. Epub 2006/04/11. eng.
26. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*. 2005 Apr 7;434(7034):772-7. PubMed PMID: 15800576. Epub 2005/04/01. eng.

27. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52. PubMed PMID: 9521319. Epub 1998/04/01. eng.
28. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jan 8;99(1):351-8. PubMed PMID: 11773639. Pubmed Central PMCID: 117564.
29. Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Aspod C, Cao T, Matsui T, et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev*. 2007 Oct;219:118-42. PubMed PMID: 17850486.
30. Qi H, Egen JG, Huang AY, Germain RN. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science*. 2006 Jun 16;312(5780):1672-6. PubMed PMID: 16778060.
31. Jego G, Pascual V, Palucka AK, Banchereau J. Dendritic cells control B cell growth and differentiation. *Current directions in autoimmunity*. 2005;8:124-39. PubMed PMID: 15564719.
32. Merad M, Manz MG. Dendritic cell homeostasis. *Blood*. 2009 Apr 9;113(15):3418-27. PubMed PMID: 19176316. Pubmed Central PMCID: 2668851. Epub 2009/01/30. eng.
33. Naik SH, Metcalf D, van Nieuwenhuijze A, Wicks I, Wu L, O'Keeffe M, et al. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol*. 2006 Jun;7(6):663-71. PubMed PMID: 16680143. Epub 2006/05/09. eng.
34. Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sanchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:293-316. PubMed PMID: 18045026. Epub 2007/11/30. eng.
35. Iwasaki A. Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:381-418. PubMed PMID: 17378762. Epub 2007/03/24. eng.
36. Brocker T, Riedinger M, Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med*. 1997 Feb 3;185(3):541-50. PubMed PMID: 9053454. Pubmed Central PMCID: 2196043. Epub 1997/02/03. eng.
37. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol*. 2004 Dec;5(12):1219-26. PubMed PMID: 15549123. Epub 2004/11/19. eng.
38. del Hoyo GM, Martin P, Vargas HH, Ruiz S, Arias CF, Ardavin C. Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature*. 2002 Feb 28;415(6875):1043-7. PubMed PMID: 11875574. Epub 2002/03/05. eng.
39. Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2001 Nov;1(2):126-34. PubMed PMID: 11905820. Epub 2002/03/22. eng.
40. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jun;6(6):476-83. PubMed PMID: 16691244.

41. Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med.* 1976 May 1;143(5):1283-8. PubMed PMID: 1083422. Pubmed Central PMCID: 2190184. Epub 1976/05/01. eng.
42. Kurts C, Robinson BW, Knolle PA. Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2010 Jun;10(6):403-14. PubMed PMID: 20498667. Epub 2010/05/26. eng.
43. Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev.* 2004 Jun;199:9-26. PubMed PMID: 15233723. Epub 2004/07/06. eng.
44. Guermonprez P, Amigorena S. Pathways for antigen cross presentation. *Springer Semin Immunopathol.* 2005 Jan;26(3):257-71. PubMed PMID: 15592842. Epub 2004/12/14. eng.
45. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 2001 Aug 10;106(3):255-8. PubMed PMID: 11509172. Epub 2001/08/18. eng.
46. Moron G, Rueda P, Casal I, Leclerc C. CD8alpha- CD11b+ dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8+ T cells and subsequently express CD8alpha and CD205 molecules. *J Exp Med.* 2002 May 20;195(10):1233-45. PubMed PMID: 12021304. Pubmed Central PMCID: 2193750. Epub 2002/05/22. eng.
47. Reis e Sousa C, Germain RN. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J Exp Med.* 1995 Sep 1;182(3):841-51. PubMed PMID: 7650490. Pubmed Central PMCID: 2192173. Epub 1995/09/01. eng.
48. Rock KL. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today.* 1996 Mar;17(3):131-7. PubMed PMID: 8820271. Epub 1996/03/01. eng.
49. Giodini A, Rahner C, Cresswell P. Receptor-mediated phagocytosis elicits cross-presentation in nonprofessional antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Mar 3;106(9):3324-9. PubMed PMID: 19218463. Pubmed Central PMCID: 2642664. Epub 2009/02/17. eng.
50. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2012 Aug;12(8):557-69. PubMed PMID: 22790179. Epub 2012/07/14. eng.
51. Firat E, Saveanu L, Aichele P, Staeheli P, Huai J, Gaedicke S, et al. The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation. *J Immunol.* 2007 Feb 15;178(4):2241-8. PubMed PMID: 17277129.
52. Saveanu L, Carroll O, Weimershaus M, Guermonprez P, Firat E, Lindo V, et al. IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science.* 2009 Jul 10;325(5937):213-7. PubMed PMID: 19498108.
53. Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science.* 1995 Jan 13;267(5195):243-6. PubMed PMID: 7809629.

54. Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):397-402. PubMed PMID: 14508489.
55. Burgdorf S, Scholz C, Kautz A, Tampe R, Kurts C. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat Immunol*. 2008 May;9(5):558-66. PubMed PMID: 18376402.
56. Rock KL, Shen L. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev*. 2005 Oct;207:166-83. PubMed PMID: 16181335.
57. Shen L, Sigal LJ, Boes M, Rock KL. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity*. 2004 Aug;21(2):155-65. PubMed PMID: 15308097.
58. Nair-Gupta P, Blander JM. An Updated View of the Intracellular Mechanisms Regulating Cross-Presentation. *Front Immunol*. 2013;4:401. PubMed PMID: 24319447. Pubmed Central PMCID: 3837292.
59. Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta ES. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science*. 2005 Mar 11;307(5715):1630-4. PubMed PMID: 15761154.
60. Savina A, Jancic C, Hugues S, Guermonprez P, Vargas P, Moura IC, et al. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell*. 2006 Jul 14;126(1):205-18. PubMed PMID: 16839887.
61. Mantegazza AR, Savina A, Vermeulen M, Perez L, Geffner J, Hermine O, et al. NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood*. 2008 Dec 1;112(12):4712-22. PubMed PMID: 18682599. Pubmed Central PMCID: 2597138.
62. Ackerman AL, Giodini A, Cresswell P. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity*. 2006 Oct;25(4):607-17. PubMed PMID: 17027300.
63. Norbury CC, Basta S, Donohue KB, Tschärke DC, Princiotta MF, Berglund P, et al. CD8+ T cell cross-priming via transfer of proteasome substrates. *Science*. 2004 May 28;304(5675):1318-21. PubMed PMID: 15166379.
64. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jan;7(1):19-30. PubMed PMID: 17170756. Epub 2006/12/16. eng.
65. del Rio ML, Rodriguez-Barbosa JI, Kremmer E, Forster R. CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*. 2007 Jun 1;178(11):6861-6. PubMed PMID: 17513734. Epub 2007/05/22. eng.
66. Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, et al. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009 May;10(5):488-95. PubMed PMID: 19349986. Epub 2009/04/08. eng.

67. Heath WR, Carbone FR. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat Immunol.* 2009 Dec;10(12):1237-44. PubMed PMID: 19915624. Epub 2009/11/17. eng.
68. McDonnell AM, Prosser AC, van Bruggen I, Robinson BW, Currie AJ. CD8alpha+ DC are not the sole subset cross-presenting cell-associated tumor antigens from a solid tumor. *Eur J Immunol.* 2010 Jun;40(6):1617-27. PubMed PMID: 20373290. Epub 2010/04/08. eng.
69. Ballesteros-Tato A, Leon B, Lund FE, Randall TD. Temporal changes in dendritic cell subsets, cross-priming and costimulation via CD70 control CD8(+) T cell responses to influenza. *Nat Immunol.* 2010 Mar;11(3):216-24. PubMed PMID: 20098442. Pubmed Central PMCID: 2822886. Epub 2010/01/26. eng.
70. den Haan JM, Bevan MJ. Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J Exp Med.* 2002 Sep 16;196(6):817-27. PubMed PMID: 12235214. Pubmed Central PMCID: 2194052. Epub 2002/09/18. eng.
71. Chung Y, Chang JH, Kweon MN, Rennert PD, Kang CY. CD8alpha-11b+ dendritic cells but not CD8alpha+ dendritic cells mediate cross-tolerance toward intestinal antigens. *Blood.* 2005 Jul 1;106(1):201-6. PubMed PMID: 15774618. Epub 2005/03/19. eng.
72. Lutz MB, Kurts C. Induction of peripheral CD4+ T-cell tolerance and CD8+ T-cell cross-tolerance by dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2009 Sep;39(9):2325-30. PubMed PMID: 19701895. Epub 2009/08/25. eng.
73. Watts C, Zaru R, Prescott AR, Wallin RP, West MA. Proximal effects of Toll-like receptor activation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 2007 Feb;19(1):73-8. PubMed PMID: 17142025. Epub 2006/12/05. eng.
74. Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol.* 2003 Oct;74(4):479-85. PubMed PMID: 12960260. Epub 2003/09/10. eng.
75. Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2003 Aug;15(4):396-401. PubMed PMID: 12900270. Epub 2003/08/06. eng.
76. Hemmi H, Akira S. TLR signalling and the function of dendritic cells. *Chem Immunol Allergy.* 2005;86:120-35. PubMed PMID: 15976491. Epub 2005/06/25. eng.
77. Mouries J, Moron G, Schlecht G, Escriou N, Dadaglio G, Leclerc C. Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naïve T cells in vivo after TLR activation. *Blood.* 2008 Nov 1;112(9):3713-22. PubMed PMID: 18698004. Pubmed Central PMCID: 2572799. Epub 2008/08/14. eng.
78. Maurer T, Heit A, Hochrein H, Ampenberger F, O'Keeffe M, Bauer S, et al. CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2002 Aug;32(8):2356-64. PubMed PMID: 12209649. Epub 2002/09/05. eng.
79. Datta SK, Redecke V, Prilliman KR, Takabayashi K, Corr M, Tallant T, et al. A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2003 Apr 15;170(8):4102-10. PubMed PMID: 12682240. Epub 2003/04/19. eng.

