

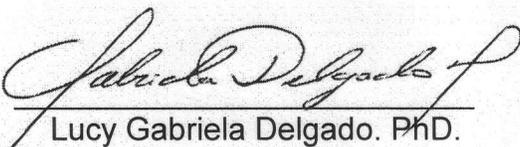
**EFFECTO INMUNOMODULADOR DEL GALACTOMANANO OBTENIDO DE
Caesalpinia spinosa Y DE LA FRACCIÓN ACUOSA Y ORGANICA DE
Petiveria alliacea SOBRE CELULAS DENDRITICAS HUMANAS
DERIVADAS DE MONOCITOS**

SANDRA PAOLA SANTANDER GONZALEZ

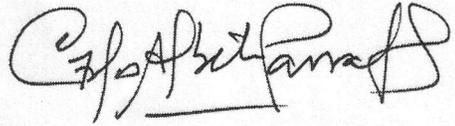
APROBADO



Susana Fiorentino. PhD
Directora



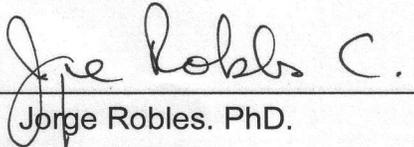
Lucy Gabriela Delgado. PhD.
Jurado



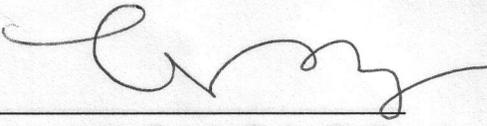
Carlos Parra. PhD.
Jurado



Margarita Velásquez. PhD.
Jurado



Jorge Robles. PhD.
Jurado



Concepción Puerta Bula. PhD.
Jurado

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA POSTGRADO**

**EFECTO INMUNOMODULADOR DEL GALACTOMANANO OBTENIDO DE
Caesalpinia spinosa Y DE LA FRACCIÓN ACUOSA Y ORGANICA DE
Petiveria alliacea SOBRE CELULAS DENDRITICAS HUMANAS
DERIVADAS DE MONOCITOS.**

SANDRA PAOLA SANTANDER GONZALEZ

**Directora
Susana Fiorentino PhD.**

**TESIS
Presentada como requisito parcial para optar al titulo de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS.**

**Bogotá, D.C
Enero de 2012**

NOTA DE ADVERTENCIA

La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia.

Artículo 23 de la resolución N° 13 de julio de 1946.

TABLA DE CONTENIDO

| | Pag. |
|--|------|
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 4 |
| 2.1 Objetivo General | 4 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 4 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 5 |
| 4. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS | 8 |
| 4.1. Inmunomodulación. | 8 |
| 4.2 Inmunopotenciadores o adyuvantes. | 8 |
| 4.2.1 Propiedades inmunopotenciadoras de los polisacáridos obtenidos de plantas. | 13 |
| 4.3. Biología de las Células Dendríticas. | 17 |
| 4.3.1 Subgrupos de células dendríticas. | 17 |
| 4.3.2 Receptores de Células Dendríticas. | 20 |
| 4.3.3 Activación de Células Dendríticas. | 24 |
| 4.3.4.Células dendríticas en contexto tumoral. | 27 |
| 4.4. Plantas con potencial inmunomodulador. | 30 |
| 4.4.1 <i>Caesalpinia spinosa</i> como fuente de inmunomoduladores. | 30 |
| 4.4.1.1. Descripción general y distribución geográfica de <i>Caesalpinia</i> . | 30 |
| 4.4.1.2. Usos tradicionales reportados para <i>Caesalpinia spinosa</i> . | 31 |
| 4.4.1.3. Aspectos Farmacológicos de <i>Caesalpinia spinosa</i> . | 32 |
| 4.4.1.4. Polisacáridos aislados del fruto de <i>Caesalpinia spinosa</i> . | 32 |
| 4.4.2. <i>Petiveria alliacea</i> como fuente de inmunomoduladores. | 34 |
| 4.4.2.1 Descripción general y distribución geográfica de la <i>Petiveria</i> . | 34 |
| 4.4.2.2. Usos tradicionales reportados para la <i>Petiveria alliacea</i> . | 35 |
| 4.4.2.3. Aspectos Farmacológicos anti cancerígenos de la <i>Petiveria alliacea</i> . | 36 |
| 4.4.2.4. Actividad Inmunomoduladora de la <i>Petiveria alliacea</i> . | 37 |

| | |
|---|----|
| 5. HIPOTESIS | 40 |
| 6. METODOLOGIA UNIFICADA Y DETALLADA DE LOS ARTICULOS | 40 |
| 6.1. Obtención y caracterización química del Galactomanano de <i>Caesalpinia spinosa</i> . | 40 |
| 6.1.2. Métodos Analíticos | 41 |
| 6.2. Obtención de la fracciones de <i>Petiveria alliacea</i> . | 41 |
| 6.2.1. Obtención de la Fracción Acuosa (FA). | 41 |
| 6.2.2. Obtención de la Fracción orgánica (FO). | 42 |
| 6.3. Diferenciación de Monocitos a Células dendríticas. | 43 |
| 6.4. Análisis del fenotipo de las células dendríticas. | 44 |
| 6.5. Ensayos de Fagocitosis. | 44 |
| 6.6. Reacción mixta leucocitaria. | 45 |
| 6.7. Expresión diferencial de genes por RT-PCR en tiempo real. | 45 |
| 6.8. Análisis de producción de citocinas. | 47 |
| 7. RESULTADOS | 48 |
| 7.1. ARTICULO 1: Galactomannan from <i>Caesalpinia spinosa</i> induces phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. | 48 |
| 7.1.1 Introducción | |
| 7.2. ARTICULO 2: The immunomodulatory effect of aqueous and ethanolic fractions from <i>Petiveria alliacea</i> in human dendritic cells. | 50 |
| 7.2.1 Introducción | |
| 8. DISCUSION GENERAL. | 52 |
| 8.1 Efecto inmunomodulador del Galactomanano purificado de <i>C.spinosa</i> . | 52 |
| 8.2 Efecto inmunomodulador de la fracción acuosa y la fracción orgánica obtenida de <i>Petiveria alliacea</i> . | 69 |
| 9. PERSPECTIVAS. | 73 |
| 10. BIBLIOGRAFIA. | 74 |
| 11. ANEXOS | 95 |
| 11.1 ARTICULO 3: Influencia del tratamiento de <i>Petiveria alliacea</i> en la expresión diferencial de genes en células tumorales. | 96 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------|--|
| ADN | Acido desoxirribonucleico. |
| Ac | Anticuerpo |
| ACM | Acemanan |
| AgN | <i>Angelica gigas nakai</i> |
| Ags | Antígenos |
| A375 | Línea de células de melanoma humano |
| CDBM | Célula dendrítica derivada de medula ósea |
| CDs | Células dendríticas |
| CDh | Célula dendrítica humana |
| CDint | Célula dendrítica intersticial |
| CDi | Células dendríticas inmaduras |
| CDms | Células dendríticas mieloides |
| CDmo | Célula dendrítica derivada de monocito |
| CDps | Célula dendrítica plasmocitoide |
| CHO | Carbohidratos |
| CLR | Receptor tipo C lectinas. |
| CMH I | Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I |
| CMH II | Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II |
| CMi | Células mieloides inmaduras. |
| CPM | Progenitor mieloides común |
| CPL | Célula progenitora linfocítica |
| CMSP | Células mononucleares de sangre periférica |
| CPA | Célula profesional presentadora de antígenos |
| CPH | Células progenitoras hematopoyéticas. |
| CSH | Célula madre hematopoyéticas |
| DC LAMP | Proteína membrana asociada a lisosoma de CDs |
| DC-SIGN | Molécula 3 de adhesión intercelular captadora no integrina específica de CDs |
| DPT | Difteria–pertussis- tetanus |
| DRC | Dominios de reconocimiento de carbohidratos |
| DT | <i>Difteria tetanus</i> |
| FA | Fracción acuosa |
| FDA | US Food and Drugs Administration |
| FO | Fracción orgánica |
| GI | <i>Ganoderma lucidum</i> |
| GM-CSF | Factor estimulador de colonias granulocítica monocítica |
| HIB | Haemophilus influenza B |
| HBV | Virus de la Hepatitis B |
| ICAM | Molécula de adhesión intracelular-1 |
| ICOS | Molécula coestimuladora inducible |
| IDO | Indoleamine 2,3-dioxigenasa |

| | |
|------------------|---|
| IFN | Interferon |
| Ig | Inmunoglobulina |
| IL | Interleucina |
| JAK | Janus kinasa |
| ITAM | Motivo de activación basado en el inmunoreceptor de tirosina |
| KIR | Receptor killer inmunoglobulin-like |
| K562 | Línea de eritroleucemia humana |
| LB | linfocito B |
| LC | célula de Langerhans |
| LCB | Linfomas de células B |
| LPS | Lipopolisacarido |
| LRR | Repeticiones ricas en Leucina |
| LT | Linfocito T |
| LTCs | Linfocito T citotóxico |
| MCF7 | Línea de adenocarcinoma de seno humano |
| MLP | Monofosforil lípido A |
| MyD88 | Factor de diferenciación mieloide 88 |
| MR | Receptor Manosa |
| NF-κB | Factor Nuclear κB |
| NK | Células asesinas naturales |
| NOD | Dominio nuclear de oligomerización |
| (NOD)-NLR | Familia de receptores como los NOD con repeticiones ricas en Leucinas |
| NLDT | Nódulos linfoides de drenaje tumoral |
| ON | Oxido nítrico |
| PLC | Progenitor linfoide común |
| PMAPs | Patrones moleculares asociados a patógenos |
| PS | Polisacáridos |
| PVI | Polio virus inactivado |
| PRR | Receptores de patrones de reconocimiento |
| RNA | Acido ribonucleico |
| RNA _m | ARN mensajero |
| RPMI | medio Roswell Park Memorial Institute |
| SBF | Suero bovino fetal |
| TCR | Receptor de las células T |
| TGFβ | Factor crecimiento transformante beta |
| TH1 | Células ayudadoras tipo 1 |
| TH2 | Células ayudadoras tipo 2 |
| THP-1 | Células monocíticas leucémicas humanas |
| TIR | Toll/IL1 dominio resistencia TIR |

| | |
|--------------|---|
| TLRs | Receptor tipo toll |
| TNF α | Factor de necrosis tumoral |
| TT | Toxina tétanica |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial vascular |
| VHA | Virus hepatitis A |
| VHB | Virus hepatitis B |
| VIH | Virus de la inmunodeficiencia humana |
| VPH | Virus del papiloma humano |

Lista de Símbolos

| | |
|---------------|-------------------------------|
| Kg | Kilogramo |
| g | Gramos |
| mg | Miligramos |
| µg | Microgramos |
| mM | Mili Molar |
| uM | Micro Molar |
| nM | Nano Molar |
| UI | Unidades Internacionales |
| L | Litro |
| mL | Mililitro |
| µL | Microlitro |
| °C | Grados centígrados |
| % | Porcentaje |
| h | Hora |
| min | Minutos |
| s | Segundos |
| mbares | Milibares |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| nm | Nanometros |
| msnm | Metros sobre el nivel del mar |

1. INTRODUCCION

Las células dendríticas (CD) son las más potentes células presentadoras de antígenos (CPA) del sistema inmune y se encuentran en el organismo en diferentes estadios de diferenciación reflejando el contacto previo o no con una señal de peligro particular. Dentro de este grupo de células encontramos las células dendríticas inmaduras (CDi), las cuales no han tenido contacto con señal alguna y las células dendríticas maduras (CDm) las cuales han recibido una señal de maduración. Cada una de estas poblaciones puede activar la respuesta inmune de una forma diferente; la presentación de antígenos (Ags) por las CDi se ha correlacionado con la inducción de linfocitos T (LT) reguladores o incluso anérgicos (1), (2) mientras que las CDm inducen una respuesta de LT efectores (3), (4),(5). Las CDi pueden inducir LT reguladores (6), (2) *in vivo*, lo que deja entrever que las señales requeridas para activar en forma diferencial la respuesta inmune no están completamente dilucidadas (7), (8), (5). Este último estadio ha sido observado en CD de origen mielóide, como las células derivadas de médula ósea murina (CD-BM), las células de Langerhans (CL) y las CD derivadas de monocitos humanos (CDmo) (7). Las CD cuando se confrontan con patógenos u otras señales percibidas como peligro, entran en un proceso de maduración en el que se producen cambios a nivel fenotípico y funcional. En estado maduro las CD presentan Ags y aumentan sus niveles de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86. Adicionalmente, producen citocinas como la IL1 β , IL10 e IL12, que median la polarización y la generación de respuesta inmune adaptativa de células T hacia un perfil TH1 o TH2.

Los diferentes estadios de maduración de las CD y la respectiva respuesta inmune generada muestran una célula con alta plasticidad que podría ser modulada. Por tal motivo, las CD han sido consideradas células adyuvantes naturales, que bajo estímulos moduladores podrían favorecer o no la respuesta inmune en diferentes contextos (9), (3) por ejemplo frente a

células tumorales (10), (11), (12). Para tal fin, el controlar los procesos de maduración de la CD es uno de los componentes más importantes que podría inducir una respuesta específica de células T. En este sentido, al pensar en elaborar vacunas en las que se busque activar la respuesta inmune utilizando CD, es importante que como requisito inicial el estímulo que se utilice no sólo contenga Ags para los cuales se genere inmunidad, sino que también se deben proveer estímulos necesarios para promover la maduración completa de la CD que finalmente podría generar inmunidad protectora.

Los inmunomoduladores, en este contexto, tienen la capacidad de magnificar tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa (13). Actualmente varios adyuvantes como el aluminio o el monofosforil lípido A (MLP) son utilizados en vacunación y tienen aprobación por organismos como la “US Food and Drug administration” (FDA) para ser ensayados en humanos (14). Con el fin de encontrar nuevos compuestos inmunomoduladores que induzcan la maduración de las CD, los polisacáridos (PS) extraídos de plantas representan una fuente interesante para la generación de esta regulación, ya que como se ha observado en PS obtenidos de hongos estos pueden activar a través de diferentes receptores la respuesta inmune mediada por células como macrófagos y CD (15), (16). Las CD tienen receptores que reconocen patrones moleculares de patógenos (PAMPs) (7), (17) clasificados como receptores de patrones de reconocimiento (PRR), entre los que se encuentran los receptores toll (TLRs) y los receptores de lectinas tipo C (CLR); o los citoplásmicos donde están los receptores tipo dominio de unión de oligomerización NOD (NLR) que incluyen dos grandes familias: NOD, NALPs y el transactivador del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (CMH-II), de igual modo los receptores helicasas ARN que reconocen ARN de doble cadena. Los CLR, se unen a carbohidratos (CHO), favoreciendo la fagocitosis y presentación de Ags (18), (19). Diferentes CLR son expresados por las CD, incluyendo el receptor de

manosa (RM) (CD206), el receptor específico de lectinas tipo C de la familia ICAM-3, en células dendríticas (DC-SIGN) o (CD209), el antígeno leucocitario 75 (DEC-205), la Dectina 1 y Dectina 2, y las lectinas tipo C no clásicas, entre otros (19), (20), (21).

Dada la diversidad de receptores que participan en la activación de las CD, es lógico pensar que algunos metabolitos primarios de las plantas como los PS, pudieran unirse a ellos y activar a la CD para ejercer una función inmunológica particular. La *Petiveria alliacea*, es utilizada tradicionalmente en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, por lo que se podría inferir su actividad sobre las células dendríticas. Por otra parte, la *Caesalpinia spinosa*, presenta en su fruto verde un PS con una estructura compleja rica en manosa y galactosa, que lo hace un candidato ideal para unirse a los RM de las CD. Por estas razones, unido al hecho que en nuestro grupo estamos trabajando en la búsqueda de Inmunomoduladores a partir de plantas, escogimos estas dos plantas para evaluar la actividad de sus metabolitos primarios y secundarios, aislados o como componentes de una fracción, en la modulación de la respuesta Inmune. Este trabajo se centra en la actividad biológica de las fracciones y no en la caracterización química, la cual hace parte de otra línea de investigación del grupo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar la actividad inmunomoduladora del polisacárido obtenido de *Caesalpinia spinosa* y de la fracción acuosa y orgánica de *Petiveria alliacea* sobre células dendríticas derivadas de monocitos humanos.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1. Establecer el patrón de expresión de moléculas relacionadas con la maduración fenotípica de células dendríticas.

2.2.2. Evaluar los cambios funcionales relacionados con la producción de citocinas, actividad fagocítica y presentación de antígenos en respuesta a los tratamientos.

2.2.3. Determinar la expresión de algunos genes importantes en la función de las células dendríticas que nos permitan establecer el tipo de modulación inmune generada por los diferentes metabolitos.

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los intereses de investigación en el grupo de inmunología y biología celular dentro de las líneas de investigación de quimiopreención y biomedicamentos antitumorales e inmunomoduladores, es el estudiar la actividad tanto antitumoral como inmunomoduladora de plantas colombianas para las cuales se tenga alguna evidencia del uso tradicional que implique estas actividades en particular.

Las plantas estudiadas hasta el momento por el grupo son *Caesalpinea spinosa* y *Petiveria alliacea*. De estas, se han obtenido y estudiado principalmente varias fracciones con actividad antitumoral. La fracción obtenida de *Caesalpinea spinosa* denominada (Fracción 2 precipitable en etanol) P2Et, constituida por el ácido galoilquinico y pentagaloilglucosa; presenta actividad citotóxica contra diferentes líneas de células tumorales (Tesis Maestría M. Pombo, 2007), induciendo la muerte por apoptosis en la línea de eritroleucemia humana (K562) (Castañeda D, sometido) y la inhibición del crecimiento tumoral en la línea de adenocarcinoma de seno humano (MCF7) (Castañeda D. Tesis de maestría, 2011). Adicionalmente, esta fracción aumenta la sensibilidad de las dos líneas de células tumorales al tratamiento con Doxorrubicina, entre otros medicamentos, lo que sugiere que podría tener una actividad adyuvante en el tratamiento del cáncer *in vivo*.

Por otra parte, se ha encontrado que la fracción obtenida a partir de la purificación con acetato de etilo (F4) de *P. alliacea*, altera la organización del citoesqueleto de actina, e induce el arresto del ciclo celular en fase G2 y causa la muerte de diferentes líneas de células tumorales vía independiente de la mitocondria. Adicionalmente, el análisis del proteoma de la línea de células de melanoma humano (A375) mostró un cambio metabólico importante que podría explicar en parte su actividad antitumoral *in vivo* (22).

La actividad antitumoral, ha sido estudiada utilizando fracciones extraídas con solventes orgánicos, que permiten la obtención de los metabolitos secundarios de la planta. Poco se ha estudiado acerca del papel biológico de los metabolitos primarios, tales como PS y proteínas, los cuales se obtienen fácilmente en solventes acuosos y podrían estar en mayor cantidad en las preparaciones utilizadas tradicionalmente, como infusiones o cocciones de la planta. Los metabolitos primarios más estables de estas preparaciones, son los PS, dado que las proteínas se degradan fácilmente luego de las extracciones en calor. Este hecho, unido a la presencia de receptores de PS en las células presentadoras de Ags, que pueden regular la respuesta inmune, nos llevó a comenzar a decorticar la actividad de estos metabolitos, particularmente sobre las células dendríticas humanas (CDh), que son el eje central en la inducción de una respuesta inmune o de tolerancia (23), (24).

Los hongos han sido usados tradicionalmente para la prevención y el tratamiento de diferentes enfermedades infecciosas y el cáncer (24). Los PS aislados a partir de estos, en particular los β -glucanos han sido ampliamente estudiados debido a su actividad inmunomoduladora y antitumoral. Los β -glucanos interactúan con diferentes células del sistema inmune como leucocitos, macrófagos y CD entre otros (25), (26), (15) a través de receptores de glicanos como: el receptor de complemento 3 (CR3- (CD11b/CD18) (27), (28) receptores scavenger (29), Dectina 1 (30), (31), (32) y los receptores TLR-2 y 4 (33), (34), (35). Existen otros polisacáridos con un potencial similar y posiblemente menor toxicidad, dentro de los derivados de plantas, como son aquellos que poseen residuos de manosa en su estructura, como el descrito en las semillas verdes de *C. spinosa*.

Las CD, por ser las principales CPA, son cruciales en la iniciación de la respuesta inmune primaria de células T vírgenes hacia un fenotipo ayudador o citotóxico (36), (37). Establecer por lo tanto la capacidad inmunomoduladora que tienen los metabolitos provenientes de plantas colombianas nos permitirá conocer el potencial inmunomodulador que pueden generar este tipo de moléculas sobre CDh, y así mismo, establecer su posible uso en el futuro como inmunoregulador positivo (adyuvante) o negativo (inmunosupresores) en diferentes patologías como el cáncer o enfermedades autoinmunes, en las que estas células pueden ser mediadoras importantes en la inducción de una respuesta inmune específica (4), (38).

4. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.

4.1. Inmunomodulación.

Los componentes capaces de interactuar con el sistema inmune ya sea estimulando o suprimiendo aspectos específicos de la respuesta inmune del huésped pueden ser clasificados como inmunomoduladores o modificadores de respuesta biológica (15), (24), (39). Los inmunopotenciadores o adyuvantes son sustancias o preparados químicos que son utilizados por sus múltiples aplicaciones. Por un lado, por su capacidad de estimular la resistencia del huésped frente a enfermedades infecciosas, por otro lado, por la potenciación de la inmunogenicidad de las vacunas (23), (40). Contrario a lo anterior, los inmunosupresores han sido utilizados con el fin de reducir o evitar la respuesta inmune en condiciones como trasplante de órganos, enfermedades autoinmunes y alergias, entre otros (41).

4.2. Inmunopotenciadores o adyuvantes.

Los adyuvantes son componentes que sirven para aumentar la magnitud, amplitud, calidad y longevidad de la respuesta inmune específica a Ags, caracterizándose por tener mínima toxicidad o menos efectos inmunes generados por sí mismos (13). La adición de estos adyuvantes a algunas vacunas, puede substancialmente reducir la cantidad de antígeno y/o el número de inmunizaciones requeridas para lograr la respuesta inmune deseada (4). En las vacunas contra enfermedades infecciosas, uno de los adyuvantes más comúnmente utilizado son las sales de aluminio (aluminio), las cuales han mostrado ser seguras y efectivas en la inducción de anticuerpos (41). Adicional al aluminio, otros dos adyuvantes como la emulsión agua y aceite y el monofosforil lípido A (MLP) (MF59®) + Aluminio

(ASO₄), han sido usados en diferentes vacunas aprobadas por la FDA (42).

El aluminio es un componente licenciado para diferentes vacunas humanas, entre las que se incluyen: *Difteria-pertussi-tetanos* (DPT), *Diphtheria-tetanos* (DT), DT combinada con el virus de la hepatitis B (HBV), Haemophilus influenza B (HIB) o Polio virus inactivado (PVI), Virus de la Hepatitis A (VHA), *Streptococcus pneumoniae*, meningococo y para el Virus del Papiloma humano (VPH) (14). Algunos de los mecanismos de acción que han sido descritos para el aluminio incluyen: **1.** La formación de depósitos que facilitan la liberación continua del antígeno; **2.** la formación de estructuras particuladas que promueven la fagocitosis del antígeno por CPA (43), como las CD, macrófagos y células B, y **3.** el aumento de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH clase II), así como de moléculas coestimuladoras y la presentación de Ags (13). Recientes investigaciones han mostrado cómo el aluminio induce la secreción de citocinas involucradas en la activación del inflamosoma como la IL1 β , IL18 e IL33 por monocitos y macrófagos a través de la activación directa de la familia de receptores como los NOD (NLR) que contienen dominios purina 3 (NALP3) (44). La respuesta inmune adaptativa generada por el aluminio incluye la generación preferente de células TH2, las cuales median la diferenciación de células B capaces de secretar anticuerpos de tipo IgG1 e IgE (45).

Otro de los adyuvantes utilizados en humanos es el monofosforil lípido A (MPL®) (MF59™) derivado del lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella minnesota*, el cual es un potente estimulador de la respuesta de células T y anticuerpos. El LPS está compuesto de dos estructuras básicas: una porción de polisacárido hidrofílico y un motivo lipídico hidrofóbico llamado lípido A (46). Estructuralmente el MPL® posee una modificación en la estructura del lípido A, la cual reduce drásticamente la toxicidad del mismo y por esta razón es conocido como LPS detoxificado (12). El MPL® es el primero y único

ligando de un receptor TLR, específicamente del TLR4, utilizado en vacunas humanas licenciadas, y ha sido utilizado sólo o en combinación en vacunas como Fendrix® para Virus hepatitis B (VHB), VPH (42) y en algunos candidatos vacunales para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En general, el MPL® tiene una seguridad aceptable y al utilizarlo con diferentes Ags se ha obtenido una mayor respuesta inmune en cuanto a título de anticuerpos, acompañada de un mejor balance de respuesta inmune TH1/TH2 que la obtenida para el aluminio (47). Adicionalmente, el MPL® está licenciado en Europa para el tratamiento de las alergias al polen (Pollinex Quattro®), dada su habilidad de disminuir la respuesta TH2 a alérgenos. El adyuvante MPL® ha sido usado mundialmente por cientos de individuos donde se ha corroborado su efectividad y se ha mostrado que es seguro, bien tolerado y muy potente.

Dos clases de adyuvantes son comúnmente utilizados en las vacunas actuales:

-**Vehículos:** Que son definidos como componentes que presentan Ags vacunales al sistema inmune de manera óptima; que incluye el control en su liberación y un sistema depósito de liberación que incrementa la respuesta inmune específica al Ag. El vehículo puede también liberar un inmunoestimulante. Algunos ejemplos incluyen: sales minerales, emulsiones, liposomas, virosomas (nanopartículas hechas de proteínas virales como hemaglutininas de influenza y fosfolípidos) y complejos estimulantes inmunes (Tabla 1) (13).

-Inmunoestimulantes: Definidos como componentes que directamente interactúan con el sistema inmune para incrementar la respuesta a Ags (ej: ligandos de TLR/NLR/RRL, citocinas, saponinas y exotoxinas bacterianas (Tabla 2).

| Vehículo/ sistema de liberación | Tipo de respuesta inmune | | | | |
|--|--------------------------|---------|----------------------|---------------|-----------------------------------|
| | Rta TH1 | Rta TH2 | Presentación cruzada | Rta Células B | Rta Células B y persistencia de T |
| Sales Minerales (sales de aluminio, fosfato de calcio, (Alum+MPL) | + | ++ | | | |
| Emulsiones (MF59) (escueleno/agua), Q521, ASO2 (escueleno+MPL+Q521) | ++ | | | +++ | |
| Liposomas (DMPC /Chol, ASO1) | +++ | | + | + | + |
| Virosomas (IRIV), ISCOMs. | ++ | ++ | ++ | +++ | |
| Aceite mineral (IFA, Montanide, escueleno). | | ++ | | +++ | |

Alum: Aluminio, **MPL:** Monofosforil lipido A, **Chol:** Colesterol

Tabla 1. Respuesta inmune generada por vehículos/sistemas de liberación.
(Adaptado de Dubensky TW, 2010)

| Inmunoestimulantes | Interacción Celular | Tipo de Respuesta inmune |
|---|----------------------------|---------------------------------|
| Ligandos TLR: Lipopéptido bacteriano, lipoproteína, ácido lipoteicoico, lipoglicano micobacteriano. | TLR-2, 2/1, 2/6 | TH1, Ac, NK |
| ARN viral de doble cadena | TLR3 | NK |
| LPS, Lípido A, MPL. | TLR4 | TH1, Ac |
| Flagelina | TLR5 | TH1, LTC, Ac |
| ARN viral de cadena sencilla, imidazoquinolonas (Imiquimod). | TLR7/8 | TH1, LTC |
| DNA Bacteriano, CpG. | TLR9 | TH1, LTC, Ac |
| Citocinas: GM-CSF, IL-2, IFN- γ | Receptores de citocinas | TH1, Ac |

Ac : anticuerpos, **CpG**: secuencias ricas en citosina y guanina, **GM-CSF**: factor estimulador de colonias granulo monocíticas, **LPS**: Lipopolisacárido, **MPL**: monofosforil lípido A, **NK**: células asesinas naturales, **LTC**: linfocito T citotóxico, **TH1**: células ayudadoras tipo 1, **TLR**: receptor tipo toll.

Tabla 2. Respuesta inmune generada por inmunoestimulantes.

(Adaptado de Thomas W, 2010)

Adicionalmente, otros tipos de inmunomoduladores obtenidos a partir de plantas han sido estudiados durante los últimos años. Un ejemplo de ellos son la saponinas (Quil-A, ISCOM, QS-21), triterpenos glicosilados aislados de plantas (48). De este grupo, uno de los adyuvantes más estudiados ha sido el Quil-A, extraído de la corteza del árbol *Quillaja saponaria*, el cual está compuesto por una mezcla heterogénea de triterpenos glicosilados que varían en su actividad adyuvante y toxicidad.

A partir de este compuesto, se ha purificado un componente llamado el QS-21, que posee una baja toxicidad y aumenta la inmunogenicidad (mediada por Ac, células TH1 y LTC) frente a proteínas, glicoproteínas y Ags. El tratamiento clínico con el QS-21 solo o en combinación con otros inmunoestimulantes, ha progresado hasta el punto de empezar a ser ensayado en vacunas para diferentes agentes infecciosos como influenza, VSH, VIH, VHB, malaria y en cáncer modelos de melanoma, cáncer de colon y linfomas de células B (13), (42).

4.2.1. Propiedades inmunopotenciadoras de los polisacáridos obtenidos de plantas.

Recientemente, los PS aislados de fuentes botánicas (hongos, algas, líquenes y plantas superiores) se han convertido en un foco de interés para la investigación en el área biomédica debido al amplio espectro de propiedades terapéuticas descritas y su baja toxicidad celular; la cual representa una ventaja debido a que no se generan efectos secundarios significativos que representan uno de los mayores problemas asociados con PS bacterianos y componentes sintéticos con actividad inmunomoduladora. Teniendo en cuenta lo anterior, los PS de plantas se convierten en excelentes candidatos para terapias inmunomoduladoras y tratamientos anti tumorales entre otros (16).

A nivel inmunológico los PS son generalmente considerados Ags independientes de células T en donde no hay inducción de respuesta inmune mediada por células. Sin embargo, cada vez más en la literatura se reportan los mecanismos que involucran la actividad inmunoestimuladora antitumoral, bactericida y otros efectos terapéuticos de los PS de origen vegetal (heteroglicanos y proteoglicanos), la cual ocurre vía estimulación de diferentes células del sistema inmune como macrófagos, monocitos, NK, CD, y linfocitos infiltrantes de tumor (15), (25), (26), (27), (28), (30), (31), (32), (33), (34), (35), (49).

Estudios realizados a partir de PS derivados de 35 especies de plantas, han mostrado tener un efecto estimulador en la función de células del sistema inmune como los macrófagos (16). En particular estos componentes incrementan la actividad citotóxica de estas células frente a células tumorales y microorganismos, a través del aumento de especies reactivas de oxígeno y de secreción de citocinas y quimiocinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF α), IL1 β , IL6, IL8, IL12 e IFN α . (16).

Uno de los PS más estudiados dentro de los productos naturales es el Acemanano (ACM), extraído del *Aloe vera* que actúa sobre los macrófagos, induciendo la síntesis de IL1 β , TNF α y activa las CD de origen murino, (50) posiblemente a través de los receptores de manosa presentes en estas células. El ACM, presenta además actividad antiviral y antitumoral (51), (52) e induce la producción de óxido nítrico (ON), aunque de una forma menos eficaz que el LPS bacteriano.

Los extractos acuosos del *Sho-saiko-to* y *Juzen Taiho-to*, entre otros, estudiados en Japón, presentan una actividad antitumoral e inmunomoduladora interesante favoreciendo la disminución del crecimiento del melanoma *in vivo*; y regulando positivamente la expresión del oncogén

Rel implicado en su transformación maligna. Por un lado, se ha observado que el *Sho-saiko-to* aumenta la expresión de las moléculas coestimuladoras en las CD, lo que podría dar origen a la activación de la respuesta inmune citotóxica mediada por los linfocitos T (53). Así como éstos, los extractos obtenidos de *Tinospora cordifolia*, o *Acanthopanax senticosus*, actúan aumentando la fagocitosis y la presentación antigénica junto con la producción de citocinas como IL1 β y TNF α (54) o activando las células NK y disminuyendo el crecimiento del tumor (55).

Dentro de los PS con capacidad inmunomoduladora se encuentran los obtenidos a partir de los hongos como el *Ganoderma lucidum* (GI) y *Angelica gigas nakai* (AgN). Por un lado, para los PS de GI se ha reportado su efecto inmunomodulador sobre diferentes células del sistema inmune como macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales (NK), LT, LB y CD (56). Este PS, aumenta la capacidad fagocítica de macrófagos de ratón *in vivo* e *in vitro* y también incrementa la secreción de citocinas proinflamatorias como IL1 β y TNF α por estas células (57).

Así mismo, en CD murinas derivadas de medula ósea, se ha observado que esta macromolécula a diferentes concentraciones favorece el aumento de la coexpresión del HLA I-A/ I-E y promueve la expresión del ARN mensajero (ARNm) y la proteína de citocinas como la IL12p40 (56). Paralelo a la maduración ejercida por este PS a nivel fenotípico y de secreción de citocinas en las CD *in vitro*; se pudo observar como los PS GI favorecen la proliferación de linfocitos en cultivos mixtos leucocitarios (33). Además de su actividad inmunomoduladora, también se ha corroborado su actividad antitumoral, la cual se atribuye a la secreción de citocinas proinflamatorias y a la inducción de la apoptosis de las células tumorales o también a la inducción de la maduración de las CD, que antagonizan el efecto inmunosupresor de la quimioterapia y favorece la iniciación de la respuesta inmune y la actividad citotóxica específica de células T CD8 a través de la

secreción de INF γ y granzima B (34). Por otra parte, el PS obtenido de AgN incrementa de forma eficiente la maduración de las CD evidenciada no solo por el aumento en la expresión de moléculas como CD80, CD86 y CMH-II, sino a su vez por el aumento en la producción de IL12 y el aumento en la estimulación de células T alogénicas. De forma adicional en modelos tumorales murinos se ha observado que las CD maduras con el AgN inhiben más eficientemente el crecimiento tumoral del melanoma (B16F10) que las CDi. La maduración de las CD de ratón fue observada en ratones C57BL6 y C3H/HeN tlr4 +/+, pero no en ratones C3H/HeJ tlr4-/-; lo que sugiere que el AgN media la maduración de estas células a través del receptor TLR4 (58).

De forma similar a partir de extractos acuosos de *Angelica sineusis*, se ha encontrado que estos PS poseen actividad biológica ya que incrementan la producción de citocinas relacionadas con respuesta TH1 como IL2 e INF γ , las cuales, disminuyen la secreción de citocinas relacionadas con TH2 como IL4 (59). Así mismo, reportes del efecto de los PS de *Juniperus scopolorum* sobre macrófagos peritoneales murinos y fagocitos mononucleares, demostraron que esta fracción tiene una potente actividad inmunomoduladora que favorece el estallido respiratorio, estimulando directamente la producción de ON e induciendo la secreción de citocinas proinflamatorias (IL1 β , IL6, TNF α , e IL12p70) y anti inflamatorias como IL10 (16). Las propiedades inmunomoduladoras de los PS también han sido mostradas en diferentes modelos animales. Un ejemplo de ellos son los glucanos aislados de la pared celular de las levaduras. Uno de los rasgos en cuanto actividad más significativa de estas macromoléculas es su actividad estimulante de la hematopoyesis y la inducción de una respuesta inmune celular y humoral (49).

4.3. Biología de las Células Dendríticas.

Las CD fueron descubiertas inicialmente en la epidermis por Langerhans en 1868 e identificadas casi 100 años después en órganos linfoides secundarios. Las CD forman una red de vigilancia inmunológica en la mayoría de los tejidos y órganos (60). Estas células de origen hematopoyético, pasan por diferentes etapas de maduración y forman un sistema complejo constituido por subgrupos de células heterogéneas que varían en la expresión de marcadores de superficie (61). Las CD son CPA que juegan un papel central en la iniciación y regulación de la respuesta inmune, regulando tanto la inmunidad innata (macrófagos, granulocitos y NK), como la inmunidad adaptativa, a través de la interacción con las células T, que incluye la respuesta de células T ayudadoras tipo 1 (TH1), tipo 2 (TH2), tipo 17 (TH17), T reguladoras (Treg) y células B (36), (37), (62). Las CD pueden presentar Ags procesados a las células T en un ambiente inmunogénico o tolerogénico, dependiendo de las señales del microambiente. Estas células captan, transportan, procesan y presentan Ags a los linfocitos T (36) y en ausencia de un estímulo inflamatorio, residen en los órganos linfoides periféricos, particularmente en los sitios de interfase con el medio ambiente como piel y mucosas.

4.3.1. Subgrupos de células dendríticas.

Como otros tipos celulares del sistema inmune, las CDi se producen continuamente a partir de células hematopoyéticas (CD34+ FLT3+) de la médula ósea. Existen dos vías principales de diferenciación de CD a partir de células progenitoras hematopoyéticas (CPH). Una vía genera células progenitoras mieloides comunes (CPM) y la otra, células progenitoras linfoides comunes (CPL). En la vía de desarrollo mieloides se generan dos tipos de CD, las células de Langerhans (LCs) que expresan CD1a+ y

langerina+ y que residen en epitelios estratificados como la piel, y las CD intersticiales (CD int) que expresan DC-SIGN y CD14+ residentes en la dermis de diferentes órganos que incluyen hígado, riñón, corazón y otros tejidos conectivos **Figura 1** (5). Adicionalmente, en modelos murinos *in vivo* se ha observado que los monocitos que expresan el marcador de superficie GR1+, tienen la capacidad de diferenciarse a CD en condiciones de inflamación (63), (64). Las CDmo constituirían una categoría independiente de CD, derivada durante el proceso de inflamación, que no tendría un rol en la generación de CD en condiciones no inflamatorias (65). Sin embargo, recientes estudios han mostrado que los monocitos pueden ser los precursores de algunos subgrupos de CD como las LC y subgrupos de CD presentes en mucosa intestinal y respiratoria (64). No obstante, los avances que se han tenido en el entendimiento de este proceso; los mecanismos que regulan la diferenciación de monocitos a CD todavía no se han dilucidado (63).

En la vía de desarrollo linfóide se generan CD plasmocitoides (CDps) que circulan en la sangre y en órganos linfoides secundarios y secretan grandes cantidades de INF tipo I (α y β) en respuesta a una infección viral y/o ligandos de TLR7 y 9 (37).

En humanos, los estudios de heterogeneidad de las CD han sido muy limitados debido a la falta de disponibilidad evidente de tejidos. De hecho, mucho del conocimiento que se tiene ahora de las CDh proviene de estudios con CD purificadas de sangre o de modelos de cultivo *in Vitro* (61) (62).

Las CD mieloides humanas a nivel fenotípico se definen por ser células Linage (-), CMH-II+, CD4+ y carecer de CD8. Adicionalmente, los subgrupos de CDh de linaje mielóide se caracterizan por ser CD11c⁺ y las de linaje linfóide CD11c⁻, mientras que la expresión de este marcador para las CD de ratón es conservada en todos los subgrupos (61). Las CD en sangre se subdividen dentro en tres subgrupos, dos a los que pertenecen las células dendríticas mieloides (CDms) convencionales que se caracterizan por ser CD4+CD1a+CD11c^{high}CD1c+ (0,6% de células mononucleares de sangre

periférica (CMSP), las CD4+CD1a-CD11c^{low} (<0.05% deCMSP) y las CDps CMH-II+CD11c-CD4+CD123+ (0,4% de PBMC), las cuales fueron descritas inicialmente en tejidos (amígdalas) como células plasmáticas asociadas a T, células T plasmocitoides o monocitos plasmocitoides que tienen la habilidad de diferenciarse a CD maduras (CDm) en cultivo con IL-3 y CD40L y activar células T vírgenes (61), (66).