80. Hoebe K, Janssen EM, Kim SO, Alexopoulou L, Flavell RA, Han J, et al. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat Immunol.* 2003 Dec;4(12):1223-9. PubMed PMID: 14625548. Epub 2003/11/20. eng.
81. Gil-Torregrosa BC, Lennon-Dumenil AM, Kessler B, Guermonprez P, Ploegh HL, Fruci D, et al. Control of cross-presentation during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 2004 Feb;34(2):398-407. PubMed PMID: 14768044. Epub 2004/02/10. eng.
82. Datta SK, Raz E. Induction of antigen cross-presentation by Toll-like receptors. *Springer Semin Immunopathol.* 2005 Jan;26(3):247-55. PubMed PMID: 15609002. Epub 2004/12/21. eng.
83. Weck MM, Grunebach F, Werth D, Sinzger C, Bringmann A, Brossart P. TLR ligands differentially affect uptake and presentation of cellular antigens. *Blood.* 2007 May 1;109(9):3890-4. PubMed PMID: 17218388. Epub 2007/01/16. eng.
84. Durand V, Wong SY, Tough DF, Le Bon A. Shaping of adaptive immune responses to soluble proteins by TLR agonists: a role for IFN-alpha/beta. *Immunol Cell Biol.* 2004 Dec;82(6):596-602. PubMed PMID: 15550117. Epub 2004/11/20. eng.
85. Johnston D, Bystryn JC. Topical imiquimod is a potent adjuvant to a weakly-immunogenic protein prototype vaccine. *Vaccine.* 2006 Mar 10;24(11):1958-65. PubMed PMID: 16310898. Epub 2005/11/29. eng.
86. Rajagopal D, Paturel C, Morel Y, Uematsu S, Akira S, Diebold SS. Plasmacytoid dendritic cell-derived type I interferon is crucial for the adjuvant activity of Toll-like receptor 7 agonists. *Blood.* 2010 Mar 11;115(10):1949-57. PubMed PMID: 20065291. Pubmed Central PMCID: 2837337. Epub 2010/01/13. eng.
87. Wei J, Waithman J, Lata R, Mifsud NA, Cebon J, Kay T, et al. Influenza A infection enhances cross-priming of CD8+ T cells to cell-associated antigens in a TLR7- and type I IFN-dependent fashion. *J Immunol.* 2010 Nov 15;185(10):6013-22. PubMed PMID: 20956347. Epub 2010/10/20. eng.
88. Crespo MI, Zacca ER, Nunez NG, Ranocchia RP, Maccioni M, Maletto BA, et al. TLR7 Triggering with Polyuridylic Acid Promotes Cross-Presentation in CD8alpha+ Conventional Dendritic Cells by Enhancing Antigen Preservation and MHC Class I Antigen Permanence on the Dendritic Cell Surface. *J Immunol.* 2013 Feb 1;190(3):948-60. PubMed PMID: 23284054. Epub 2013/01/04. eng.
89. Miller RA. The aging immune system: primer and prospectus. *Science.* 1996 Jul 5;273(5271):70-4. PubMed PMID: 8658199. Epub 1996/07/05. eng.
90. Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* 2004 Feb;5(2):133-9. PubMed PMID: 14749784. Epub 2004/01/30. eng.
91. Cambier J. Immunosenescence: a problem of lymphopoiesis, homeostasis, microenvironment, and signaling. *Immunol Rev.* 2005 Jun;205:5-6. PubMed PMID: 15882340. Epub 2005/05/11. eng.

92. Kovacs EJ, Palmer JL, Fortin CF, Fulop T, Jr., Goldstein DR, Linton PJ. Aging and innate immunity in the mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors. *Trends Immunol.* 2009 Jul;30(7):319-24. PubMed PMID: 19541536. Pubmed Central PMCID: 2898122. Epub 2009/06/23. eng.
93. Agrawal A, Gupta S. Impact of aging on dendritic cell functions in humans. *Ageing Res Rev.* 2011 Jul;10(3):336-45. PubMed PMID: 20619360. Pubmed Central PMCID: 3030666. Epub 2010/07/14. eng.
94. Wong CP, Magnusson KR, Ho E. Aging is associated with altered dendritic cells subset distribution and impaired proinflammatory cytokine production. *Exp Gerontol.* 2010 Feb;45(2):163-9. PubMed PMID: 19932744. Epub 2009/11/26. eng.
95. Paul WE. *Fundamental immunology* / editor, William E. Paul. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.
96. Jing Y, Shaheen E, Drake RR, Chen N, Gravenstein S, Deng Y. Aging is associated with a numerical and functional decline in plasmacytoid dendritic cells, whereas myeloid dendritic cells are relatively unaltered in human peripheral blood. *Hum Immunol.* 2009 Oct;70(10):777-84. PubMed PMID: 19596035. Epub 2009/07/15. eng.
97. Maletto B, Moron G, Pistoresi-Palencia MC. Innate Immune System Modulation During Aging: Contributions of Macrophages and Dendritic Cells. *Current Immunology Reviews.* 2010;6:329-38.
98. Renshaw M, Rockwell J, Engleman C, Gewirtz A, Katz J, Sambhara S. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol.* 2002 Nov 1;169(9):4697-701. PubMed PMID: 12391175. Epub 2002/10/23. eng.
99. Chen WH, Kozlovsky BF, Effros RB, Grubeck-Loebenstien B, Edelman R, Sztein MB. Vaccination in the elderly: an immunological perspective. *Trends Immunol.* 2009 Jul;30(7):351-9. PubMed PMID: 19540808. Epub 2009/06/23. eng.
100. Maue AC, Yager EJ, Swain SL, Woodland DL, Blackman MA, Haynes L. T-cell immunosenescence: lessons learned from mouse models of aging. *Trends Immunol.* 2009 Jul;30(7):301-5. PubMed PMID: 19541537. Epub 2009/06/23. eng.
101. Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol.* 2010 Aug;22(4):507-13. PubMed PMID: 20667703.
102. Haynes L, Maue AC. Effects of aging on T cell function. *Curr Opin Immunol.* 2009 Aug;21(4):414-7. PubMed PMID: 19500967. Epub 2009/06/09. eng.
103. Goronzy JJ, Weyand CM. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nat Immunol.* 2013 May;14(5):428-36. PubMed PMID: 23598398.
104. Geiger H, de Haan G, Florian MC. The ageing haematopoietic stem cell compartment. *Nat Rev Immunol.* 2013 May;13(5):376-89. PubMed PMID: 23584423.
105. Dykstra B, Olthof S, Schreuder J, Ritsema M, de Haan G. Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2011 Dec 19;208(13):2691-703. PubMed PMID: 22110168. Pubmed Central PMCID: 3244040.