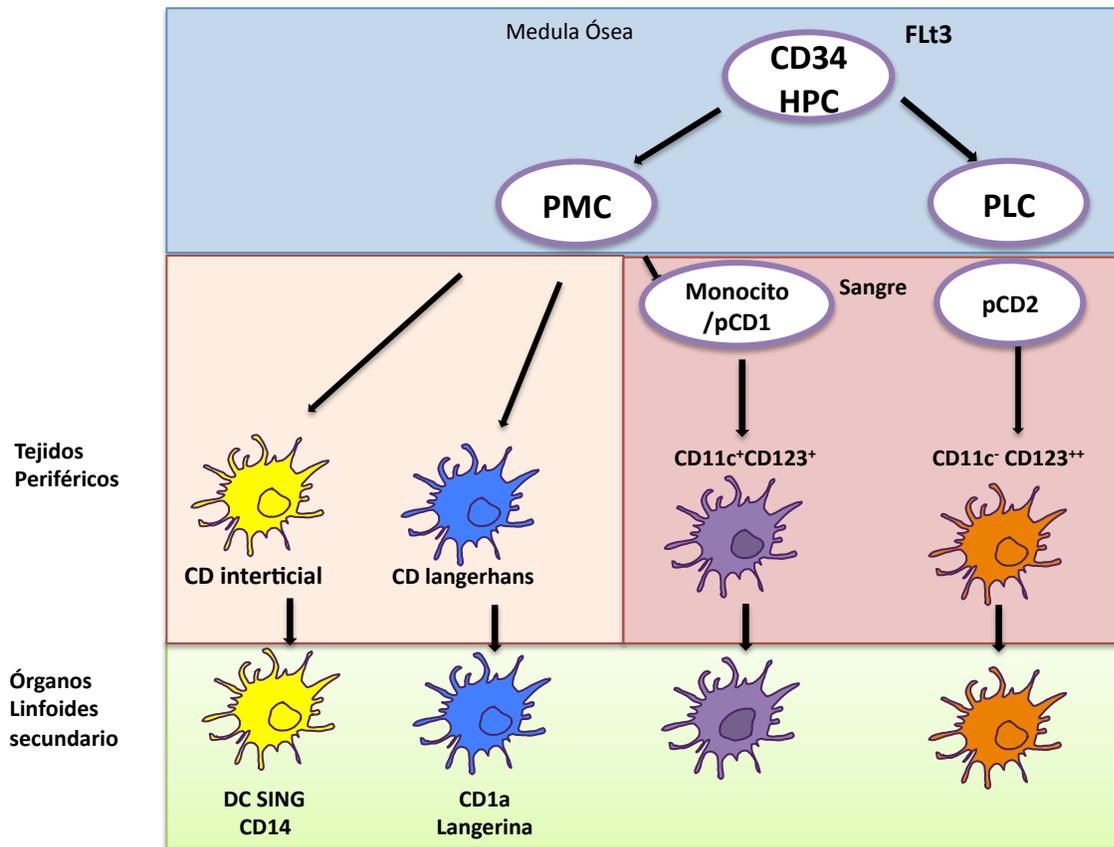


Figura 1. Vías de desarrollo de las células dendríticas humanas

(Adaptado de Yong-Jun Liu 2001, 2002 y Sato K, 2007).

4.3.2. Receptores de Células Dendríticas.

Las CD reconocen PAMPs a través de los receptores de patrones de reconocimiento (PRRs) (17), (7), los cuales incluyen los receptores TLRs y los no TLR, tales como los receptores de proteínas intracelulares NOD, helicazas CARD y CLR, los cuales reconocen diferentes PAMPs y

desencadenan la respuesta inmune a patógenos a través de diferentes rutas de señalización (67), (68). Los receptores TLR, por su parte, transmiten información de la interacción de las CD con patógenos a través de cascadas de señalización, de esta forma, median una apropiada respuesta celular, la cual resulta en una sucesión de eventos que incluyen la activación fenotípica y morfológica de las CD y /o la producción de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL6, IL1 β , IL-12, e INF tipo 1(α y β)) y su migración (69).

Los receptores miembros de la familia TLR son expresados en forma diferencial en las células del sistema inmune y responden a diferentes estímulos. Al evaluar su expresión sobre diferentes grupos de células, se ha encontrado que los monocitos expresan unos pocos miles de receptores por célula, mientras que en CD se encuentran unos pocos cientos de moléculas o menos. La expresión de estos receptores también ha sido observada en otros tipos de células entre las que se encuentran, las células del endotelio vascular, adipocitos, miocitos cardíacos y células epiteliales intestinales (70). Los TLR de manera individual se encuentran distribuidos diferencialmente en la célula; TLR1, TLR2 y TLR4 son expresados en la superficie de éstas, mientras que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se expresan en su mayoría en compartimentos intracelulares como los endosomas (71). La expresión de TLR sobre CD se encuentra distribuida diferencialmente en los subgrupos de estas células. Las CDms expresan TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10, mientras que las CDps expresan TLR1, 6, 7, 9 y 10 pero no TLR4 (70).

La activación específica a través de cada TLR, conduce a la generación de un perfil de expresión génica diferente, por ejemplo la activación de la vía de señalización para TLR3 o TLR4 conlleva la inducción de INF tipo I, mientras que la activación a través de la vía TLR2 y TLR5 no (72), (73). Así mismo, la vía de señalización TLR8 y TLR9, también lleva a la inducción de INF tipo I, a través de mecanismos distintos a los inducidos a través de TLR3/4 (74). A nivel estructural, cada TLR consiste de dos dominios bien caracterizados:

uno extracelular que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR) y una región TLR/receptor de la Interleucina 1 (TIR) (75). Una vez se da el reconocimiento del patógeno a través de TLR, se produce la dimerización de TIR y se dispara la vía de señalización citoplasmática en la que se activa una molécula activadora central conocida como factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88); aunque esta molécula es común en la activación de todos los TLR, ahora es claro que existen vías de activación dependientes e independientes de MyD88 (71). La señal generada a través de TLR activa vías inflamatorias que culminan en la activación del factor nuclear (NF- κ B) y de la proteína de activación AP-1. El NF- κ B es un factor de transcripción heterodimérico que se encuentra en la mayoría de tipos celulares y está compuesto por las sub-unidades p65 y p50. En células no estimuladas, NF- κ B es secuestrado en el citoplasma en una forma inactiva, debido a la interacción con la proteína inhibidora I κ B. Después de estimulación, I κ B es fosforilado por el complejo proteico IKK formado por las proteínas quinasas IKK α y IKK β y la molécula reguladora IKK/Nemo. La fosforilación de I κ B, conlleva a su posterior ubiquitinación y degradación por el proteasoma permitiendo que NF- κ B sea translocado dentro del núcleo y se una al sitio κ B. En paralelo a la activación de NF- κ B, la vía de MAP quinasas es activada y conlleva a la fosforilación y activación de AP-1. NF- κ B y AP-1 son factores de transcripción implicados en el control de la respuesta inflamatoria a través de la inducción de citocinas pro-inflamatorias (76).

Los CLR son importantes PRRs que cumplen funciones de unión específica a CHO, fagocitosis de patógenos y transporte de los mismos a diferentes compartimentos especializados donde interactúan con diferentes ligandos que median funciones celulares como la adhesión (18), (19) entre otras. Diferentes CLR son expresados por las CD, incluyendo el receptor de manosa (RM) (CD206), la molécula 3 de adhesión intercelular captadora no integrina específica de CD (DC-SIGN) (CD209), DEC-205, Dectin 1, Dectin 2 y lectinas tipo C no clásicas. Algunos de estos receptores como RM, DC-

SIGN y Dectina-2, han sido asociados al reconocimiento de PAMPs del tipo manano (77), (78), (79), (80).

El receptor RM comprende una región extracelular amino terminal que contiene un dominio rico en cisteína, un dominio repetitivo de fibronectina tipo II, 8 dominios de reconocimiento de carbohidratos (DRC) y una región transmembranal con una cola citoplasmática corta. Su expresión aumenta por IL4, IL13 e IL10 y disminuye por $\text{INF}\alpha$ y LPS (79), (81). El reconocimiento de CHO es dado por los DRCs 4 a 8, que reconocen específicamente hexosas con grupos hidroxilos ecuatoriales en C3 y C4, es decir, manosa, fucosa, glucosa o N-acetilglucosamina, pero no galactosa. Igualmente, se ha establecido que oligosacáridos compuestos por cadenas ramificadas de manosa presentan mayor avidez por el receptor que sus equivalentes lineales o monosacáridos. El RM es capaz de reconocer un amplio rango de bacterias Gram (+), Gram (-) levaduras, parásitos y micobacterias y ha sido implicado en la fagocitosis de patógenos (82). El receptor DC-SIGN (CD209) comprende un dominio CRD extracelular C terminal, un dominio de tetramerización, una región transmembranal simple y una cola citoplasmática corta que incluye diferentes motivos (ITAM), (20), (79). DC-SIGN reconoce estructuras de CHO con un alto grado de sustitución de manosa y cadenas ramificadas fucosiladas con unidades terminales de galactosa. La expresión de DC-SIGN es inducida por IL-4, IL13 y es regulada negativamente por $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, LPS, y dexametasona (77), (79).

El receptor Dectina-1 y Dectina-2 (Dendritic cell-associated lectin 2) está sobre expresado en CD en contextos inflamatorios. Dectina-2 presenta un dominio con afinidad por la manosa siendo menor que RM y DC-SIGN, con especificidad por estructuras altamente sustituidas ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2 > \text{Man}_8\text{GlcNAc}_2 > \text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$) (83), (84). Los mecanismos que llevan a la expresión de esta molécula en la superficie celular así como la ruta de señalización que sucede después de la interacción ligando-dectin 2 no ha

sido elucidada (83).

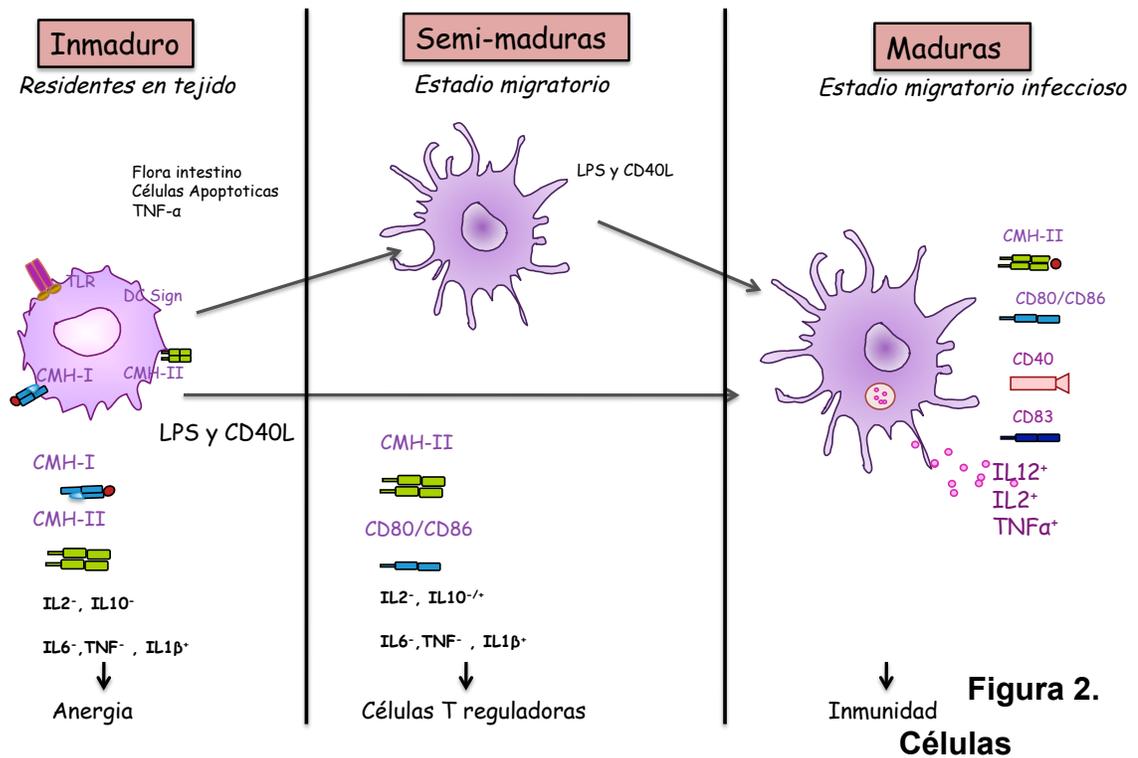
4.3.3 Activación de Células Dendríticas

Las CD de tejidos periféricos, como las LC de epidermis, son células centinelas llamadas CDi. La mayor característica funcional de una CDi es su capacidad de endocitosis, la cual ocurre continuamente en este estadio (7), (85). Funcionalmente las CDi, tienen altos niveles de ARNm y proteína para CMH-II en el citoplasma pero contrariamente expresan bajos niveles de este complejo en la superficie celular (3), (86) y no expresan moléculas coestimuladoras (87). De hecho las moléculas de CMH-II son acumuladas de manera abundante en compartimentos lisosomales junto con los Ags internalizados durante el proceso de endocitosis característico de éstas (88). La endocitosis sola no induce la activación de las CD y puede ser usada como blanco de Ags para la inducción de células T anérgicas *in vivo* (89). Un ejemplo de ello es el uso de receptores de endocitosis como el receptor de lectinas DEC205, el cual es expresado preferencialmente por las CD y media la captura y presentación de Ags solubles, induciendo una respuesta tolerogénica frente a ellos (dentro de condiciones no inflamatorias) y una fuerte inmunidad (dentro de condiciones de activación, como por ejemplo al coadministrar CD40L). Los Ags entregados vía DEC-205 bajo estas condiciones, son presentados sobre CMH clase I y II, llevando a la activación de células T CD4 y/o CD8 (88). Estos resultados indican como para que se dé la inducción de inmunidad, también se requiere de estímulos que maduren la CD(9). La maduración, fue un término originalmente usado para describir la actividad de presentación de Ags por CD cultivadas después de ser aisladas de tejidos (88). Este proceso inicia después que la célula recibe un estímulo adecuado (patógenos, estímulos asociados a señales de peligro como citocinas o productos de daño tisular), como el generado a través de ligandos de los receptores TLR, citocinas inflamatorias, ligandos de células T (Ej: CD40 ligando (CD40L) o por células NK entre otros).

Durante el proceso de maduración de la CD, se producen varios cambios a nivel funcional y morfológico. Las CD inmaduras presenta una macropinocitosis activa la cual disminuye a medida que la célula dendrítica madura (90). Durante este proceso se dan cambios que envuelven la acidificación del compartimiento lisosomal que optimiza el procesamiento del antígeno, la sobre-regulación de las moléculas coestimuladoras (CD40, CD83, CD80 y CD86) y la reorganización de las moléculas del CMH-II, que escapan de los compartimentos lisosomales y son transportadas a la membrana plasmática (el incremento que se produce es de 5 a 20 veces para el CMH-II mientras que el CD86 incrementa más de 100 veces) la cual, también, comienza a tener cambios morfológicos en los que se observa la formación de dendritas características de estas células (91), (90) que favorecen el contacto estrecho con múltiples células T simultáneamente. Adicionalmente, las CD también adquieren una alta movilidad celular que les permite llegar a tejidos linfoides y activar células T (92), (88). Este proceso de migración se considera clave y ha sido una de las limitantes de la inmunoterapia activa antitumoral con CD, ya que cuando se estimulan células de pacientes con el fin de que generen su propia inmunidad frente al cáncer, las CD que se inyectan migran pero persisten muy poco en los tejidos linfoides lo que disminuye la posibilidad de inducir una respuesta inmune adecuada (3).

Recientemente, también ha sido reportado que las CD pueden existir en un estado semi-maduro en el cual ellas son capaces de inhibir la activación de las células T, generando células T reguladoras y promotoras de la tolerancia (7), (2). En este nuevo estado de desarrollo las CD se caracterizan por poseer marcadores de superficie como los de las CD maduras (alta expresión de CMH II y moléculas coestimuladoras). Sin embargo, ellas no secretan elevados niveles de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6,

factor de necrosis tumoral (TNF α) o IL12p70, por el contrario se ha observado que pueden secretar mas IL10, aunque no es una observación constante. *In vivo* también se ha observado que las CD semi-maduras aunque poseen altos niveles de CMH-II y moléculas coestimuladoras, no son suficientes para inducir inmunidad de células T, por el contrario son células que inducen un ambiente tolerogénico ya que promueven la inducción de células T reguladoras IL10+ (93). En contraste con estas células, las CD inmaduras residentes en órganos (tejidos periféricos u órganos linfoides secundarios), inducen la anergia de células T por sus baja concentración o ausencia de moléculas del CMH en la membrana celular así como de moléculas coestimuladoras y la falta de producción de citocinas pro-inflamatorias. Figura 2 (7).



Dendríticas Inmaduras, semi-maduras y totalmente maduras en tolerancia e inmunidad. (Adaptado de Lutz MB 2002).

4.3.4. Células dendríticas en contexto tumoral.

Las células tumorales durante su proceso de oncogénesis, se caracterizan por: proveerse de señales propias de crecimiento, ignorar señales inhibitorias de crecimiento, replicarse sin límites, escapar de la muerte, ser angiogénicas e invadir tejidos a través de membranas y paredes capilares (94). Schreiber y colaboradores en el 2004, propusieron como característica adicional la capacidad de evasión de la respuesta inmune innata y adaptativa (95).

La interacción espontánea entre las células tumorales y las células del sistema inmune ha llevado a generar cambios recíprocos, permitiendo a las

células tumorales tener una menor inmunogenicidad y disminuir la capacidad de las células del sistema inmune para montar una respuesta efectiva frente a este crecimiento maligno. Aunque varios mecanismos han sido propuestos para explicar la habilidad de las células tumorales para escapar a la respuesta inmune, existe una propuesta en particular que ha ganado más atención, ya que relaciona el reconocimiento de Ags tumorales por parte de las células T, como un proceso que desafortunadamente ha llevado a la inducción y el establecimiento de células T tolerogénicas antígeno específicas (96). La respuesta inmune adaptativa frente a los tumores es iniciada dentro de los nódulos linfoides de drenaje tumoral (NLDT) (78) en el que los Ags solubles del tumor, fragmentos tumorales o células tumorales apoptóticas son llevados por las CD infiltradas en el sitio del tumor y presentadas a células T vírgenes. La presentación apropiada de estos Ags a las células T genera una respuesta inmune efectora, permitiendo que estas células migren al sitio del tumor y eliminen las células cancerígenas. Sin embargo, en un estadio de desarrollo avanzado del cáncer se ha observado que la presentación de Ags tumorales es llevada a cabo en condiciones donde las CD no están totalmente activadas, son inmaduras o son CD inmunosupresoras que conducen a la anérgia o a la deleción de células T específicas de tumor (17). En estas condiciones de activación, las células T no pueden tener una proliferación sostenible y por tanto muchas de estas células específicas para Ags tumorales mueren rápidamente por apoptosis (97) o se generan LT tolerogénicos a los Ags específicos del tumor.

La respuesta inmune antitumoral requiere de la participación de las CPA del huésped (98). Estudios recientes han mostrado que los macrófagos reclutados en el sitio del tumor (a través de la acción de citocinas, quimiocinas y factores derivados del tumor), son capaces de inducir un fenotipo antiinflamatorio y de esta forma promover el crecimiento del tumor (99). En los estudios realizados en diferentes tipos de tumores, se han identificado citocinas que afectan adversamente la respuesta inmune

antitumoral; estas incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), IL10, TGF- β e IL6 (100), (101), (102).

Algunas de estas citocinas son producidas por las células tumorales, otras son inducidas a nivel sistémico por productos derivados de estas células. Por ejemplo, el TGF- β producido por las células de carcinoma de colon reduce el número de CD circulantes (103) mientras que la producción de IL10 por las células tumorales amplifica la inducción en la producción de IL10 por parte de las células del huésped (104). En estudios realizados "*in vitro*" con los sobrenadantes de líneas celulares de carcinoma pancreático, e *in vivo* en el suero de pacientes con carcinoma pancreático avanzado, se estableció el efecto sobre la maduración y función de las CD inducido por el microambiente antitumoral, mediante la secreción de citocinas como VEGF, IL6, IL10 y TGF- β , llevando a una disminución del número de CDms y favoreciendo la diferenciación a CDps que inducen un fenotipo prevalente TH2 (105). Así mismo, el microambiente afecta la capacidad de maduración de las CD la cual se caracteriza por un nivel bajo de expresión de CMH clase II, moléculas coestimuladoras, tales como CD80, CD86 y baja secreción de IL12 (101). Adicionalmente, se ha observado que las CD con baja capacidad de presentación antigénica, son capaces de inducir tolerancia frente a Ags tumorales (106). Recientemente, el factor de transcripción STAT3 (regulador negativo de la respuesta inmune) ha sido propuesto como una molécula importante que media la inmunosupresión inducida por el tumor. STAT3 se produce de forma constitutiva en varias líneas tumorales y se ha encontrado asociado al proceso de oncogénesis (98). En células tumorales la activación de STAT3 está correlacionada con la inhibición en la secreción de citocinas proinflamatorias, acompañada de la secreción de citocinas anti-inflamatorias como IL10 y VEGF. Estas citocinas a su vez pueden inducir la activación de STAT3 en las CD cercanas y de esta forma influenciar su maduración funcional (107). Las células tumorales tienen al menos dos vías por las cuales pueden alterar la maduración y función de las CPA; la primera

(STAT3), previamente descrita, es mediada por factores derivados del tumor que promueven la generación de CD inmaduras incapaces de activar la respuesta de células T (98). La segunda, demostrada por Gur-Wahnon en el 2009, destaca como el contacto celular y la activación de la vía dependiente de la vía de señalización de Janus kinasa (JAK), genera células dendríticas tolerogénicas con un fenotipo maduro alterado que suprime la activación de la célula T. Las CD juegan un papel importante en la iniciación y regulación de la respuesta inmune y esta habilidad de iniciar la reacción inmune o inducir tolerancia es estrictamente dependiente de su estado de maduración y de su fenotipo. Las CD en su estado inmaduro pueden inducir anergia de células T, mientras que las CD maduras activan las células T e inducen inmunidad.

4.4. Plantas con potencial inmunomodulador.

4.4.1. *Caesalpinia spinosa* como fuente de inmunomoduladores.

4.4.1.1. Descripción general y distribución geográfica de *Caesalpinia*.

Caesalpinia spinosa Molina Kuntze es un árbol de hasta 10m o arbolito de 3 a 5m perteneciente a la familia *Caesalpinaceae* (Leguminosae: Caisalpinoideae), el fruto tiene forma de vainas encorvadas que miden aprox 10 cm de largo por 3 cm de ancho, y poseen un color naranja rojizo cuando están maduros. Contienen de 4 a 7 semillas ovoides, ligeramente aplanadas membranosas, (muy rico en proteínas), de color pardo oscuro o negruzco cuando están maduras. Es originaria de la región andina en donde es conocida comúnmente como tara, dividivi, quebrancho, huarango, guasango y guaranga. En Colombia está presente en climas fríos (18-24°C) y bosque seco pre montañoso, con un promedio anual de lluvias de 500 a 1.000 mm. y pertenece a la subregión tropical humedad (108) Figura 3.



Figura 3. *Caesalpinia spinosa* (Tomada de tesis de maestría de Pombo M, 2007).

4.4.1.2. Usos tradicionales reportados para *Caesalpinia spinosa*.

Esta planta ha sido utilizada desde la época prehispánica en la medicina folclórica y en años recientes como materia prima en el mercado mundial de hidrocoloides alimenticios. De acuerdo con lo reportado García-Barriga en 1974, la bebida del cocimiento de los frutos sirve en gargarismos para aliviar la amigdalitis, es desinfectante y reduce las glándulas. También ésta cocción en sorbetorios por la nariz es útil en el tratamiento de la sinusitis. De los frutos se extraen taninos, por lo que se utiliza en la industria curtiembre. La madera es utilizada como leña y es útil en la recuperación de ecosistemas, para controlar la erosión. En Perú, *C. spinosa* es utilizada como antiinflamatorio en forma de gárgaras para infecciones bronquiales, sinusitis; como agua de lavado para los ojos inflamados, infecciones vaginales y micóticas; como bebida para el dolor de estómago, las diarreas, cólera, reumatismo y como depurativo del colesterol(109), (110), (111).

4.4.1.3. Aspectos Farmacológicos de *Caesalpinia spinosa*.

Se ha reportado que el extracto etanólico de los frutos de *C.spinosa* presenta actividad antimicrobiana tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. Entre las bacterias Gram positivas se encuentran *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus epidermidis* y frente a las Gram negativas *Bacteroides fragilis*(112). De igual forma, en la especie *Caesalpinia mimosoides* se han obtenido algunas fracciones con actividad antimicrobiana (113). También se ha reportado actividad antitumoral del ácido gálico y del metil-galato aislados de *Caesalpinia ferrea* (114). Un gran número de propiedades han sido descritas para el ácido gálico: antioxidante, antialérgico, antimutagénico, anticarcinogénico y antiinflamatorio (115). Serrano y col en 1998, encontraron que el ácido gálico y sus derivados (metil, propil, octil y lauril esterés) inducen apoptosis en diversas líneas celulares tumorales dentro de las cuales se mencionan diferentes tipos de leucemias, linfomas y mielomas. Adicionalmente, se ha reportado actividad importante para los metil, propil y octil esterés del ácido gálico, sobre la línea celular tumoral HeLa (Adenocarcinoma de cerviz humano) y su relación estructura-actividad (116). Estudios encaminados a determinar la actividad antitumoral del ácido gálico y sus derivados (esterés) han demostrado su efecto citotóxico sobre la línea celular tumoral L1210 (Leucemia) según ensayos de MTT e inducción de apoptosis según ensayos de fragmentación del ADN en gel de agarosa (117).

4.4.1.4 Polisacáridos aislados del fruto de *Caesalpinia spinosa*

Los frutos verdes *C. spinosa* poseen uno de los polisacáridos más ampliamente utilizados en farmacia denominado Galactomanano. Este polisacárido se obtiene principalmente del endospermo de las semillas de esta planta y ha sido ampliamente utilizado como estabilizador de emulsiones; y dada su baja toxicidad, se utiliza también en la industria

farmacéutica, biomédica y de cosméticos (118), (119), (120). Aunque se ha postulado que puede tener actividad inmunomoduladora similar a la del ACM debido a su contenido de manosa (121), no existe ningún estudio que evalúe su actividad biológica y valide su uso como potencial inmunoestimulante.

El Galactomanano en general tiene actividades biológicas interesantes que pueden ser antagónicas. Las conidias de *Aspergillus fumigatus* conocidas por tener una pared celular rica en polisacáridos particularmente Galactomananos, inducen la maduración de una subpoblación de células dendríticas, localizadas principalmente en la piel conocidas como LC. La señal de maduración es transmitida al parecer por receptores de tipo TLR y lectinas que reconocen constituyentes de la pared celular de las conidias como el Galactomanano e induciendo la maduración solo a nivel fenotípico de las CD y la producción de IL10, sin producción detectable de IL12p70. Adicionalmente, el fenotipo inducido en estas células disminuye la capacidad de presentación antigénica de las mismas medida por aloactivación de los linfocitos T (122). En conjunto estos resultados implican que el reconocimiento e internalización de estas conidias podría resultar en CD maduras con un fenotipo polarizante regulatorio T/ TH2 (123). Otro receptor que ha sido asociado al reconocimiento de las conidias de este hongo es el receptor Pentraxin (Ptx3), ya que ratones que no tienen este receptor se ha observado defectos en el reconocimiento de las conidias por parte de macrófagos alveolares y CD así, como también, una inapropiada inducción de respuesta inmune adaptativa TH2(124).

Esta actividad inmunoestimulante ha sido también observada para el Galactomanano purificado del liquen *Ramalina celastri* el cual aumenta la producción de ON en macrófagos y tiene efectos leishmanicidas sobre las formas amastigotes de *Leishmania amazonensis*, al parecer producto del aumento en la producción de ON (125). Así mismo, el Galactomanano obtenido del hongo *Morchella sculenta* también favorece la activación de

macrófagos e incrementa el nivel de expresión del NF-kB (~50% del nivel inducido por el LPS) en la línea de células monocíticas leucémicas humanas (THP-1), el cual está ampliamente asociado con la respuesta inflamatoria mediada por citocinas (126). Finalmente, el Galactomanano extraído de *Mimosa scabrella* y *Leucaena leucocephala*, ha sido implicado con la protección frente a la infección por flavivirus (virus de la fiebre amarilla o virus del dengue). Colectivamente, estos datos hacen pensar que existe un amplio potencial farmacológico de estos polisacáridos (127).

4.4.2 *Petiveria alliacea* como fuente de inmunomoduladores:

4.4.2.1 Descripción general y distribución geográfica del genero *Petiveria*.

Petiveria alliacea es una hierba perenne de la familia *Phytolaccaceae*, presente en la selva amazónica y en otras áreas tropicales de América latina, el Caribe, África y el sur este de los Estados Unidos donde se conoce como: anamú, apacín, guiné, pipi y tipi entre otros, mientras que en Colombia se conoce como: anamú, hierba hedionda, jazmillo, mapurito, raíz de pipi, lancetilla, múcura, barbasco y chimu. En nuestro país se localiza en el bosque seco tropical (bs-T) en climas cálidos y medios entre los 0 m a los 1.600 msnm, con temperaturas promedio superiores a 24° C, con un promedio anual de lluvias de 1.000 y 2.000 mm, perteneciente a la subregión o provincia de humedad subhúmedo (128). A nivel de departamental se encuentra distribuida en Antioquia, Amazonas, Atlántico, Bolívar, Boyacá, Cauca, Caldas, Cesar, Córdoba, Cundinamarca, Chocó, Magdalena, Meta, Norte de Santander, Quindío, San Andrés, Sucre, Tolima y Valle (108), (129), (130) Figura 4.



Figura 4. *Petiveria alliacea* (Adaptado de Ximenes S. 2008)

4.4.2.2 Usos tradicionales reportados para la *Petiveria alliacea*.

Entre los diversos usos reportados para la *Petiveria* en el Brasil se encuentra como: diurético, antihelmíntico, antiespasmódico anticonvulsionante, emenagogo, abortivo, analgésico afrodisíaco, antifebril, antitumoral, entre otros usos(131), (132), (133). En Trinidad es utilizada como anticoagulante, depurativa, en dismenorreas y enfermedades venéreas. En Puerto Rico se utiliza para el asma, la inflamación de la vejiga, histerismo y cólera. En Cuba se emplea para afecciones de la piel, artritis y dolores de muela. En República Dominicana se usa como cataplasma y en Nicaragua como insecticida. En Panamá es utilizada en resfriados, calambres e inflamación (131). En la costa Atlántica Colombiana donde es muy abundante, la cocción de sus hojas se utiliza como sudorífico, para dolores de los huesos, para casos de hidropesía, parálisis y reumatismo. Las partes aéreas de la planta en enjuague evita la caries y la caída de los dientes, curando en poco tiempo la piorrea. Se ha descrito además, que la planta en decocción se utiliza en inflamaciones y en cáncer de estómago (108).

4.4.2.3 Aspectos Farmacológicos anti-cancerígenos de la *Petiveria alliacea*

La evaluación de 1400 extractos de plantas, realizada en búsqueda de nuevos fármacos antitumorales, clasificó el anamú como una de las 34 plantas con mayor actividad antitumoral (130). Estudios realizados en Venezuela y Cuba dan evidencias de las propiedades del anamú en la curación del cáncer. En 1975 el Dr. Alberto de los Toyos Alcalá en la Habana-Cuba, reportó las propiedades anticancerígenas de la planta, basado un hecho que sucedió en Nicaragua conocido como el “Caso Managua”, en el que vacas que padecían de leucemia y que fueron puestas a pastar en lugares donde crecía de forma abundante la *Petiveria*, al cabo de cierto tiempo se curaron (130). Así mismo en 1981, el Dr. Sergio Santana Sánchez en Cuba presentó un estudio científico detallado de 200 casos de pacientes desahuciados de cáncer y leucemia, quienes fueron tratados con una mezcla de diferentes yerbas, en la que se encontraba principalmente el anamú y de quienes se reportó la desaparición de los síntomas clínicos y hematopoyéticos de la enfermedad para todos los casos, sin observarse alguna manifestación de intolerancia o toxicidad (134), (130). Rossi y col en 1990, y posteriormente en 1993, encontraron que los extractos acuosos y etanólicos tienen capacidad de retardar el ciclo celular en varias líneas de células tumorales y leucémicas pero no sobre células de cáncer de seno (135),(136). En la Universidad de Sao Paulo en Brasil, se demostró que extractos hidroetanólicos de raíz, tienen actividad antimitótica, principalmente en la fracción soluble en éter (137). En cuanto a la toxicidad de los extractos obtenidos de esta planta; Ximenes en el 2008, en un modelo de rata estudió el potencial de toxicidad tanto aguda y crónica de un extracto acuoso de *Petiveria* y al establecer la concentración letal 50 (CL50 4g/kg) encontró una baja toxicidad para el extracto (138). Así mismo, en un modelo similar, se evaluó la toxicidad aguda y sub crónica de los extractos acuosos de las hojas de la planta, evaluando tanto los niveles de glucosa en sangre, el

hematocrito y la movilidad intestinal de ratones albinos tratados con diferentes dosis del extracto (1 g/kg, 2 g/kg), durante un periodo de tiempo de 18 y 70 días, sin encontrar mortalidad ni signos de toxicidad a lo largo de este tiempo (139). Estos resultados soportan los resultados encontrados por otros autores los cuales no encuentran ningún signo de toxicidad para los extractos acuosos de la planta administrados de forma oral en diferentes dosis (10 g/kg) (140) y (5 g/kg) (141).

Recientemente, nuestro grupo encontró que una fracción no polar de *P. alliacea* induce apoptosis por la vía mitocondrial y disminución de la HSP70, la cual puede ser protectora contra la muerte celular (142). Además, el análisis del proteoma de la línea de células de melanoma humano (A375) tratadas con fracciones obtenidas a partir de la purificación con acetato de etilo (F4), ha demostrado un cambio metabólico importante que podría explicar la muerte celular, unido a una actividad sobre el citoesqueleto que induce una detención de las células en la fase G2 del ciclo celular (22).

Uno de los compuestos más estudiados de *Petiveria* y al cual se le atribuye su actividad antitumoral es el Dibencil trisulfuro (DTS), el cual está presente de forma exclusiva en *P. alliacea*. Estudios *in vitro* han mostrado que el DTS, inhibe la proliferación de varias líneas celulares cancerígenas actuando sobre el citoesqueleto de éstas y desestabilizando la forma normal en la que se encuentran los microtúbulos, sin afectar la dinámica de la actina, pero inhibiendo la proliferación de las células. (143), (144), (145).

4.4.2.4 Actividad Inmunomoduladora de la *Petiveria alliacea*.

Otra de las propiedades de la *Petiveria* que también ha sido documentada, no sólo por su uso tradicional sino también a nivel experimental es su actividad inmunomoduladora. Sin embargo, es poco lo que se conoce en cuanto a sus mecanismos de acción. Delavueau en 1980

mostró como un extracto hidroalcohólico obtenido de la planta, estimula la actividad fagocítica de las células en ratones inyectados intraperitonealmente con una suspensión de *Escherichia coli* (146). Así mismo, Queiroz en el 2000 mostró en el modelo de *Listeria monocytogenes*, como en los ratones infectados que reciben el tratamiento preventivo con el extracto hidroalcohólico de la planta, se induce un aumento en la producción de IL-2 e IFN γ , así como un aumento en la actividad de las células NK, que induce la protección contra la infección y favorece el aumento del número de colonias de granulocitos y monocitos que participarían en parte, en el control de la enfermedad (147), (148). Así mismo, existen otros reportes que por el contrario muestran como la *Petiveria* podría tener en paralelo a su actividad inmunoestimuladora actividad inmunosupresora.

Germano y colaboradores, describieron la actividad antiinflamatoria de *P. alliacea* en diferentes modelos animales, mostrando como la aplicación tópica de un extracto hidroalcohólico puede disminuir la formación de granulomas en ratas y disminuir la dermatitis en los ratones tratados (149). Adicionalmente, de esta planta, se han podido aislar diferentes compuestos como el Beta-sitosterol, inhibidor de la prostaglandina sintetasa, enzima que cataliza la reacción de ácido araquidónico a prostaglandinas, lo cual explicaría, en parte su acción anti-inflamatoria (150). Así mismo, para el DTS, el cual se mencionó anteriormente, se ha visto cómo en ensayos de reacción mixta de linfocitos en activación dependiente de CD3, el DTS disminuye la secreción de citocinas TH1 así como el TNF α , IL6, IL1 β e IL8 y favorece la secreción de citocinas TH2 como la IL4 (151).

La actividad antitumoral e inmunomoduladora de la *Petiveria* podría estar mediada por la actividad directa sobre las células tumorales, pero también por la actividad sobre las células del sistema inmune, tales como las CD, que como se ha visto en el contexto antitumoral juegan un papel importante en la inducción de la respuesta inmune (98). Esta hipótesis no ha sido estudiada

hasta el presente y es por ello que el trabajo que planteamos pretende dilucidar el efecto del extracto acuoso de *Petiveria alliacea* en la actividad de las CD.

5. HIPOTESIS:

Los mediadores de la actividad inmunomoduladora de las plantas de interés, están presentes principalmente en los extractos acuosos y pueden activar o inhibir las células dendríticas modulando su fenotipo, su actividad biológica y la producción de citocinas tanto a nivel génico como de proteínas.

6. METODOLOGIA UNIFICADA Y DETALLADA DE LOS ARTICULOS.

6.1 Obtención y caracterización química del Galactomanano de *Caesalpinia spinosa*.

El polisacárido neutro tipo Galactomanano fue extraído a partir del endospermo del fruto de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, recolectado en Suba (Bogotá) y autenticada por el Dr. Antonio Mejía, Universidad Juan N. Corpas. El polisacárido fue purificado a partir de la goma tara suspendida en agua, mediante precipitación con etanol absoluto (proporción 1:2) y posteriormente liofilizado. Se preparó una dispersión al 2% del polisacárido en agua estéril apirógena agitando vigorosamente por 1h a temperatura ambiente y luego calentando la dispersión a 80°C en un baño de agua por 30 min bajo agitación continua. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm por 1h a temperatura ambiente para remover el material no disuelto y la concentración de la solución se calculó por gravimetría a partir del contenido de material seco no disuelto. La concentración calculada para la solución del polisacárido fue del 1%.

6.1.2 Métodos Analíticos

La hidrólisis ácida del polisacárido fue realizada por tratamiento inicial de la muestra con ácido sulfúrico al 72% por 1h a 30°C, seguido de calentamiento 1h en autoclave a 110°C en ácido sulfúrico al 4% (152). El hidrolizado fue neutralizado con Na₂CO₃ y los monosacáridos fueron analizados por cromatografía en capa delgada (TLC) y HPLC. El análisis por TLC fue realizado en placas de Sílica Gel 60 (Merck KGaA) con una fase móvil acetato de etilo/propanol/ácido acético/agua (4:2:2:1) y los cromatogramas fueron revelados con el reactivo vainillina/ácido sulfúrico. Así mismo, las muestras fueron analizadas para azúcares como galactosa, arabinosa, manosa, glucosa, xilosa y fructosa por HPLC (Shimadzu Prominence LC-20AT) usando una columna Biorad Aminex HPX-87P a una temperatura fija de 84°C y un detector de índice de refracción (Shimadzu RID-10A). Se empleó agua purificada como fase móvil a un flujo de 0,4mL/min.