106. Pang WW, Price EA, Sahoo D, Beerman I, Maloney WJ, Rossi DJ, et al. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Dec 13;108(50):20012-7. PubMed PMID: 22123971. Pubmed Central PMCID: 3250139.
107. Abbas AK, Lichtman, A. H. *Inmunología celular y molecular*. 5a ed: Saunders Elsevier; 2004.
108. Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E, Signer RA. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat Rev Immunol*. 2009 Jan;9(1):57-62. PubMed PMID: 19104499.
109. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B. The aging of the immune system. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2009 Nov;22(11):1041-50. PubMed PMID: 19624493.
110. Nikolich-Zugich J. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jul;8(7):512-22. PubMed PMID: 18469829. Epub 2008/05/13. eng.
111. Garg SK, Delaney C, Toubai T, Ghosh A, Reddy P, Banerjee R, et al. Aging is associated with increased regulatory T-cell function. *Aging Cell*. 2013 Dec 10. PubMed PMID: 24325345.
112. Kogut I, Scholz JL, Cancro MP, Cambier JC. B cell maintenance and function in aging. *Seminars in immunology*. 2012 Oct;24(5):342-9. PubMed PMID: 22560930.
113. Chong Y, Ikematsu H, Yamaji K, Nishimura M, Nabeshima S, Kashiwagi S, et al. CD27(+) (memory) B cell decrease and apoptosis-resistant CD27(-) (naive) B cell increase in aged humans: implications for age-related peripheral B cell developmental disturbances. *International immunology*. 2005 Apr;17(4):383-90. PubMed PMID: 15724062.
114. Weksler ME, Szabo P. The effect of age on the B-cell repertoire. *J Clin Immunol*. 2000 Jul;20(4):240-9. PubMed PMID: 10939711.
115. Johnson SA, Cambier JC. Ageing, autoimmunity and arthritis: senescence of the B cell compartment - implications for humoral immunity. *Arthritis research & therapy*. 2004;6(4):131-9. PubMed PMID: 15225355. Pubmed Central PMCID: 464870.
116. Siegrist CA, Aspinall R. B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nat Rev Immunol*. 2009 Mar;9(3):185-94. PubMed PMID: 19240757.
117. Kuranda K, Vargaftig J, de la Rochere P, Dosquet C, Charron D, Bardin F, et al. Age-related changes in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Aging Cell*. 2011 Jun;10(3):542-6. PubMed PMID: 21418508.
118. Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell*. 2004 Aug;3(4):161-7. PubMed PMID: 15268749.
119. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev*. 2007 Jan;128(1):92-105. PubMed PMID: 17116321. Epub 2006/11/23. eng.

120. De Martinis M, Modesti M, Ginaldi L. Phenotypic and functional changes of circulating monocytes and polymorphonuclear leucocytes from elderly persons. *Immunology and cell biology*. 2004 Aug;82(4):415-20. PubMed PMID: 15283852.
121. Tseng CW, Kyme PA, Arruda A, Ramanujan VK, Tawackoli W, Liu GY. Innate immune dysfunctions in aged mice facilitate the systemic dissemination of methicillin-resistant *S. aureus*. *PLoS One*. 2012;7(7):e41454. PubMed PMID: 22844481. Pubmed Central PMCID: 3406035.
122. Fulop T, Larbi A, Douziech N, Fortin C, Guerard KP, Lesur O, et al. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell*. 2004 Aug;3(4):217-26. PubMed PMID: 15268755.
123. Wenisch C, Patruta S, Daxbock F, Krause R, Horl W. Effect of age on human neutrophil function. *J Leukoc Biol*. 2000 Jan;67(1):40-5. PubMed PMID: 10647996.
124. Murciano C, Yanez A, O'Connor JE, Gozalbo D, Gil ML. Influence of aging on murine neutrophil and macrophage function against *Candida albicans*. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2008 Jul;53(2):214-21. PubMed PMID: 18445021.
125. Beli E, Clinthorne JF, Duriancik DM, Hwang I, Kim S, Gardner EM. Natural killer cell function is altered during the primary response of aged mice to influenza infection. *Mech Ageing Dev*. 2011 Oct;132(10):503-10. PubMed PMID: 21893080. Pubmed Central PMCID: 3185116.
126. Fang M, Roscoe F, Sigal LJ. Age-dependent susceptibility to a viral disease due to decreased natural killer cell numbers and trafficking. *J Exp Med*. 2010 Oct 25;207(11):2369-81. PubMed PMID: 20876312. Pubmed Central PMCID: 2964566.
127. Nogusa S, Murasko DM, Gardner EM. Differential effects of stimulatory factors on natural killer cell activities of young and aged mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012 Sep;67(9):947-54. PubMed PMID: 22454373. Pubmed Central PMCID: 3436087.
128. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):461-9. PubMed PMID: 18650461. Pubmed Central PMCID: 2481557.
129. Le Garff-Tavernier M, Beziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, et al. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell*. 2010 Aug;9(4):527-35. PubMed PMID: 20477761.
130. Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T. Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Seminars in immunology*. 2012 Oct;24(5):331-41. PubMed PMID: 22560929.
131. Mocchegiani E, Malavolta M. NK and NKT cell functions in immunosenescence. *Aging Cell*. 2004 Aug;3(4):177-84. PubMed PMID: 15268751.
132. Plackett TP, Boehmer ED, Faunce DE, Kovacs EJ. Aging and innate immune cells. *J Leukoc Biol*. 2004 Aug;76(2):291-9. PubMed PMID: 15039467.