6.2 Obtención de la fracciones de *Petiveria alliacea*.

El material vegetal fue recolectado en Viotá, Cundinamarca, e identificado por el biólogo Antonio Luis Mejía como *P. alliacea*. La planta se comparó con la muestra del Herbario Nacional Colombiano, con número de registro 333406 del 12 de agosto de 1991.

6.2.1 Obtención de la Fracción Acuosa (FA)

La fracción acuosa de *Petiveria alliacea* se obtuvo a partir de las hojas y tallos secos de la planta esterilizada con óxido de etileno. El material vegetal fue extraído con 5mL de etanol (EtOH) al 96 % por cada Kg de material; el residuo del material así tratado fue extraído utilizando 2 L de agua caliente por Kg de material. La fracción acuosa así obtenida fue precipitada por adición de 4 volúmenes de EtOH al 75% y posteriormente centrifugada a

8000 rpm por 5 min a 22 °C, el residuo obtenido posteriormente fue liofilizado y resuspendido en agua a una concentración de 50 mg/mL.

La caracterización preliminar de esta fracción fue evaluada por ensayos colorimétricos para determinar azúcares, taninos y compuestos fenólicos. Ensayos de antrona y fenol-ácido sulfúrico permitieron establecer la presencia de azúcares simples en la fracción (monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos) (153). La cuantificación total de proteínas usando ensayos de Bradford reveló un contenido de 927 µg/mL. La presencia de glicoproteínas fue detectada con ácido per yódico, coloración de Schiff y por electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS (154).

6.2.2. Obtención de la Fracción orgánica (FO).

Las hojas secas y los tallos (300 g) fueron extraídos a reflujo (60°C) con 1,5L de etanol al 96% durante 3 h. El extracto etanólico fue filtrado en papel Wattman y evaporado a presión reducida (175 mbares) hasta obtener la mitad de su volumen. Luego se añadió un volumen igual de agua destilada y se calentó en una plancha de calentamiento a 65°C por 20 min. con agitación constante hasta su completa floculación. El floculado fue eliminado por filtración (papel Wattman) y a la fracción soluble se le realizó una extracción exhaustiva (7 veces) líquido-líquido con acetato de etilo (EtOAc), utilizando un embudo de separación. Posteriormente, las siete extracciones fueron mezcladas y evaporadas a presión reducida (240 mbares a 40 °C) hasta sequedad. Dicha fracción fue denominada fracción orgánica (FO)

6.3 Diferenciación de Monocitos a Células dendríticas:

A partir de 15mL de concentrado de leucocitos provenientes de voluntarios sanos que asistieron al banco de sangre del hospital Universitario de la Samaritana (Bogota, Colombia) y que previamente habían firmado el consentimiento informado; se obtuvieron CMSP, utilizando el gradiente de densidad ficoll hypaque (Amercham, GE Healthcare Europe GmbH). Las poblaciones de monocitos CD14⁺ fueron separadas utilizando el estuche de selección positiva MiniMaCs siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante sin modificaciones (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch, Gladbach, Germany). La pureza de las células fue determinada por citometría de flujo realizando el marcaje de 10 ul de las células eluidas con anti-CD14-APC (Pharmingen, San Diego, CA, USA). Los monocitos obtenidos con una pureza superior al 98%, fueron cultivados por 5 días en placas de 24 pozos con 1mL de medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 5%, 2mM de glutamina, 100 UI/mL de penicilina/ estreptomycin (Eurobio, Paris, Francia); como estímulo de diferenciación se utilizaron 800 UI/mL del factor estimulador granulocito macrófago (GM-CSF) y 1000 UI/mL de Interleucina 4 (IL4) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Luego de 3 días de diferenciación la mitad del medio de cultivo fue remplazado con medio fresco suplementado con estas citocinas a la mitad de la concentración establecida. Al día 5 las células dendríticas diferenciadas a partir de monocitos fueron estimuladas por 48 h con diferentes concentraciones del GLM obtenido de *C. spinosa* (7 y 21 µg/mL) y 25 µg/mL de la fracción acuosa e inorgánica (FA y FO) obtenidas de *Petiveria alliacea*. Como control de no activación, las CD fueron colocadas sin estímulo y/o tratadas con los solventes utilizados para resuspender cada fracción (GLM-agua) y (FA- agua y FO (Etanol)).

Como control de maduración, las CD fueron estimuladas con 1 µg/mL de LPS resuspendido en PBS 1X (Sigma, St Louis, MO, USA). Adicionalmente,

el GLM y las fracciones (FA y FO) utilizadas en los ensayos fueron previamente tratadas varias veces con perlas de agarosa recubiertas de Polimixina B (PoIB) (Sigma, St Louis, MO, USA) con el fin de eliminar el posible LPS contaminante. Para descartar cualquier presencia de LPS en las fracciones y en los cultivos, todos los reactivos fueron analizados utilizando la prueba de amebocitos de *Lymlulus spp* (Bio Whittaker Inc., Walkersville, MD, USA) según indicaciones del fabricante. La viabilidad celular fue determinada con azul de tripan para monitorear el potencial tóxico del compuesto y las fracciones utilizadas.

6.4 Análisis del fenotipo de las células dendríticas.

La expresión de marcadores de superficie sobre las CD inmaduras y/o tratadas con el LPS y/o GLM, FA, FO fue evaluada al día 7 de cultivo, con anticuerpos anti-CD1a Pacific Blue, anti-CD86 PE, anti-CD83 FITC, anti-HLA-DR APC-H7, anti-CD209 PercP-Cy5 y anti-CD206 APC (BD Biosciences). La adquisición y el análisis de los datos se realizó utilizando el citómetro de flujo FACSCanto II y los programas de análisis FACSDiva 6.1 y Flowjo 8.7. (FLOWJO) (BD Immunocytometry Systems, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

6.5. Ensayos de Fagocitosis.

Para analizar la capacidad fagocítica de las CD. 100.000 CD/pozo, cultivadas en medio RPMI suplementado SBF al 5% fueron estimuladas o no durante 48 horas con los diferentes tratamientos (LPS, GLM 7 y 21 ug/mL). Las CD inmaduras y estimuladas, fueron lavadas con buffer HANKS y resuspendidas con 100 µL (0,5 ug/mL) de las Biopartículas de *E. coli* pHrodo™ (Invitrogen) durante tres horas a 37 °C. La fluorescencia de las bio partículas fue leída en un fluorometro con un filtro de excitación de 535 nm y un filtro de emisión de 595 nm. (Dy nex Technologies, Chantilly, VA, USA). Adicionalmente, el

porcentaje de células fagocíticas fue analizado por citometría de flujo. Para ello las CD fueron teñidas con anticuerpos anti CD11c-APC y se analizó la población de células doblemente marcadas utilizando el programa Flowjo 8.7 (FLOWJO). Los ensayos fueron realizados por triplicado y los análisis de citometría de flujo fueron realizados como se describió previamente.

6.6. Reacción mixta leucocitaria.

Las CD diferenciadas a partir de monocitos humanos fueron estimuladas por 48 h con LPS (1ug/mL) o con diferentes concentraciones del GLM (7 y 21 ug/mL) en medio RPMI suplementado. Las células así estimuladas fueron recuperadas, lavadas y cultivadas en medio fresco RPMI suplementado con 5 % de suero humano AB GemCell™(Gemini Bio-Products. West Sacramento, CA). 500.000 CD/pozo, fueron colocadas en contacto con diferentes proporciones (1:2, 1:5 y 1:10) de CMSP alogénicas, que previamente habían sido separadas por gradiente de ficoll hypaque y marcados con 2,5 uM de Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE), según recomendaciones del fabricante (Invitrogen). Después de cinco días de co-cultivo, las células fueron colectadas y marcadas inicialmente con el marcador de viabilidad aqua fluorescent reactive dye (Invitrogen) y seguidamente con los anticuerpos anti-CD3 PercP, anti- CD4 APC-H7 y anti CD8 Pacific Blue (BD Biosciences). Las muestras fueron adquiridas en un FACS ARIA (BD Biosciences) y analizadas con el programa Flowjo 8.7 (FLOWJO).

6.7 Expresión diferencial de genes por RT-PCR en tiempo real.

Las CD estimuladas con el LPS y/o GLM, FA y FO fueron utilizadas para la extracción de ARN total utilizando Trizol (GIBCO. Invitrogen. Carlsbad, CA. USA). Se evaluó la concentración y calidad del ARN obtenido por espectrometría usando Nanodrop (NanoDrop products Wilmington, DE USA)

y por visualización de las subunidades ribosomales 26S y 18S en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. El cDNA fue sintetizado a partir del ARN total aislado de cada una de las CD estimuladas, utilizando el ARN PCR core como se describe en el manual (Applied Biosystems, Foster City CA, USA). Para los ensayos de real time PCR (RQ-PCR), se tomaron 3 μ L de una dilución 1/20 del cDNA, 12,5 μ L de 2x master mix SYBR Green PCR (Applied Biosystems Foster City, CA. USA) y 50 – 400 nM de los cebadores sentido y antisentido para cada uno de los genes (Tabla 1. Artículo 1 y 2) en un volumen total de 25 μ L de mezcla. La reacción de amplificación fue llevada a cabo por duplicado en placas ópticas de 96 pozos usando un ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems. Foster City, USA). Las condiciones de amplificación de las muestras fueron las siguientes: denaturación 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 15 s, 60 °C por 60 s (o 62°C por 30 s) y 72 °C por 15 s, seguido de un ciclo final de disociación (95 °C por 15 s, 60 °C por 15 s y 95 °C por 15 s). La especificidad del producto amplificado fue analizada realizando la curva de fusión con diluciones seriadas de cada cDNA en experimentos preliminares de PCR. Como gen normalizador interno se utilizó gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). El valor CT fue calculado para cada una de las muestras en tres experimentos independientes. Para determinar la expresión relativa de estos genes se utilizó el método de comparación $2^{-\Delta\Delta CT}$ donde:

$$2^{-\Delta\Delta CT} = [(CT \text{ gen de interés} - CT \text{ control interno}) \text{ muestra A}] - (CT \text{ gene de interés} - CT \text{ control interno}) \text{ muestra B}].$$

La muestra A corresponde a las CD tratadas y la muestra B a las CD no estimuladas (155).

6.8 Análisis de producción de citocinas.

La cuantificación de citocinas secretadas en el sobrenadante del cultivo de las CD estimuladas con el LPS y/o GLM, FA y FO, fue evaluada después de 24 y 48h con el Kit CBA (Cytometric Bead Array) para citocinas inflamatorias como IL8, IL1 β , IL6, IL10 , IL12p70 y el factor de necrosis tumoral (TNF α) siguiendo las instrucciones del fabricante (CBA; BD Biosciences). Los sobrenadantes de las CD (1×10^6 cell/pozo) cultivadas en placas del 24 pozos fueron colectados y almacenados a -80 °C hasta su análisis. La adquisición y el análisis de los datos fueron realizados en un citómetro de flujo FASCAria, utilizando el Software de análisis FCAP (BD Biosciences, San Jose, CA) (BD Immunocytometry Systems).

7. RESULTADOS:

Los resultados de este trabajo se mostraran a través de la presentación de dos artículos, uno ha sido publicado y el otro aceptado para publicación con correcciones.

De forma adicional se anexa el artículo titulado “Influencia del tratamiento de *Petiveria alliacea* en la expresión diferencial de genes en células tumorales” el cual fue publicado en la revista *Universitas medica* y forma parte de los productos obtenidos durante mi formación académica.

7.1 ARTICULO 1: Galactomannan from *Caesalpinia spinosa* induces phenotypic and functional maturation of human dendritic cells.

(Artículo publicado en la revista *International Immunopharmacology*-
Jun;11(6):652-60. 2011

7.1.1 INTRODUCCION:

En este primer artículo, evaluamos la actividad Inmunomoduladora del Galactomanano obtenido de *C. spinosa* sobre la maduración de las células dendríticas humanas obtenidas de monocitos de sangre periférica a través de la medición de los cambios fenotípicos relacionados con las moléculas que participan en la presentación antigénica, y de actividades biológicas como la fagocitosis, presentación de Ags en un contexto alogénico y producción de citocinas a nivel proteico y génico.

El Galactomanano, presenta una estructura rica en manosa que le permite interactuar con los receptores de polisacáridos presentes en las células dendríticas, como lo mencionamos en la introducción de esta tesis. Otros

Galactomananos se han estudiado en este sentido, pero nunca se ha evaluado el que se obtiene de la *C. spinosa*, el cual presenta diferencias estructurales con el polisacárido obtenido de *Aspergillus fumigatus*, lo que podría significar que tiene actividades biológicas diferentes.

7.2. ARTICULO 2: The immunomodulatory effect of aqueous and organic fractions from *Petiveria alliacea* in human dendritic cells.

(Artículo sometido para publicación en the American Journal of Chinese Medicine)

7.2.1 INTRODUCCION

Petiveria alliacea ha sido implicada en múltiples actividades biológicas, algunas de ellas posiblemente antagónicas como la anti-tumoral Vs anti-reumática y anti-inflamatoria (109), (132), (143). Tradicionalmente la planta se consume vía oral en infusiones acuosas, aunque también se ha reportado su uso en forma de emplastos (130), (138). Así mismo es posible adquirir las hojas y tallos molidos en comprimidos como medicamento herbal (156), (157). De forma importante se ha observado que este tipo de infusiones tienen un alto contenido de metabolitos primarios tipo polisacáridos y una menor cantidad de metabolitos secundarios debido a su baja solubilidad en solventes acuosos (158). La actividad biológica que ejercen estos metabolitos es diferente, dadas sus diferencias químicas, su biodisponibilidad así como sus posibles blancos moleculares. Para los PS se ha descrito que aquellos que poseen mayor actividad inmunomoduladora y antitumoral, poseen una estructura química conformada por hetero- β -glucanos, (159), heteroglicanos, b-glucano proteínas, o glucano proteínas, (160), (161), (162). De igual forma se ha postulado que los PS provenientes de hongos que contienen monosacáridos de tipo glucosa y manosa, podrían tener mayor actividad antitumoral ya que podrían interactuar directamente con diferentes receptores (CR3-(CD11b/CD18) (28), (27), Dectina 1, 2 (30), (31), (32) o DC SIGN (78), que tienen una alta afinidad por este tipo de azúcares y que se encuentran expresados en macrófagos y CD (163), (79), (77), (80). Adicionalmente, se ha observado que los PS con mayor bioactividad poseen a nivel estructural cadenas de monosacáridos unidos por enlaces β 1-3, 1-4 o 1-6, y de forma importante se ha descrito que los b-glucanos con enlaces

1-3, son más inmunoestimulantes debido a su conformación de triple hélice que como propone Muller les podría dar mayor rigidez y orden, lo cual favorecería su reconocimiento por receptores presentes en células inmunes. Un ejemplo de ello es el Lentinan obtenido de *Lentinula edodes* (Shiitake), que cuando es sometido a denaturación con DMSO o urea pierde su estructura terciaria y así mismo su actividad antitumoral (161). Adicionalmente, se ha descrito que las cadenas de monosacáridos que se encuentran unidas por enlaces 1-6 comparado con las uniones 1-3, tienen menor actividad al parecer debido a su flexibilidad inherente que le permite tener distintas conformaciones (164). Hasta el momento no se han descrito los polisacáridos presentes en *P. alliacea* extraíbles en soluciones acuosas, sin embargo, es importante tener en cuenta que la diversidad estructural de estas moléculas podría explicar en parte las múltiples actividades que ejerce esta planta.

En cuanto a la actividad de los metabolitos secundarios, principalmente aquella que implica la activación del sistema inmune, se han implicado algunos de los metabolitos secundarios presentes en esta planta como el DTS, para el cual se ha descrito que su efecto antitumoral radica directamente en la inhibición de la proliferación de líneas de células tumorales (neuroblastoma (SH-SY5Y), carcinoma mamario (MCF-7), melanoma (IPC), leucemia de células T (Jurkat) (143), (144), (145), y aunque no se ha implicado al sistema inmune en esta actividad, se ha observado que en ensayos de reacción mixta leucocitaria, el DTS disminuye la secreción de citocinas pro-inflamatorias (IL1 β , IL6, IL8, IL12p70, TNF α) (151) que han sido asociadas con la inducción de una respuesta inmune antitumoral (165), (166), (167), (44), (168) y por otra parte favorece la producción de citocinas TH2 como la IL4. Teniendo en cuenta esta característica algunos autores proponen que esta molécula también podría ser utilizada en el tratamiento de enfermedades autoinmunes (169).

Dada la complejidad molecular de la planta, y las múltiples actividades que se le han atribuido, quisimos evaluar la actividad de dos fracciones obtenidas de *P. alliacea*, una de carácter acuoso, rica en metabolitos primarios principalmente polisacáridos y la segunda rica en metabolitos secundarios, extraídos en solventes orgánicos. Escogimos como blanco las células dendríticas humanas, dado que las actividades en las cuales se implica *P. alliacea*, corresponden a diferentes formas de activación de la respuesta inmune, ya sea la inducción de linfocitos T efectores, por una célula dendrítica madura, la inducción de tolerancia por una célula dendrítica parcialmente madura, o la inducción de respuesta TH2 (170), (171), (172). Este análisis nos permitió evaluar en el artículo que presentamos a continuación, cuáles de los metabolitos inducen una actividad sobre las células dendríticas, con el fin de comenzar a decorticar la actividad biológica de la planta y la búsqueda diferencial de los compuestos implicados en su actividad.

8. DISCUSION GENERAL.

8.1 Efecto inmunomodulador del Galactomanano purificado de *C.spinosa*.

Teniendo en cuenta el potencial adyuvante que tendrían las CD en la generación de la respuesta inmune, en este estudio se determinó la actividad inmunomoduladora que podrían tener polisacáridos como el Galactomanano en la activación de las CD. Los resultados obtenidos muestran que el PS Galactomanano obtenido de *Caesalpinia spinosa*, incrementa a nivel fenotípico la expresión de moléculas coestimuladoras como CD83, CD86 y del CMH-II que son requeridas para que se genere la estimulación de células T (106) y que adicionalmente permite clasificar a estas CD dentro de un estadio maduro (173), (7). Así mismo encontramos que también favorece la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias como la IL1 β , IL6, IL8, IL10, IL12p70 y el TNF α , que como se ha descrito son controladas a nivel transcripcional por el NF- κ B (173), (69), (71), el cual también se encontró sobre regulado a nivel de ARN luego del tratamiento con el Galactomanano. Adicionalmente, el estímulo de maduración generado por este polisacárido lleva a la disminución de la fagocitosis, hecho que ha sido reportado y que corrobora la transición de las CDi en proceso de maduración (90). Adicionalmente, determinamos por ensayos de MLR como la estimulación con este PS favorece la presentación de Ags que conduce a un aumento en la proliferación de linfocitos T alogénicos. Al evaluar la expresión a nivel de ARNm de diferentes genes en las CD, se encontró que el Galactomanano induce por un lado el aumento en la expresión en más de dos veces de los genes para la IL12p70, IL1 β , IL23, IL6, TNF α , IFN γ , ILT2 y NF- κ B, así como la disminución en la expresión de los genes para TGF- β y TLR4.

Algunos patógenos, como microorganismos causantes de enfermedades crónicas, poseen diversas estrategias que les ayudan a evadir la respuesta

inmune, una de ellas se basa en modular la activación de la CD (174); en estudios realizados *in vitro* se ha observado que las CD infectadas con promastigotes de *Leishmania mexicana* no sobre regulan la expresión de moléculas como CMH-II y CD86 y no secretan IL12, pero si pueden activarse en respuesta a otros estímulos (LPS/INF γ) (175). De igual forma se ha observado que las CD inmaduras aisladas de pacientes chagásicos y estimuladas con proteínas del parásito (HSP70-T) o con péptidos como el K1 (derivado de la proteína KMP-11 de *T. Cruzi*), secretan altos niveles de IL10 y bajos niveles de IL12, cuando se compara con los niveles de citocinas secretadas por CD provenientes de pacientes sanos, estos hallazgos sugieren que las CD provenientes de pacientes chagásicos actúan como células reguladoras negativas de la respuesta inmune frente a este parásito (176), (177).

Así mismo en enfermedades como el cáncer se ha observado que la presentación de Ags tumorales es llevada a cabo en condiciones donde las CD que infiltran el tumor no están totalmente activadas, son inmaduras o son CD inmunosupresoras que conducen a la anérgia o a la deleción de células T específicas de tumor (17), (178), (98), (101). Las células tumorales como se describió anteriormente secretan citocinas (IL6, IL10, TGF- β , M-CSF, VEGF) que pueden inhibir la diferenciación y la maduración de las CD (179). Gavrilovich en 1996 demostró que al cultivar y diferenciar células CD34+ hacia CD en presencia de sobrenadantes de líneas de células tumorales de seno y colon, las CD diferenciadas carecían de su morfología típica, expresaban de forma reducida el CMH-II y su capacidad de tomar Ags solubles disminuía. En experimentos adicionales Gavrilovich pudo establecer por primera vez que el VEGF es uno de las principales factores que interfiere con la diferenciación y función de las CD, ya que al colocar la proteína recombinante VEGF en cultivo junto con las células CD34+, las CD diferenciadas reducen significativamente su habilidad de estimular células T alogénicas (100).

El estadio de maduración en el que se encuentren la CD, ha sido relacionado con su capacidad de modular la respuesta inmune (2). Como respuesta a la homeostasis o de tolerancia a lo propio, las CD inmaduras o semimaduras favorecen la respuesta tolerogénica, mientras que en respuesta a patógenos o señales de peligro entre otros, la CD madura genera respuesta inmune inflamatoria (7), (102), (5). La activación y maduración de las CD juega un papel central en la inducción de la respuesta inmune frente a patógenos y células tumorales entre otros, dado que la polarización de la respuesta de las células T que se genera depende de la señal derivada de la célula presentadora de antígeno (78), (92).

El fenotipo encontrado en las CD estimuladas con el Galactomanano, sugiere que la modulación que genera el polisacárido podría inducir la activación de CD que permitieran la activación de células T vírgenes, ya que se induce la sobre expresión de moléculas como el CMH-II, CD86 y CD83 que como ha sido previamente reportado con lleva a la expansión clonal de la célula T, secreción de citocinas y la ejecución de la función efectora de las mismas (106), (91), (89), (178). La maduración de la CD es típicamente generada por el reconocimiento de patógenos microbianos o virales (LPS, CpG ADN o ARNs) a través de receptores TLR (70). La interacción de estos receptores con sus ligandos tiene como consecuencia la inducción de efectos pleiotrópicos en la CD que promueven la sobrevivencia de la célula, la secreción de citocinas (IL-1, IL-6 o TNF α), expresión de receptores de quimiocinas, migración, cambios en el citoesqueleto (180), (67), así como la regulación de señales involucradas en la presentación de antígeno, expresión de moléculas coestimuladoras y secreción de citocinas que con lleva a la expansión clonal de la célula T, secreción de citocinas y la ejecución de la función efectora de las mismas (106), (91), (89), (178).

La generación de la respuesta inmune adaptativa es orquestada por el balance entre señales coestimuladoras e inhibitorias, que son predominantemente controladas por tres grupos de moléculas pertenecientes a la familia B7 (181). En el grupo I se encuentran las moléculas B7 activadoras que incluyen B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) y B7-H2; B7-1 y B7-2 tienen un restringido patrón de expresión inducible sobre CPA, como macrófagos, CD, células hematopoyéticas y células T activadas. Las moléculas B7-1 y B7-2 se unen de forma promiscua al receptor estimulador CD28 y al receptor inhibitorio CTLA-4 (182), (183). La interacción de CTLA-4 con los mismos ligandos, actúa como un regulador negativo de la activación de las células T dependiente de CD28 (184), (181). Frente a la administración de anticuerpos bloqueadores de la interacción (B7-CD28) *in vitro* se ha observado que la falta de esta señal conduce a la generación de linfocitos T anérgicos específicos de antígeno los cuales son incapaces de producir por si mismos IL2 (185). El rol crítico de la interacción B7-CD28/CTLA4 es un hecho determinante de la respuesta inmune (activación versus anergia) que se ha convertido en un blanco atractivo de inmunomodulación terapéutica en enfermedades autoinmunes y en trasplante de órganos (186), (187). Por otro lado B7-H2 es expresado sobre células B, macrófagos y tejidos no linfoides, que se unen a otros miembros de la familia CD28, el co-estimulador inducible (ICOS) que se expresa sobre células B y T activadas, mediando señales coestimuladoras. Análisis realizados en ratones deficientes de B7-H2 demostraron que esta vía es también requerida para la activación, diferenciación y ejecución de la función efectora de células T CD4+ (188).

En el grupo II de B7 se encuentran moléculas como B7-H1 (PD-L1) y B7-DC (PD-L2), ligandos del inmunoreceptor 1 de muerte programada (PD-1) (receptor tirosina basado en motivos inhibitorios (ITIM) el cual es expresado sobre células T activadas, células B, CD, células NKT y monocitos no activados; la interacción de estas moléculas con PD-1, modula la

señalización generada a través del TCR y el BCR, controlando de esta forma la inducción y el mantenimiento de la tolerancia inmune periférica (189), estudios realizados en animales PD-1(-/-) confirman la función tolerogénica de esta molécula ya que estos animales desarrollan enfermedades autoinmunes sugiriendo el rol inhibitorio de PD-1 en la respuesta inmune (190).

El grupo III de B7 incluye miembros como B7-H3 y B7-H4, para los cuales no se ha definido un receptor. Aunque la evidencia experimental muestra que B7-H3 estimula la proliferación, secreción de citocinas y la actividad citolítica de las células T, otros estudios han demostrado la función inhibitoria de B7-H3, incluyendo la discapacidad de diferenciación de respuesta TH1 y la lisis mediada por células NK (191).

En adición al reconocimiento de PAMPs, también se ha comprobado que las citocinas proinflamatorias como TNF α , IL1 β median la maduración y la expresión de moléculas coestimuladoras en la CD (86). Cuando las CD se encuentran en estado inmaduro, el CMH-II se encuentra almacenado en compartimientos endosomales; pero después que la CD recibe el estímulo de maduración este complejo se acumula en la membrana plasmática (86), (3). Estudios realizados por Puré en 1990, mostraron como al inhibir la síntesis de proteínas durante la maduración de la CD, se disminuye la acumulación del CMH-II en la superficie de la célula sin verse afectada la degradación del pool endosomal pre-existente, lo que indica que una vez la CD recibe la señal de maduración se induce la síntesis de novo del CMH-II (192), (193), (194), (88). La síntesis de un nuevo CMH-II favorece el acoplamiento eficiente y la presentación del péptido antigénico dentro de moléculas del CMH-II recién sintetizadas (195). El proceso de síntesis de estas moléculas en las CD se desarrolla de forma gradual después de las primeras cuatro horas de estímulo y disminuye gradualmente; estudios realizados con CD diferenciadas *in vitro*, han mostrado como la síntesis del CMH-II disminuye

relativamente despacio, en alrededor de un tercio del nivel de lo encontrado en las CD inmaduras un día después de que la maduración fue iniciada (194), (196). Recientemente se ha descrito que la expresión del CMH-II en CD inmaduras se encuentra regulada por la ubiquitinación del residuo lisina 225 localizado en el tallo citoplasmático de la cadena β del CMH-II, mediada por MARCH-I una ubiquitin ligasa E3 perteneciente a la familia de proteínas asociadas a membrana RING-CH I (MARCH) (197). Una vez el proceso de maduración se disminuye, la ubiquitinación del pool de moléculas CMH-II, favorece su acumulación en la superficie de la célula (198). Las proteínas que median este proceso (MARCH-I) se expresan en nódulos linfoides, bazo y en CPA, células B y CD (197), (199). En estudios realizados en ratones knockout para MARCH-I se encontró de forma interesante que no solo esta ubiquitin ligasa media la degradación lisosomal de CMH-II de las CD inmaduras, si no que adicionalmente la no expresión de esta proteína conlleva la sobre expresión en superficie de CD86. Lo que sugiere que esta proteína en particular es necesaria para el mantenimiento y la función de la CD convencional en estado de equilibrio (no inflamatorio) (200).

Estudios realizados por Pierre y Gatti en el 2008 demostraron que las señales inducidas por la estimulación con LPS a través de TLR4 inhiben la expresión del ARNm para MARCH-1 y a su vez se inhibe la ubiquitinación del CMH-II en CD derivadas de monocitos (CDDM) (201).

La maduración de la CD en respuesta a ligandos de TLR está también marcada por la inducción CD83 (202), pero a diferencia de la CMH-II y CD86 la función de esta en la activación de los LT es desconocida (203). Al igual que CD86, la proteína CD83 consta de un solo dominio extracelular de tipo Inmunoglobulinas (Ig), un segmento que atraviesa membrana y un tallo citoplasmático. Esta proteína se expresa fuertemente en CD maduras (202), y también puede ser inducida en células T (con péptidos antigénicos o anticuerpos específicos para TCR) y B activadas (203), (204) bajo el control

del factor de transcripción NF- κ B (205). Estudios en donde se interfiere con la expresión de CD83, han observado que la falta de esta molécula disminuye la capacidad de estimulación de la CD inhibiendo la activación *in vivo* e *in vitro* de linfocitos T(206), (207), (208). Basados en esta observación se ha postulado que la función de esta molécula podría mediar una señal co-estimuladora para la activación del LT, sin embargo existe aún controversia en cuanto a su función ya que estos resultados no han sido reproducibles en otros estudios (209) y no hay un ligando conocido de esta molécula. Recientemente, se ha reportado que el dominio transmembranal de CD83 también favorece la expresión del CMH-II y CD86, ya que esta región interactúa con la proteína MARCH-I inhibiendo así la asociación y degradación del CMH-II y de CD86 (210).

Una fuente interesante y prometedora de moléculas inductoras de maduración de las CD son los polisacáridos. Varios reportes han mostrado la bioactividad de los PS de plantas y el rol potencial de estas moléculas en terapia del cáncer dadas sus propiedades inmunoestimuladoras; las cuales incluyen activación de macrófagos (211), monocitos (212), células asesinas naturales (NK) (213) y CD (58) entre otras.

Los resultados obtenidos con el Galactomanano en este estudio demuestran la capacidad inmunoestimuladora que tiene este polisacárido rico en manosa y galactosa sobre las CD. Al comparar nuestros resultados con lo reportado para otros tipos de PS, encontramos que la estimulación de CD con las conidias de *Aspergillus fumigatus* las cuales son ricas en Galactomanano, favorece al igual que nuestro Galactomanano la inducción de moléculas coestimuladoras como el CD83 y CD86 en CD de Langerhans diferenciadas *in vitro*, (122); sin embargo, contrario a nuestros hallazgos las conidias inducen la producción de IL10 en ausencia de IL12p70, lo cual favorece la respuesta de LT de tipo TH2 acompañada de la disminución de la proliferación de LT alogénicos (123). En comparación, el Galactomanano

obtenido de *C. spinosa* induce un perfil de citocinas diferente, en donde encontramos IL10, junto con la producción de IL12p70 y favorece la proliferación de LT alogénicos.

Las diferencias encontradas en nuestro estudio con lo reportado para el Galactomanano presente en las conidias de *A. fumigatus*, podrían deberse al tipo de componentes que se encuentran en las conidias de este hongo, ya que aunque son ricas en este polisacárido también se ha reportado contienen β -glucanos, quitina, α -glucanos (214) que en conjunto podrían regular la respuesta inmune de forma diferente a lo reportado por nosotros. Chai en el 2011 da evidencia de la regulación que puede generar cada uno de los polisacáridos constituyentes de la pared celular de este hongo, ya que al realizar ensayos de estimulación de CD con ligandos de TLR2 (Pam3Cys) y TLR4 (LPS) en presencia de β -glucano y el Galactomanano, se observa que el β -glucano inhibe específicamente la secreción de citocinas como IL6 frente al estímulo generado por el ligando de TLR2, mientras que el Galactomanano inhibe la secreción de esta citocina a través de TLR2 y también de TLR4 (214). Por otro lado, el aumento en la expresión del factor de transcripción NF κ B en las CD estimuladas con el Galactomanano de *C. spinosa* se correlaciona con lo previamente observado para el Galactomanano obtenido de *Morchela sculenta* (126) así como para el PS Angelan obtenido de *Angelica gigas* (58) y el PS obtenido de *Ganoderma lucidum* en donde se observa también un aumento en la expresión de NF κ B (215). El aumento en la expresión de este factor contribuye a la regulación transcripcional de varios genes en las CD que son requeridos en el control de la respuesta inflamatoria a través de la inducción de citocinas inflamatorias (IL1, IL6, IL8, IL10, IL12, IL17, IL23 y TNF) y a su vez con la activación y maduración de CD (165), (167), (168). El NF κ B es un factor transcripcional involucrado en un amplio rango de procesos biológicos, que incluyen la respuesta inmune, sobrevivencia de la célula, respuesta a stress y la maduración

de varios tipos de células (76), (67), (216). La familia de factores de transcripción de NF κ B existe como homodímero o heterodímero de cinco proteínas distintas NF- κ B1 (p50 y su precursor p105) NF- κ B2 (p52 y su precursor p100), RelA (p65), RelB y cRel (168). En la mayoría de células el NF κ B es mantenido inactivo en el citoplasma por un complejo de proteínas inhibitorias (I κ B) pero frente a múltiples estímulos inmunes, entre los que se encuentran citocinas, estimulación a través de TCR y ligandos de TLR, las proteínas I κ B son fosforiladas y degradadas por el proteasoma (67). En el caso de NF- κ B1 el procesamiento proteolítico de p105 produce p50, el cual se homodimeriza o heterodimeriza antes de translocarse al núcleo y unirse a elementos κ B encontrados en las regiones reguladoras de los genes blanco de actividad de este factor (217), (218). Este factor de transcripción es un elemento clave en la determinación del fenotipo de la CD, por lo tanto la inhibición de la activación del NF κ B ha sido propuesto como una estrategia para mantener a las CD en estado inmaduro y promover la tolerancia inmune (219), (220).

Una característica funcional de la CD, es su capacidad de polarizar la respuesta inmune de las células T ayudadoras a través de la secreción de citocinas (3), (64), (221). La estimulación que induce nuestro Galactomanano favorece la producción de citocinas pro inflamatorias como la IL1 β , IL6, IL8, IL12p70, TNF α y de forma paralela la IL10. Estos resultados son comparables con lo que previamente ha sido reportado para otros PS que igualmente modulan la secreción de citocinas en las CD. En experimentos realizados utilizando como estímulo el acemanan se ha observado que induce la producción de IL12 en CD de ratón (222) y de IL1 β y TNF α en macrófagos (50). Cao en el 2002 también mostró que los PS obtenidos de Ganoderma (PS-G) inducen en CD de ratón el aumento en la expresión a nivel de gen y proteína de la IL12p40 (33). Los análisis del perfil de genes (realizado por Microarrays) generado en las CD derivadas de monocito

tratadas con PS-G, también evidenciaron el aumento en la expresión de las citocinas IL12, IL23 e IL27; con el fin de confirmar los resultados obtenidos en los Microarrays, en este mismo trabajo se investigó en ratones BALB/c el efecto de estos PS-G en la inducción de respuesta de Ac y la producción de citocinas frente a un antígeno específico. Para ello se inmunizaron ratones con ovoalbúmina (OVA) con el PS-G y se pudo demostrar que los niveles de anticuerpos anti-OVA IgG2a se incrementaban significativamente cuando se comparaban con los Ac producidos por los ratones inoculados solo con OVA (223). Así mismo, se ha encontrado que el PS Angolan también incrementa de forma eficiente la secreción de IL12p40 (58). Igualmente reportes del efecto de los PS de *Juniperus scopolorum* sobre macrófagos peritoneales murinos y fagocitos mononucleares, demostraron que esta fracción tiene una potente actividad inmunomoduladora que favorece la secreción de citocinas proinflamatorias (IL1 β , IL6, TNF α , e IL12p70) y anti inflamatorias (IL10) (16). Uno de los mecanismos que juega un papel importante en la actividad inmunoreguladora de la CD es la secreción de citocinas. La producción de citocinas por CD en estado de equilibrio contribuye a mantener la homeostasis normal en el individuo, mientras que las citocinas secretadas por CD activadas pueden contribuir en varios aspectos a la respuesta por agentes infecciosos a través de la estimulación de mecanismos efectores y la iniciación y polarización de la respuesta inmune (2)

Las CD pueden secretar un diverso panel de citocinas que en conjunto con las moléculas de superficie que estas expresan inducen la polarización de células T vírgenes hacia un perfil TH1, TH2, T reg o TH17 (5). De manera importante el Galactomanano induce la producción de la IL12p70 la cual como se sabe es producida por CD activadas que inducen la proliferación de las células NK y la polarización de los LT ayudadores hacia un perfil TH1 (224), (225); el cual como se ha reportado conlleva a la generación de inmunidad mediada por células frente a enfermedades infecciosas o cáncer. La importancia de la IL12 en la generación de respuesta inmune protectora

es validada por el hallazgo de que en humanos y modelos experimentales murinos que poseen mutaciones genéticas que bloquean las vías de señalización dependientes de IL12 o IFN γ , se observa una marcada sensibilidad a patógenos intracelulares como *Mycobacterium* y especies de *Leishmania* (226). La IL12, IL23 e IL27 son miembros de la familia de citocinas IL12 relacionados estructuralmente (166). Cada una es un heterodímero, conformado por una subunidad hélice alfa (p35, p19 o p28) combinado con una subunidad soluble (p40 o la proteína inducida por Epstein Barr (EBI3)). La forma funcional de la IL12 está formada por las subunidades p35 y p40; IL23 por p19 y p40 e IL27 por p28 y EBI3 (5), (166). Los genes que codifican para la IL12 necesitan ser expresados de forma coordinada para producir el heterodímero biológicamente activo (166). En ausencia de IL12p35 o IL23p19, p40 es secretada como monómero o homodímero, donde p35 puede ser secretado únicamente cuando es asociado con p40. El ARNm codificante para IL12p35 está presente en varios tipo de células mientras que el ARNm codificante para p40 se ha visto restringido a células que producen el heterodímero biológicamente activo (células B, Macrófagos y CD) (227). La unión de este heterodímero se produce a través de puentes disulfuro y es secretado, normalmente bajo estímulo, sin embargo IL12 puede existir de forma preformada asociada a moléculas de membrana y ser rápidamente liberada (10 min) ante el contacto con microorganismos intracelulares como *Leishmania* en ausencia de transcripción de novo (228). Estas observaciones y los encuentros en las mediciones en términos de expresión (24h) y producción (24 y 48h) de IL12 encontrada con el Galactomanano, nos lleva a pensar que efectivamente la estimulación que produce nuestro polisacárido puede inducir la maduración de la célula y la inducción de síntesis de novo de la IL12 en las CD.