133. Faunce DE, Palmer JL, Paskowicz KK, Witte PL, Kovacs EJ. CD1d-restricted NKT cells contribute to the age-associated decline of T cell immunity. *J Immunol*. 2005 Sep 1;175(5):3102-9. PubMed PMID: 16116199.
134. DelaRosa O, Tarazona R, Casado JG, Alonso C, Ostos B, Pena J, et al. Valpha24+ NKT cells are decreased in elderly humans. *Exp Gerontol*. 2002 Jan-Mar;37(2-3):213-7. PubMed PMID: 11772506.
135. Peralbo E, DelaRosa O, Gayoso I, Pita ML, Tarazona R, Solana R. Decreased frequency and proliferative response of invariant Valpha24Vbeta11 natural killer T (iNKT) cells in healthy elderly. *Biogerontology*. 2006 Oct-Dec;7(5-6):483-92. PubMed PMID: 16953330.
136. Wu D, Marko M, Claycombe K, Paulson KE, Meydani SN. Ceramide-induced and age-associated increase in macrophage COX-2 expression is mediated through up-regulation of NF-kappa B activity. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Mar 28;278(13):10983-92. PubMed PMID: 12529332.
137. Liscovsky MV, Ranocchia RP, Alignani DO, Gorlino CV, Moron G, Maletto BA, et al. CpG-ODN+IFN-gamma confer pro- and anti-inflammatory properties to peritoneal macrophages in aged mice. *Exp Gerontol*. 2011 Jun;46(6):462-7. PubMed PMID: 21316438.
138. Hearps AC, Martin GE, Angelovich TA, Cheng WJ, Maisa A, Landay AL, et al. Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function. *Aging Cell*. 2012 Oct;11(5):867-75. PubMed PMID: 22708967.
139. Aprahamian T, Takemura Y, Goukassian D, Walsh K. Ageing is associated with diminished apoptotic cell clearance in vivo. *Clinical and experimental immunology*. 2008 Jun;152(3):448-55. PubMed PMID: 18422728. Pubmed Central PMCID: 2453212.
140. Pereira LF, de Souza AP, Borges TJ, Bonorino C. Impaired in vivo CD4+ T cell expansion and differentiation in aged mice is not solely due to T cell defects: decreased stimulation by aged dendritic cells. *Mech Ageing Dev*. 2011 Apr;132(4):187-94. PubMed PMID: 21453718.
141. Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Gangappa S, Engleman C, Katz JM, Sambhara S. Impaired antigen-induced CD8+ T cell clonal expansion in aging is due to defects in antigen presenting cell function. *Cellular immunology*. 2004 Jun;229(2):86-92. PubMed PMID: 15474523.
142. Wong C, Goldstein DR. Impact of aging on antigen presentation cell function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2013 Aug;25(4):535-41. PubMed PMID: 23806201. Pubmed Central PMCID: 3775944.
143. Tan SY, Cavanagh LL, d'Advigor W, Shackel N, Fazekas de St Groth B, Weninger W. Phenotype and functions of conventional dendritic cells are not compromised in aged mice. *Immunology and cell biology*. 2012 Aug;90(7):722-32. PubMed PMID: 22231652.
144. Tesar BM, Walker WE, Unternaehrer J, Joshi NS, Chandele A, Haynes L, et al. Murine [corrected] myeloid dendritic cell-dependent toll-like receptor immunity is preserved with aging. *Aging Cell*. 2006 Dec;5(6):473-86. PubMed PMID: 17129212. Epub 2006/11/30. eng.

145. Grolleau-Julius A, Harning EK, Abernathy LM, Yung RL. Impaired dendritic cell function in aging leads to defective antitumor immunity. *Cancer Res.* 2008 Aug 1;68(15):6341-9. PubMed PMID: 18676859. Pubmed Central PMCID: 2575813. Epub 2008/08/05. eng.
146. Li G, Smithey MJ, Rudd BD, Nikolich-Zugich J. Age-associated alterations in CD8alpha+ dendritic cells impair CD8 T-cell expansion in response to an intracellular bacterium. *Aging Cell.* 2012 Dec;11(6):968-77. PubMed PMID: 22862959. Pubmed Central PMCID: 3533767. Epub 2012/08/07. eng.
147. Sridharan A, Esposito M, Kaushal K, Tay J, Osann K, Agrawal S, et al. Age-associated impaired plasmacytoid dendritic cell functions lead to decreased CD4 and CD8 T cell immunity. *Age.* 2011 Sep;33(3):363-76. PubMed PMID: 20953722. Pubmed Central PMCID: 3168606.
148. Gorina Y, Kelly T, Lubitz J, Hines Z. Trends in influenza and pneumonia among older persons in the United States. *Aging trends.* 2008 Feb(8):1-11. PubMed PMID: 19174855.
149. Qian F, Wang X, Zhang L, Lin A, Zhao H, Fikrig E, et al. Impaired interferon signaling in dendritic cells from older donors infected in vitro with West Nile virus. *The Journal of infectious diseases.* 2011 May 15;203(10):1415-24. PubMed PMID: 21398396. Pubmed Central PMCID: 3080893.
150. Della Bella S, Bierti L, Presicce P, Arienti R, Valenti M, Saresella M, et al. Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly. *Clin Immunol.* 2007 Feb;122(2):220-8. PubMed PMID: 17101294.
151. Agrawal A, Agrawal S, Cao JN, Su H, Osann K, Gupta S. Altered innate immune functioning of dendritic cells in elderly humans: a role of phosphoinositide 3-kinase-signaling pathway. *J Immunol.* 2007 Jun 1;178(11):6912-22. PubMed PMID: 17513740.
152. Agrawal A, Tay J, Ton S, Agrawal S, Gupta S. Increased reactivity of dendritic cells from aged subjects to self-antigen, the human DNA. *J Immunol.* 2009 Jan 15;182(2):1138-45. PubMed PMID: 19124757. Pubmed Central PMCID: 2621318.
153. Panda A, Qian F, Mohanty S, van Duin D, Newman FK, Zhang L, et al. Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J Immunol.* 2010 Mar 1;184(5):2518-27. PubMed PMID: 20100933.
154. Ligthart GJ, Corberand JX, Geertzen HG, Meinders AE, Knook DL, Hijmans W. Necessity of the assessment of health status in human immunogerontological studies: evaluation of the SENIEUR protocol. *Mech Ageing Dev.* 1990 Jul;55(1):89-105. PubMed PMID: 2205767.
155. Vanhooren V, Libert C. The mouse as a model organism in aging research: usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Res Rev.* 2013 Jan;12(1):8-21. PubMed PMID: 22543101.
156. Larange A, Antonios D, Pallardy M, Kerdine-Romer S. TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation. *J Leukoc Biol.* 2009 Apr;85(4):673-83. PubMed PMID: 19164127. Epub 2009/01/24. eng.
157. Tilstra JS, Robinson AR, Wang J, Gregg SQ, Clauson CL, Reay DP, et al. NF-kappaB inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *J Clin Invest.* 2012 Jul 2;122(7):2601-12. PubMed PMID: 22706308. Pubmed Central PMCID: 3386805. Epub 2012/06/19. eng.

158. Stout-Delgado HW, Yang X, Walker WE, Tesar BM, Goldstein DR. Aging impairs IFN regulatory factor 7 up-regulation in plasmacytoid dendritic cells during TLR9 activation. *J Immunol.* 2008 Nov 15;181(10):6747-56. PubMed PMID: 18981092. Pubmed Central PMCID: 2605669. Epub 2008/11/05. eng.
159. Keller JN, Huang FF, Markesbery WR. Decreased levels of proteasome activity and proteasome expression in aging spinal cord. *Neuroscience.* 2000;98(1):149-56. PubMed PMID: 10858621.
160. Hwang JS, Hwang JS, Chang I, Kim S. Age-associated decrease in proteasome content and activities in human dermal fibroblasts: restoration of normal level of proteasome subunits reduces aging markers in fibroblasts from elderly persons. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007 May;62(5):490-9. PubMed PMID: 17522352.
161. Tydlacka S, Wang CE, Wang X, Li S, Li XJ. Differential activities of the ubiquitin-proteasome system in neurons versus glia may account for the preferential accumulation of misfolded proteins in neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2008 Dec 3;28(49):13285-95. PubMed PMID: 19052220. Pubmed Central PMCID: 2662777.
162. Low P. The role of ubiquitin-proteasome system in ageing. *General and comparative endocrinology.* 2011 May 15;172(1):39-43. PubMed PMID: 21324320.
163. Cuanalo-Contreras K, Mukherjee A, Soto C. Role of Protein Misfolding and Proteostasis Deficiency in Protein Misfolding Diseases and Aging. *International journal of cell biology.* 2013;2013:638083. PubMed PMID: 24348562. Pubmed Central PMCID: 3855986.
164. Kuwana M. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum Immunol.* 2002 Dec;63(12):1156-63. PubMed PMID: 12480259. Epub 2002/12/14. eng.
165. Martin P, Del Hoyo GM, Anjuere F, Arias CF, Vargas HH, Fernandez LA, et al. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood.* 2002 Jul 15;100(2):383-90. PubMed PMID: 12091326. Epub 2002/07/02. eng.
166. Behrens MI, Silva M, Schmied A, Salech F, Manzur H, Rebolledo R, et al. Age-dependent increases in apoptosis/necrosis ratios in human lymphocytes exposed to oxidative stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2011 Jul;66(7):732-40. PubMed PMID: 21498432.
167. Gupta S, Young T, Yel L, Su H, Gollapudi S. Differential sensitivity of naive and subsets of memory CD4+ and CD8+ T cells to hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Genes and immunity.* 2007 Oct;8(7):560-9. PubMed PMID: 17690685.
168. Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I. Influence of ageing on Langerhans cell migration in mice: identification of a putative deficiency of epidermal interleukin-1beta. *Immunology.* 2002 Apr;105(4):466-77. PubMed PMID: 11985667. Pubmed Central PMCID: 1782675.
169. Bhushan M, Cumberbatch M, Dearman RJ, Andrew SM, Kimber I, Griffiths CE. Tumour necrosis factor-alpha-induced migration of human Langerhans cells: the influence of ageing. *The British journal of dermatology.* 2002 Jan;146(1):32-40. PubMed PMID: 11841364.