De forma llamativa también se ha observado que frente a productos bacterianos como el LPS, la IL12 tiene una cinética de liberación más retardada (2-4h), ya que depende de la transcripción y acumulación de novo

del ARNm de p40 y p35 en la célula (228). Basados en los reportes existentes de moléculas que median la activación y maduración de la CD, en nuestro estudio utilizamos como control de maduración el LPS, para el cual encontramos resultados comparables con lo previamente reportado en cuanto a la inducción no solo de moléculas CMH-II y coestimuladoras si no a su vez del aumento en la expresión de ARNm y la secreción de la IL12p40 en las CD (229), (230). La IL12 es requerida para la producción de citocinas como el IFN γ , el cual favorece la sobre expresión de moléculas CMH-I y CMH-II en las CD y así mismo la generación y actividad de CTL a través de la activación de STAT-4 (229), (231); la transducción de la señal a través del receptor de IL12R induce la fosforilación de proteínas pertenecientes a la familia de Janus Kinasas (JAK2 y TYK2) las cuales fosforilan y activan factores de transcripción transductores de señal y activadores de la transcripción 1 (STAT1), STAT3, STAT4 y STAT5. Una vez se da el contacto entre la CD (CD80, CD86) y el LT, la estimulación a través de CD28 favorece la expresión del receptor para la IL12 lo cual a su vez promueve que se dé la activación de STAT4 y la inducción de IFN γ (232), (233).

De manera interesante se ha observado que tanto en células T CD4 como en CD8, STAT4 es requerido para la inducción de IFN γ producido por el estímulo con IL12 pero únicamente las células T CD4 requieren la producción de STAT4 para la producción de IFN γ en respuesta a la activación a través del TCR (233). El IFN γ así mismo tiene la capacidad de aumentar la producción de la IL12 (p40 y p35), en un mecanismo de retroalimentación positiva durante la respuesta inflamatoria y la respuesta mediada por células TH1. Las células T también aumentan la producción de IL12 a través de la interacción directa célula-célula a través de ligandos de la familia TNF expresados en las células T activadas como el CD40L (234), (166).

Otra de las citocinas producidas por las CD en presencia del Galactomanano es la IL10, esta citocina fue originalmente descrita en 1988 como un “factor inhibitorio de citocina” (CSIF) producido por células TH2, que tiene la capacidad de inhibir la secreción de citocinas por parte de los TH1 (235). La IL10 es producida por macrófagos, CD, Células B (236) y diferentes grupos de células T como: las células T reguladoras (Tregs), (Tr1) (237), (238) y células TH17 (239). Otras células no inmunes que secretan IL10 son los queratinocitos, las células epiteliales y las células tumorales (240), (241). La producción de IL10 por CD mieloides es relativamente baja cuando se compara a la producida por macrófagos (242). En general se ha observado que la estimulación a través de los TLR, especialmente con ligandos de TLR2 genera mayor producción de IL10 que los ligandos de TLR4 (30); en experimentos realizados por Dillon en el 2006, se pudo determinar que las CD derivadas de monocitos humanos u obtenidas de ratón, al ser estimuladas con ligandos de TLR2 y Dectin-1 (Zimosan obtenido de la pared celular de levaduras) adquieren un perfil de CD reguladoras secretoras de abundante IL10 con poca o nada IL6 e IL12p70, favoreciendo de esta forma la respuesta de células T reguladoras (105), (170), (1), (172). En el caso contrario si se estimulan las CD con LPS, ligando de TLR4, la CD secretan IL10 pero acompañada de la producción de las citocinas IL6 e IL12 y favorece la expansión clonal de células T efectoras específicas de antígeno (243), (244). La inducción de las CD reguladoras bajo el estímulo de Zimosan parece ser generada vía activación de TLR2 y Dectin-1 dependiente de la activación de ERK MAPK, la cual promueve la producción de IL10 (244).

De manera interesante observamos que bajo el estímulo del Galactomanano la expresión de la IL10 a nivel de ARN se encuentra disminuida a las 24h, mientras que la proteína es detectable en los sobrenadantes de las CD a las 24 y 48h de estímulo. Estos resultados indican que la señal generada por el PS, podría inducir la síntesis de esta citocina y luego la regulación de su expresión a través de mecanismos de desestabilización del ARNm que

previamente han sido reportados para algunas citocinas (245).

Los niveles fisiológicos de la proteína son estrictamente controlados por varios mecanismos, entre ellos, la tasa de producción del ARNm (transcripción) y degradación de las proteínas, así como la estabilidad del ARNm y la eficiencia en su traducción (246). La regulación de la estabilidad del ARNm es compleja y como se ha descrito se realiza de manera dependiente de elementos reguladores dentro de la región codificante o no transcrita del ARNm. La regulación de la estabilidad de esta molécula parece depender de la interacción entre elementos intrínsecos que actúan en cis y factores que actúan en Trans. Los elementos que actúan en cis consisten en secuencias primarias altamente conservadas (247), (248) o estructuras estables de tallo y lazo (stemloop) (249). Uno de los elementos en cis mejor caracterizado es el motivo AUUUA o elemento mínimo rico en AU (ARE). Estudios en mamíferos han mostrado que este elemento se encuentra ubicado en la región 3'- no traducida (3'UTR) de aproximadamente el 5 al 8% de los genes transcritos por las células de estos individuos (250). Varios procesos de traducción de la señalización han sido asociados con cambios en la estabilidad del ARN; por ejemplo en las células T se ha mostrado que el ARNm para la IL2 es inherentemente inestable debido a la presencia de las secuencias ARE en el 3'UTR, sin embargo una vez se da la activación de la célula T, el ARNm IL2 es estabilizado por la activación de la vía c-Jun aminoterminal kinasa (JNK) (245). Así mismo se ha descrito que bajo el estímulo del LPS las líneas de células leucémicas promonocíticas humanas (THP-1), regulan tempranamente (4h) la expresión de la IL10 por mecanismos que favorecen la estabilidad del ARNm y que dependen de la vía de activación de NFκB (251). Adicionalmente, se ha observado que moléculas con actividad antitumoral como el taxol obtenido de *Taxus brevifolia*, utilizan mecanismos de desestabilización del ARNm codificante de proteínas como el BCL-2 que regulan la sobrevivencia de líneas leucémicas humanas HL-60 (252).

Otra de las citocinas que encontramos aumentadas a nivel de gen y proteína en las CD tratadas con el Galactatomanano y que de forma importante ha sido asociada con inducción de la respuesta anti tumoral es la IL1 β . Como se ha establecido la activación de este tipo de citocina es mediada por la interacción de receptores TLRs y NLRs que favorecen la generación de pro IL1 β y otras citocinas inflamatorias entre las que se incluyen la pro IL18 e IL33 (253), (254). La señalización a través de los ligandos de TLR como el LPS inducen la activación del NF κ B y la subsecuente expresión del gen y síntesis de la pro IL1 β ; sin embargo para que la proteína sea secretada de forma activa requiere la generación de una segunda señal que se genera a través de receptores NALP1 y NALP3 que inducen la formación del complejo citoplasmático multiprotéico conocido como inflamosoma (255). La activación de este complejo favorece la expresión de caspasas inflamatorias como la caspasa 1 (también conocida como enzima convertasa de IL1 β) que es la encargada de clivar la pro IL1 β a su forma activa IL1 β (256), (257).

El receptor NALP3 reconoce un amplio rango de componentes, entre los que se incluyen ARN bacteriano, ATP y cristales de ácido úrico, entre otros (258). De manera interesante se ha visto que en el proceso de muerte inmunogénica inducida por radioterapia y algunos agentes quimioterapéuticos, como las antraciclinas y el oxaliplatín se induce la exposición de señales de peligro como: la calreticulina en la membrana plasmática de las células tumorales, (259), la liberación de la proteína de alta movilidad box 1 (HMGB1) del núcleo de la células a los alrededores de las células muertas (260) y la secreción de la adenosin trifosfato (ATP). El reconocimiento de estas señales de muerte inmunogénica por parte de las CD, es mediado a través de los receptores TLR4/HMGB1 y NALP3/ATP. El reconocimiento del ATP a través de NALP3 o cryopirina, media la activación del inflamosoma en la CD favoreciendo la respuesta inmune contra las células tumorales. Ensayos realizados *in vitro* por el grupo de Zitvogel y Kroemer, mostraron que las CD Casp1 $^{-/-}$ derivadas de medula ósea de ratón

al ser incubadas con el linfoma de células T murino EL4 previamente tratado con oxaliplatin (EG-7), fallan en la activación de células T vírgenes de ratones OT-1. Adicionalmente, con el fin de demostrar el papel directo de la IL1 β en la estimulación de células T CD8, los autores estimularon células T CD3+CD8+ de baso de ratón por cross-linking simultaneo de CD3 y CD28 en ausencia y presencia de la IL1 β ; los resultados obtenidos muestran como en ausencia de la proteína IL1 β recombinante, las células CD8+ vírgenes no producen IFN γ (261).

La mayoría de adyuvantes activan receptores de la inmunidad innata como TLR; recientemente se ha visto que de igual forma algunos adyuvantes pueden interactuar con receptores de tipo NLR e inducir la activación del Inflamosoma. El aluminio es uno de los adyuvantes más utilizados en vacunación debido a la baja toxicidad que posee y a la efectiva respuesta inmune que genera, que como se ha descrito en parte se ve favorecida por la activación del inflamosoma (44),

La inducción de inflamación crónica que incluye la sobre activación de IL1 β ha sido considerada como una condición promotora del tumor(262), sin embargo como se ha mostrado la inducción de la muerte inmunogénica de la célula tumoral favorece la respuesta inmune través de mediadores proinflamatorios como la IL1 β (261). Aunque todavía existe la pregunta acerca de qué proceso inflamatorio con lleva la progresión en cáncer y cual inhibe el crecimiento tumoral, sin embargo la actividad antitumoral de los Polisacáridos, la cual no parece favorecer el desarrollo tumoral, (26), (162), (263), podría estar mediada por la inducción de un proceso de activación local y controlado de las células blanco, en este caso las células dendríticas, las cuales inducirían posteriormente una respuesta capaz de inhibir el crecimiento tumoral.

8.2 Efecto inmunomodulador de la fracción acuosa y la fracción orgánica obtenida de *Petiveria alliacea*.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la fracción acuosa (FA) contraria a la orgánica induce diferentes perfiles de activación de las CD. Por un lado encontramos que la FA induce cambios a nivel morfológico de las células que pueden compararse con los mostrados por las CD maduras con el LPS. Así mismo esta fracción induce un leve aumento en la expresión de la molécula coestimuladora (CD86), en una pequeña población de células, y no induce aumento en la expresión de las otras moléculas evaluadas, asociadas al estado de maduración de la célula (CD83, CMH-II). Adicionalmente, se encontró que la FA induce la síntesis de IL1 β en una proporción mayor al compararse con el LPS.

Tradicionalmente se utilizan las infusiones acuosas de la planta aunque también se encuentra reportado su uso en forma de emplastos (138), (130). A estas preparaciones se le ha atribuido actividad inmunomoduladora (264), (132), sin embargo, no se ha identificado ni el blanco celular ni los metabolitos implicados en esta actividad. En trabajos previos realizados por nuestro grupo y otros, se ha mostrado que las fracciones orgánicas de la planta tienen actividad citotóxica frente a células tumorales (143), (22), (142). Aunque la toxicidad de la fracción acuosa han sido previamente estudiada (265) su actividad inmunomoduladora aún no ha sido evaluada.

Por varios años ha sido propuesto que la actividad antitumoral e inmuno estimuladora de *P. alliacea* se debe a la presencia del metabolito secundario DTS (143); sin embargo, es interesante notar que aunque la fracción orgánica, parcialmente caracterizada por nuestro grupo (266) contiene DTS, no se detectó actividad alguna sobre las CD, sugiriendo que otros metabolitos presentes en la FA son los responsables de esta actividad. Adicional a su actividad antitumoral, el DTS posee actividad anti inflamatoria

que disminuye la respuesta de citocinas pro inflamatorias como la IL1 β , IL6, IL8, IL12p70 y el TNF α durante la reacción mixta leucocitaria (151). Aunque el mecanismo de esta regulación aún no ha sido dilucidado, creemos que este tipo de moléculas podrían tener el mismo efecto inmunomodulador sobre las citocinas secretadas por la CD que fueron tratadas con la FO. Por otro lado, los estudios realizados con flavonoides obtenidos de diferentes plantas han mostrado que muchas de estas moléculas poseen actividad anti-inflamatoria que inhibe la síntesis y la actividad de los diferentes mediadores proinflamatorios como serían los eicosanoides, citocinas, moléculas de adhesión y proteína c reactiva (267). Así mismo, Santangelo en el 2007 mostró que al estimular macrófagos, células Jurkat y CMSP con diferentes flavonoides se disminuye la expresión de citocinas y quimioquinas como la IL1 β , IL6, IL8, TNF α y la proteína quimiotrayente de monocito-1 (MCP-1) (268). Dentro de las actividades de los flavonoides se incluye la inhibición del factor de transcripción NF-kB y de la proteína de activación-1 (AP-1) (269). Un estudio reciente mostró como flavonoides como la Apigenina y el Lutenil reducen la producción de mediadores inflamatorios por inhibición directa de la actividad transcripcional de la proteína del NF-kBp65 inducida bajo la estimulación con TNF α (270). Así mismo otros reportes muestran que la Apigenina atenúa la expresión de moléculas del CMH-I y II, así como de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) en las CD CD11+ derivadas de médula ósea de ratón y disminuye de forma significativa la expresión de IL12, la activación de MAPKs, así como la translocación al núcleo de la subunidad del NF-kBp65 y la inducción de respuesta TH1 genera por la estimulación de las células con LPS (271).

Por otro lado, debido a que la FA afecta la producción de citocinas en la CD humanas, esto podría sugerir que la fracción podría influenciar el micro ambiente celular y modular la respuesta inmune inflamatoria. De manera interesante la secreción de IL1 β por la CD ha sido asociada con la activación del inflamosoma, complejo indispensable para la activación de las células T

CD8 secretoras de INF γ frente a células tumorales (261). Es posible que dicha actividad explique parcialmente el que la *P. alliacea* de forma tradicional sea utilizada como agente antitumoral (169).

Aunque es necesario evaluar *in vivo* la biodisponibilidad de la fracción, los resultados obtenidos con la FO muestran que los metabolitos encontrados en esta fracción no inducen secreción de la IL8, lo cual concuerda con los estudios realizados por Lopes-Martins, en el que se encontró que al tratar ratas con un extracto crudo de la *Petiveria* por vía oral, se disminuye la capacidad migratoria de neutrófilos y eosinófilos en el modelo de Pleuritis inducido por el Carregegan (132).

En general, el extracto crudo de *P. alliacea* es comúnmente usado por su actividad anti inflamatoria (149), actividad que ha sido atribuida a la modulación en la producción de citocinas tipo TH1 como el TNF α , la IL6 y la IL1 β y el incremento de citocinas TH2 como la IL4 (22), (136), (142), (151). Así mismo Del valle en 1993 reportó que, el extracto etanólico por sí solo no induce la proliferación de los linfocitos T *in vitro*, pero si posee actividad sinérgica al combinarse con un estímulo como el de la fitohemaglutinina (PHA) (272). Un estudio pre clínico realizado por Batista en Cuba, demostró el efecto protector de las hojas en polvo de *Petiveria* sobre el efecto inmunosupresor inducido por el agente antitumoral 5- fluorouracil (5-FU). En este estudio se observó que la *P. alliacea* en una dosis de 1200 μ g/mL incrementa la población de linfocitos, neutrófilos y la celularidad de la medula ósea de los ratones Balb/c tratados con el 5-FU (273). En este mismo ensayo se pudo determinar que la *P. alliacea* en pre o post tratamiento combinado con 5-FU, induce un efecto protector en el número de células B productoras de anticuerpos (273).

Nuestros resultados, permiten proponer, que los polisacáridos presentes en la fracción acuosa podrían ser inmunomoduladores negativos de las CD, ya

que producen una activación parcial de la célula que podría estar asociado con el estadio de CD "semi-maduras", descritas en la literatura como CD que expresan moléculas coestimuladoras y no secretan citocinas (2), (7); Dicha situación es similar a las CD obtenidas en nuestro estudio que no poseen todas las señales necesarias para la inducción de la respuesta inflamatoria mediada por células T (5), (36), (274),(5,275). Por lo tanto creemos que este tipo de estímulo podría generar CD tolerogénicas que como se ha descrito, median la generación de células T reguladoras (105), (170), (172). Sin embargo es necesario continuar con estudios funcionales que nos permitan establecer el tipo de CD generada.

A pesar de todos estos ensayos realizados sobre modelos murinos, aún no se ha determinado el blanco celular de las fracciones o de mediadores producidos. Este es el primer estudio en donde se evalúa de forma diferencial la actividad inmunomoduladora de diferentes fracciones de la *P. alliacea* sobre células del sistema inmune y provee información relevante para el entendimiento de cómo la planta puede ser usada tradicionalmente como agente antitumoral, como fue observado en nuestros previos trabajos (22), (142) o anti inflamatorio; con dos actividades parcialmente contrarias. Actualmente, estamos caracterizando los metabolitos presentes en la FA enfocando nuestro interés en el estudio de metabolitos primarios como los polisacáridos.

9. Perspectivas

La actividad Inmunomoduladora del Galactomanano observada en el presente trabajo, sugiere que *in vivo* podría tener un papel activador de la respuesta inmune a través de la activación de las células dendríticas. Es importante evaluar dicha actividad *in vivo* utilizando modelos murinos en los cuales se estudie la actividad del polisacárido solo o en presencia de drogas antitumorales con actividad citotóxica. Nuestro laboratorio cuenta actualmente con el modelo de cáncer mamario murino Balb/c transplantados con células 4T1, y sobre este modelo podemos determinar si la presencia del polisacárido produce una mayor activación de la respuesta inmune y si la respuesta inducida es protectora.

En relación a la actividad de los polisacáridos de *Petiveria alliacea*, actualmente se inició un proyecto en el que se aislarán los metabolitos primarios de la planta, en condiciones estériles con el fin de caracterizar los polisacáridos, así como su actividad sobre células mononucleares humanas. Esta valoración nos permitirá avanzar en el conocimiento de la actividad de la planta, que aunque ha sido ampliamente estudiada, las moléculas específicas responsables de su actividad biológica no han sido claramente identificadas aún.

10. Bibliografía.

1. **Suciu-Foca N, Berloco P, Cortesini R.** Tolerogenic Dendritic Cells in Cancer, Transplantation, and Autoimmune Diseases. *Hum Immunol* 70, 277-280, (2009).
2. **Lutz M, Kurts C.** Induction of Peripheral Cd4+ T-Cell Tolerance and Cd8+ T-Cell Cross-Tolerance by Dendritic Cells. *Eur J Immunol.* 39, 2325-2330, (2009).
3. **Steinman R.** Dendritic Cells: Understanding Immunogenicity. *Euro J immunology* 37, 553-560, (2007).
4. **Palucka A, Ueno H, Fay J, Banchereau J.** Taming Cancer by Inducing Immunity Via Dendritic Cells. *Immunology Rev* 220, 129-150, (2007).
5. **Blanco P, Palucka A, Pascuald V, Banchereaud J.** Dendritic Cells and Cytokines in Human Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 19, 41-52, (2008).
6. **Wilson N, El-Sukkari D, Belz G, Smith C, Steptoe R, Heath W, Shortman K, Villadangos J.** Most Lymphoid Organ Dendritic Cell Types Are Phenotypically and Functionally Immature. *Blood* 102, 2187-2194, (2003).
7. **Lutz M, Schuler G.** Immature, Semi-Mature and Fully Mature Dendritic Cells: Which Signals Induce Tolerance or Immunity? *Trends Immunol* 23, 445-449, (2002).
8. **Wilson N, Villadangos J.** Lymphoid Organ Dendritic Cells: Beyond the Langerhans Cells Paradigm. *Immunol. Cell Biol* 82, 91-98, (2004).
9. **Steinman R, Melissa P.** Exploiting Dendritic Cells to Improve Vaccine Efficacy. *J. Clin. Invest.* 109, 1519-1526, (2002).
10. **Nestle F, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadenfort D.** Vaccination of Melanoma Patients with Peptide or Tumor Lysate- Pulsed Dendritic Cells. *Nature Medicine* 4, 328-332, (1998).
11. **Thurner B, Haendle L, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A.** Vaccination with Mage-3a1 Peptide-Pulsed Mature, Monocyte Derived Dendritic Cells Expands Specific Cytotoxic T Cells and Induces Regression of Some Metastases in Advance Stage Iv Melanoma. *J Exp Med* 190, 1669-1678, (1999).
12. **Brinke A, Schijndel G, Visser R, Gruijl T, Zwaginga J, van Ham M.** Monophosphoryl Lipid a Plus Ifn Maturation of Dendritic Cells Induces Antigen-Specific Cd8+ Cytotoxic T Cells with High Cytolytic Potential. *Cancer Immunol Immunother* 59, 1185-1195, (2010).
13. **Dubensky T Jr, Reed S.** Adjuvants for Cancer Vaccines. *Semin Immunol* 22, 155-161, (2010).
14. **Tritto E, Mosca F, De G.** Mechanism of Action of Licensed Vaccine Adjuvants. *Vaccine* 27, 3331-3334, (2009).