170. Ginhoux F, Merad M. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunology and cell biology*. 2010 May-Jun;88(4):387-92. PubMed PMID: 20309014.
171. Liang Y, Van Zant G, Szilvassy SJ. Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2005 Aug 15;106(4):1479-87. PubMed PMID: 15827136. Pubmed Central PMCID: 1895199.
172. Sudo K, Ema H, Morita Y, Nakauchi H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2000 Nov 6;192(9):1273-80. PubMed PMID: 11067876. Pubmed Central PMCID: 2193349.
173. Waterstrat A, Van Zant G. Effects of aging on hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Opin Immunol*. 2009 Aug;21(4):408-13. PubMed PMID: 19500962.
174. Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. Activation of innate immunity system during aging: NF- κ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Res Rev*. 2008 Apr;7(2):83-105. PubMed PMID: 17964225.
175. Budimir N, de Haan A, Meijerhof T, Waijer S, Boon L, Gostick E, et al. Critical role of TLR7 signaling in the priming of cross-protective cytotoxic T lymphocyte responses by a whole inactivated influenza virus vaccine. *PLoS One*. 2013;8(5):e63163. PubMed PMID: 23658804. Pubmed Central PMCID: 3642048. Epub 2013/05/10. eng.
176. Koyama S, Ishii KJ, Kumar H, Tanimoto T, Coban C, Uematsu S, et al. Differential role of TLR- and RLR-signaling in the immune responses to influenza A virus infection and vaccination. *J Immunol*. 2007 Oct 1;179(7):4711-20. PubMed PMID: 17878370. Epub 2007/09/20. eng.
177. Dorrington MG, Bowdish DM. Immunosenescence and novel vaccination strategies for the elderly. *Front Immunol*. 2013;4:171. PubMed PMID: 23825474. Pubmed Central PMCID: 3695377. Epub 2013/07/05. eng.
178. He XS, Holmes TH, Zhang C, Mahmood K, Kemble GW, Lewis DB, et al. Cellular immune responses in children and adults receiving inactivated or live attenuated influenza vaccines. *J Virol*. 2006 Dec;80(23):11756-66. PubMed PMID: 16971435. Pubmed Central PMCID: 1642596. Epub 2006/09/15. eng.
179. Molinari NA, Ortega-Sanchez IR, Messonnier ML, Thompson WW, Wortley PM, Weintraub E, et al. The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs. *Vaccine*. 2007 Jun 28;25(27):5086-96. PubMed PMID: 17544181. Epub 2007/06/05. eng.
180. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, Anderson LJ, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA*. 2003 Jan 8;289(2):179-86. PubMed PMID: 12517228. Epub 2003/01/09. eng.
181. Thomas PG, Keating R, Hulse-Post DJ, Doherty PC. Cell-mediated protection in influenza infection. *Emerg Infect Dis*. 2006 Jan;12(1):48-54. PubMed PMID: 16494717. Pubmed Central PMCID: 3291410. Epub 2006/02/24. eng.

182. Liu WM, Nahar TE, Jacobi RH, Gijzen K, van Beek J, Hak E, et al. Impaired production of TNF-alpha by dendritic cells of older adults leads to a lower CD8+ T cell response against influenza. *Vaccine*. 2012 Feb 21;30(9):1659-66. PubMed PMID: 22230585. Epub 2012/01/11. eng.
183. Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell*. 1994 Jan 14;76(1):17-27. PubMed PMID: 8287475. Epub 1994/01/14. eng.
184. Karttunen J, Sanderson S, Shastri N. Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jul 1;89(13):6020-4. PubMed PMID: 1378619. Pubmed Central PMCID: 402130. Epub 1992/07/01. eng.
185. Boisgerault F, Rueda P, Sun CM, Hervas-Stubbs S, Rojas M, Leclerc C. Cross-priming of T cell responses by synthetic microspheres carrying a CD8+ T cell epitope requires an adjuvant signal. *J Immunol*. 2005 Mar 15;174(6):3432-9. PubMed PMID: 15749877. Epub 2005/03/08. eng.
186. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. PubMed PMID: 11846609. Epub 2002/02/16. eng.

PUBLICACIONES

ARTÍCULOS

- **Aging impairs the ability of CD8 α ⁺ conventional dendritic cells to cross-prime CD8⁺ T cells upon stimulation with a TLR7 ligand.** Estefanía R. Zacca, María I. Crespo, Rachel P. Acland, Nicolás G. Núñez, Mariana Maccioni, Belkys A. Maletto, María C. Pistoresi-Palencia and Gabriel Morón. *Journal of Leucocyte Biology*. Trabajo enviado para su publicación.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- **PÓSTER:** AGING IMPAIRS CD8⁺ T CELL TRIGGERING BY DENDRITIC CELLS STIMULATED THROUGH TLR7. Zacca, Estefanía R; Crespo, María I; Acland, Rachel P; Núñez, Nicolás G; Maccioni, Mariana; Maletto, Belkys A; Pistoresi-Palencia, María C; Morón, Gabriel. CIBICI-CONICET. Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. LXI Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Los Cocos, Córdoba, Argentina. Noviembre 2013.
- **PÓSTER:** CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs) DE RATONES ENVEJECIDOS TIENEN UNA MENOR CAPACIDAD PARA RESPONDER A LA ESTIMULACIÓN A TRAVÉS DE LIGANDOS DE TLR7. Zacca, Estefanía; Crespo, María Inés; Maletto, Belkys; Pistoresi, María Cristina; Morón, Gabriel. CIBICI-CONICET. Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. LIX Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). San Miguel de Tucumán, Argentina. Octubre 2011.
- **PÓSTER:** SPLEEN DENDRITIC CELLS FROM OLD MICE GENERATE A LOW CYTOTOXIC RESPONSE AGAINST OVA IN YOUNG HOSTS. Zacca, Estefanía; Crespo, María Inés; Maletto, Belkys; Pistoresi, María Cristina; Morón, Gabriel. CIBICI (UNC-CONICET), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. First French-Argentine Immunology Congress (FAIC). Buenos Aires, Argentina. Noviembre 2010.
- **COMUNICACIÓN ORAL:** DENDRITIC CELLS FROM OLD MICE HAVE A DIMINISHED CAPACITY TO ACTIVATE CD8⁺ T CELLS. E Zacca, M I Crespo, M Rufail, B Maletto, M C Pistoresi, G Morón. CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. LVII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2009.
- **PÓSTER:** "DENDRITIC CELLS FROM OLD MICE HAVE A DIMINISHED CAPACITY TO ACTIVATE CD8⁺ T CELLS". E Zacca, M I Crespo, M Rufail, B Maletto, M C Pistoresi, G Morón. CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. IX Congreso Latinoamericano de Inmunología (ALAI). Viña del Mar, Chile. Noviembre 2009.

ARTÍCULOS

- **TLR7 triggering with polyuridylic promotes cross-presentation in CD8 α ⁺ conventional dendritic cells by enhancing antigen preservation and MHC class I antigen permanence on the dendritic cells surface.** María. I. Crespo, Estefanía R. Zacca, Nicolás G. Núñez, Romina P. Ranocchia, Mariana Maccioni, Belkys A. Maletto, María C. Pistoresi-Palencia and Gabriel Morón. *The Journal of Immunology*. 2013 Feb 1; 190(3):948-60

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- **PÓSTER: POLYU DIRECTLY ACTS ON CD11c⁺CD8 α ⁺ DENDRITIC CELLS THROUGH TLR7 TO STIMULATE ANTIGEN CROSS-PRESENTATION.** María Inés Crespo; Estefanía Zacca; Rachel Acland; Belkys Maletto; María Cristina Pistoresi; Gabriel Morón. CIBICI-CONICET. Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. LX Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2012.
- **PÓSTER: DENDRITIC CELLS FROM LEUKOCYTE SPECIFIC PROTEIN-1 DEFICIENT MICE HAVE A POOR CAPACITY TO INDUCE CYTOTOXIC RESPONSE".** Rachel Acland; Estefanía Zacca; María Inés Crespo; Belkys Maletto; María Cristina Pistoresi; Gabriel Morón. CIBICI-CONICET. Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. LX Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2012.
- **PÓSTER: POLY-U MODIFICA EL PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS EXÓGENOS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs) PERMITIENDO UNA MAYOR PRESENTACIÓN CRUZADA DE ANTÍGENOS.** Crespo, María Inés; Zacca, Estefanía; Maletto, Belkys; Pistoresi, María Cristina; Morón, Gabriel. CIBICI-CONICET. Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. LIX Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). San Miguel de Tucumán, Argentina. Octubre 2011.
- **PÓSTER: CAPACIDAD ADYUVANTE DE LIGANDOS DE TLR7 SOBRE LA RESPUESTA HUMORAL Y LA PRESENTACIÓN CRUZADA DE ANTÍGENOS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.** M I Crespo, E Zacca, B Maletto, M C Pistoresi, G Morón. CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. LVII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2009.





Vieja madera para arder,
viejo vino para beber,
viejos amigos en quien confiar,
viejos autores para leer.

Sir Francis Bacon.

R-T

574.29

Z

12429



12429

Esta página está disponible en los siguientes idiomas:



Abstract Licencia Creative Commons

**Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0
Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)**

Este es un resumen legible por humanos de (y no un sustituto) de la licencia .

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

Adaptar — remezclar, transformar y construir a partir del material

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .



CompartirIgual — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, debe distribuir su contribución bajo la misma licencia del original.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable .

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad o derechos morales pueden limitar la forma en que utilizan el material.