15. **Tzianabos A.** Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biological Function. *Clin Microbiol Rev* 13, 523-533, (2000).
16. **Schepetkin I, Mark T. Quinn A.** Botanical Polysaccharides: Macrophage Immunomodulation and Therapeutic Potential. *International Immunopharmacology* 2006, 317-333, (2006).
17. **Shurin M, Shurin G, Lokshin A, Yurkovetsky R, Gutkin D, Chatta G, Zhong H, Han B, Ferris R.** Intratumoral Cytokines/Chemokines/Growth Factors and Tumor Infiltrating Dendritic Cells: Friends or Enemies? *Cancer Metastasis Rev* 25, 333-356, (2006).
18. **Willment J, Brown G.** C-Type Lectin Receptors in Antifungal Immunity. *TRENDS in microbiology* 16, 27-32, (2007).
19. **Kato M, Khan S, d'Aniello E, Mc Donald K, Hart D.** The Novel Endocytic and Phagocytic C-Type Lectin Receptor Dcl-1/Cd302 on Macrophages Is Colocalized with F-Actin, Suggesting a Role in Cell Adhesion and Migration. *The Journal of Immunology*, 6052-6063, (2007).
20. **Geijtenbeek T, Krooshoop D, Bleijs D, Van Vliet S, Van D, Grabovsky V, Alon R, Figdor C, Van Kooyk Y.** Dc-Sign-Icam-2 Interaction Mediates Dendritic Cell Trafficking. *Nature immunology* 14, 353-357, (2000).
21. **Geijtenbeek T, Gringhuis S.** Signalling through C-Type Lectin Receptors: Shaping Immune Responses. *Natu Rev Immunol* 9, 465-479, (2009).
22. **Urueña C, Cifuentes C, Castañeda D, Arango A, Kaur P, Asea A, Fiorentino S.** Petiveria Alliacea Extracts Uses Multiple Mechanisms to Inhibit Growth of Human and Mouse Tumoral Cells. *BMC Complement Altern Med* 8, 60, (2008).
23. **Morris H, Martínez C, Abdala R, Campos D.** Adyuvantes Inmunológicos. *Rev Cubana Investig Bioméd* 18, 130-137, (1999).
24. **Mohammad F, Hossein M, Shirin G, Ghorban A.** Immunomodulating and Anticancer Agents in the Realm of Macromycetes Fungi (Macrofungi). *Inter Immunophar* 7, 701-724, (2007).
25. **Chihara G.** Recent Progress in Immunopharmacology and Therapeutic Effects of Polysaccharides. *Dev Biol Stand* 77, 191-197, (1992).
26. **Wang S, Hsu M, Hsu H, Tzeng C, Lee S, Shiao M, .** The Antitumor Effect of Ganoderma Lucidum Is Mediated by Cytokines Released from Activated Macrophages and T Lymphocytes. *Int J Cancer* 70, 699-705, (1997).
27. **Ross G, Cain J, Myones B, Newman S, Lachmann P.** Specificity of Membrane Complement Receptor Type Three (Cr3) for Beta-Glucans. *Complement* 4, 61-74, (1987).

28. **Thornton B, Vetvicka V, Pitman M, Goldman R, Ross G.** Analysis of the Sugar Specificity and Molecular Location of the α -Glucan-Binding Lectin Site of Complement Receptor Type 3 (Cd11b/Cd18). *J Immunol* 156, 1235-1246, (1996).
29. **Rice PJ, Kelley JL, Kogan G, Ensley HE, Kalbfleisch JH, Browder IW, Williams DL.** Human Monocyte Scavenger Receptors Are Pattern Recognition Receptors for (1 \rightarrow 3)-Beta-D-Glucans. *J Leukoc Biol* 72, 140-146, (2002).
30. **Brown G, Gordon S.** Immune Recognition. A New Receptor for Beta-Glucans. *Nature* 413, 36-37, (2001).
31. **Kankkunen P, Teirilä L, Rintahaka J, Alenius H, Wolff H, Matikainen S.** (1,3)-Beta-Glucans Activate Both Dectin-1 and Nlrp3 Inflammasome in Human Macrophages. *J Immunol* 184, 6335-6342, (2010).
32. **Poock H, Ruland J.** Syk Kinase Signaling and the Nlrp3 Inflammasome in Antifungal Immunity. *J Mol Med* 88, 745-752, (2010).
33. **Cao L, Lin Z.** Regulation on Maturation and Function of Dendritic Cells by Ganoderma Lucidum Polysaccharides. *immunology letters* 1, 163-169, (2002).
34. **Cao L, Lin Z.** Regulatory Effect of Ganoderma Lucidum Polysaccharides on Cytotoxic T-Lymphocytes Induced by Dendritic Cells in Vitro. *Acta Pharmacol Sin* 24, 231-326, (2003).
35. **Shao B, Dai H, Xu W, Lin Z, Gao X.** Immune Receptors for Polysaccharides from Ganoderma Lucidum. *Biochem Biophys Res Commun.* 323, 133-141, (2004).
36. **Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K.** Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811, (2000).
37. **Liu Y.** Dendritic Cell Subsets and Lineages, and Their Functions in Innate and Adaptive Immunity. *Cell* 106, 259-262, (2001).
38. **Tacke P, de Vries I, Torensma R & Figdor C.** Dendritic-Cell Immunotherapy: From Ex Vivo Loading to in Vivo Targeting. *Nat Rev Immunol.* 7, 790-802, (2007).
39. **Takx B.** Immunomodulators. Future Prospects. *Pharmacology Weebi Sci* 14, 24-52, (1992).
40. **Elaine T, Flaviana M, Ennio De G.** Mechanism of Action of Licensed Vaccine Adjuvants. *vaccine* 27, 3331-3334, (2009).
41. **Brewer J.** How Do Aluminium Adjuvants Work? . *Immunol Lett* 102, 10-15, (2006).
42. **Didierlaurent A, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H.** As₀₄, an Aluminum Salt- and Tlr4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity. *J Immunol* 183, 186-197, (2009).
43. **Lindblad E.** Aluminium Compounds for Use in Vaccines. *Immunol. Cell Biol* 82, 497-505, (2004).

44. **Stephanie C, Oscar R, O'Connor W , Sutterwala F, Flavell R.** Crucial Role for the Nalp3 Inflammasome in the Immunostimulatory Properties of Aluminium Adjuvants. *Nature letters* 453, 1122-1126, (2008).
45. **Philippa M, Amy S, Michael W, Munks.** Towards an Understanding of the Adjuvant Action of Aluminium. *Nature Reviews immunology* 9, 287-293, (2009).
46. **Baldrige J, McGowan P, Evans JT, Cluff C, Mossman S, Johnson D, Persing D.** Taking a Toll on Human Disease: Toll-Like Receptor 4 Agonists as Vaccine Adjuvants and Monotherapeutic Agents. . *Expert Opin Biol Ther* 4, 1129-1138, (2004).
47. **O'Hagan D, De G.** The Path to a Successful Vaccine Adjuvant—'the Long and Winding Road'. *Drug Discov Today* 14, 541-551, (2009).
48. **Small E, Schellhammer P, Higano C, Redfern C, Nemunaitis J, Valone F, Verjee S.** Placebo-Controlled Phase Iii Trial of Immunologic Therapy with Sipuleucel-T (Apc8015) in Patients with Metastatic, Asymptomatic Hormone Refractory Prostate Cancer. *J Clin Oncol* 24, 3089-3094, (2006).
49. **DiLuzio N.** Update on the Immunomodulating Activities of Glucans. *Springer Semin Immunopathol* 8, 387-400, (1985).
50. **Jae L , Myung L , Yeo Y , Youngsoo K , Jong K, Yeong K, Kyungjae K, Seong H, Chong L.** Acemannan Purified from Aloe Ôera Induces Phenotypic and Functional Maturation of Immature Dendritic Cells. *International Immunopharmacology.*, 1275–1284, (2001).
51. **Kahlon J, Kemp M, Yawei N, Carpenter R, Shannon W, McAnalley B.** In Vitro Evaluation of the Synergistic Antiviral Effects of Acemannan in Combination with Azidothymidine and Acyclovir. *Mol Biother* 3, 214-223, (1991).
52. **Womble D, Helderma JH.** Enhancement of Allo-Responsiveness of Human Lymphocytes by Acemannan (Carrisyn). *int immunopharmacology* 10, 967-974, (1988).
53. **Dai Y, Kato M, Takeda K, Kawamoto Y, Akhand AA, Hossain K, Suzuki H, Nakashima I.** T-Cell-Immunity-Based Inhibitory Effects of Orally Administered Herbal Medicine Juzen-Taiho-to on the Growth of Primarily Developed Melanocytic Tumors in Ret-Transgenic Mice. *J Invest Dermatology* 117, 694-701, (2001).
54. **Singh N, Singh SM, Shrivastava P.** Immunomodulatory and Antitumor Actions of Medicinal Plant *Tinospora Cordifolia* Are Mediated through Activation of Tumor-Associated Macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 26, 145-162, (2004).
55. **Ha E, Hwang S, Shin K, Yu K, Lee K, Choi J, Park W, Yoon T.** Anti-Metastatic Activity of Glycoprotein Fractionated from *Acanthopanax Senticosus*, Involvement of Nk-Cell and Macrophage Activation. *Arch Pharm Reserch* 27, 217-224, (2004).
56. **Zhi-Bin Lin.** Cellular and Molecular Mechanisms of Immuno-Modulation by *Ganoderma Lucidum*. *J Pharmacol Sci* 99, 144-153, (2005).

57. **Li M, Lei L, Wang Q, Liang D, Xu Z, Yang S.** Effect of Ganoderma Polysaccharides on Il-1 α and Tumor Necrosis Factor A Mrna Expression in Murine Peritoneal Macrophages. *Chin J Pharmacol Toxicol* 14, 27-29, (2000).
58. **Kim J, Yoon Y, Ahn J, Kang J, Park S, Lee K, Song K, Kim H & S., Han.** Angelan Isolated from Angelica Gigas Nakai Induces Dendritic Cell Maturation through Toll-Like Receptor 4. *International Immunopharmacology* 7, 78-87, (2007).
59. **Yang T, Jia M, Meng J, Wu H, Mei Q,.** Immunomodulatory Activity of Polysaccharide Isolated from Angelica Sinensis. *Int J Biol Macromol* 39, 179-184, (2006).
60. **Steinman R, Zanvil A.** Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice. . *The Journal Experimental Medicine* 137, 1142-1162, (1973).
61. **Sato K, Fujita S.** Dendritic Cells: Nature and Classification. *Allergology International*. 56, 183-191, (2007).
62. **Shortman K, Liu YJ.** Mouse and Human Dendritic Cell Subtypes. *Nature Reviews immunology* 2, 151-161, (2002).
63. **Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C,.** Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Semin Immunol* 17, 313-318, (2005).
64. **Geissmann F.** The Origin of Dendritic Cells. *Nature immunology* 8, 558-560, (2007).
65. **Naik S, Metcalf D, Nieuwenhuijze A, Ian Wicks, Li Wu, Meredith O, Shortman K,.** Intrasplenic Steady-State Dendritic Cell Precursors That Are Distinct from Monocytes. *Nature immunology* 7, 663-671, (2006).
66. **Loems Z, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Derek N, Leenen P, Liu Y, MacPherson G, Randolph G, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn J, Lutz M,.** Nomenclature of Monocytes and Dendritic Cells in Blood. *Blood* 116, 74-80, (2010).
67. **Akira S.** Toll-Like Receptor Signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 38105-38108, (2003).
68. **Theo G.** Sensing and Signalling by the Immune System "Dusting the Sugar Fingerprint: C-Type Lectin Signaling in Adaptive Immunity". *LunterenSymposium*, <http://www.nvvi.nl/Boekje%20voor%20web%202009/Theo%202020Geijtenbeek.p>, (2009).
69. **Iwasaki A, Medzhitov R.** Toll-Like Receptor Control of the Adaptive Immune Responses. *Nat. Immunol* 5, 987-995, (2004).
70. **Akira S, Takeda K, Kaisho T,.** Toll-Like Receptors: Critical Proteins Linking Innate and Acquired Immunity. *Nature immunology* 8, 675-680, (2001).
71. **Takeda K, Akira S.** Toll-Like Receptors in Innate Immunity. *International Immunology* 17, 1-14, (2005).

72. **Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, Williams BR, Major J, Hamilton TA, Fenton MJ, Vogel SN.** Tlr4, but Not Tlr2, Mediates Ifn-Beta-Induced Stat1alpha/Beta-Dependent Gene Expression in Macrophages. *Nature immunology* 3, 392-398, (2002).
73. **Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, Dadgostar H, Dempsey P, Wu T, Rao G, Sun R, Haberland M, Modlin R, Cheng G.** Rf3 Mediates a Tlr3/Tlr4-Specific Antiviral Gene Program. *Immunity* 17, 251-263, (2002).
74. **Ito T, Amakawa R, Kaisho T, Hemmi H, Tajima K, Uehira K, Ozaki Y, Tomizawa H, Akira S, Fukuhara S.** Interferon-Alpha and Interleukin-12 Are Induced Differentially by Toll-Like Receptor 7 Ligands in Human Blood Dendritic Cell Subsets. *Journal Experimental Medicine* 195, 1507-1512, (2002).
75. **Taro K, Shizuo A.** Toll-Like Receptor Downstream Signaling. *Arthritis Research & Therapy* 7, 12-19, (2004).
76. **Kawai T, Akira S.** Tlr Signaling. *Cell Death and Differentiation* 13, 816-825, (2006).
77. **McGreal E, Miller J, Gordon S.** Ligand Recognition by Antigen-Presenting Cell C-Type Lectin Receptors. *Curr Opin Immunology* 17, 18-24, (2005).
78. **Shurin M, Chatta G.** Immunobiology of Dendritic Cells in Cancer. In: Mechanisms of Therapeutic Reversal of Immune Suppression in Cancer. *Gabrilovich and Hurtwiz A.*, 101-130, (2008).
79. **Kerrigan A, Brown G.** C-Type Lectins and Phagocytosis. *Immunology* 214, 562-575, (2009).
80. **Sabatté J, Ceballos A, Raiden S, Vermeulen M, Nahmod K, Maggini J, Salamone G, Salomón H, Amigorena S, Geffner J.** Human Seminal Plasma Abrogates the Capture and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 to Cd4+ T Cells Mediated by Dc-Sign. *Journal Virology* 8, 13723-13734, (2007).
81. **East L, Rushton S, Taylor ME, Isacke CM.** Characterization of Sugar Binding by the Mannose Receptor Family Member Endo180. *Journal Biol Chem* 277, 50469-50475, (2002).
82. **Gazi U, Martinez-Pomares L.** Influence of the Mannose Receptor in Host Immune Responses. *Immunology* 214, 554-561, (2009).
83. **Kanazawa N, Tashiro K & Miyachi Y.** Signaling and Immune Regulatory Role of the Dendritic Cell Immunoreceptor (Dcir) Family Lectins: Dcir, Dcar, Dectin-2 and Bdca-2. *Immunobiology* 209, 179-190, (2004).
84. **McGreal E, Rosas M, Brown G, Zamze S, Wong S, Gordon S, Martinez-Pomares L, Taylor P.** The Carbohydrate-Recognition Domain of Dectin-2 Is a C-Type Lectin with Specificity for High Mannose. *Glycobiology* 16, 422-430, (2006).

85. **Sallusto F, Cella M, Danieli C & Lanzavecchia A.** Dendritic Cells Use Macropinocytosis and the Mannose Receptor to Concentrate Macromolecules in the Major Histocompatibility Complex Class II Compartment: Downregulation by Cytokines and Bacterial Products. *J Exp Med* 182, 389-400, (1995).
86. **Brunner C, Seiderer J, Schlamp A, Bidlingmaier M, Eigler A, Haimerl W, Lehr HA, Krieg AM, Hartmann G, Endres S.** Enhanced Dendritic Cell Maturation by Tnf-Alpha or Cytidine-Phosphate-Guanosine DNA Drives T Cell Activation in Vitro and Therapeutic Anti-Tumor Immune Responses in Vivo. *Journal Immunology* 165, 6278-6286, (2000).
87. **Lee M, Borkowski T, Udey M,.** Regulation of Expression of B7 by Murine Langerhans Cells: A Direct Relationship between B7 mRNA Levels and the Level of Surface Expression of B7 by Langerhans Cells. *J Invest Dermatol.* 101, 883-886, (1993).
88. **Trombetta E, Mellman I.** Cell Biology of Antigen Processing in Vitro and in Vivo. *Annu Rev Immunol.* 23, 975-1028, (2005).
89. **Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC,.** Dendritic Cells Induce Peripheral T Cell Unresponsiveness under Steady State Conditions in Vivo. *J Exp Med.* 194, 769-779, (2001).
90. **West M, Wallin R, Matthews S, Svensson H, Zaru R, Ljunggren H, Prescott A, Watts C,.** Enhanced Dendritic Cell Antigen Capture Via Toll-Like Receptor-Induced Actin Remodeling. *Science* 305, 1153-1157, (2004).
91. **Mellman I, Steinman R.** Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines. *Cell* 106, 255-258, (2001).
92. **Théry C, Amigorena S.** The Cell Biology of Antigen Presentation in Dendritic Cells. *Curr Opin Immunology* 13, 45-51, (2001).
93. **Azukizawa H, Döhler A, Kanazawa N, Nayak A, Lipp M, Malissen B, Autenrieth I, Katayama I, Riemann M, Weih F, Berberich-Siebelt F, Lutz MB,.** Steady State Migratory Relb(+) Langerin(+) Dermal Dendritic Cells Mediate Peripheral Induction of Antigen-Specific Cd4(+) Cd25(+) Foxp3(+) Regulatory T Cells. *Eur journal Immunology* 41, 1420-1434, (2011).
94. **Hanahan D & R, Weinberg.** The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57-70, (2000).
95. **Dunn G, Schreiber D.** The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu. Rev. Immunol* 22, 329-360, (2004).
96. **Lionel A, Locherd C, Ghiringhella F, Kroemerg G & L, Zitvogel.** Harnessing Dendritic Cells in Cancer. *Seminars in Immunology* 23, 42-49, (2011).
97. **Cuenca A, Cheng F, Wang H, Brayer J, Horna P, Gu L, .** Extra-Lymphatic Solid Tumor Growth Is Not Immunologically Ignored and Results in Early Induction of Antigen-Specific Tcell Anergy: Dominant Role of Cross-Tolerance to Tumor Antigens. *Cancer Res* 63, 9007-9015, (2003).

98. **Yu H, Kortylewski M, Pardoll D.** Crosstalk between Cancer and Immune 48 Cells: Role of Stat3 in the Tumor Microenvironment. *Nat Rev Immunol* 7, 41-51, (2007).
99. **Hagemann T, Wilson J, Burke F, Kulbe H & Li NF.** Ovarian Cancer Cells Polarize Macrophages toward a Tumor-Associated Phenotype. *J Immunol* 176, 5023-5032, (2006).
100. **Gabrilovich D, Chen H, Girgis K, Cunningham H, Meny G, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone D.** Production of Vascular Endothelial Growth Factor by Human Tumors Inhibits the Functional Maturation of Dendritic Cells. *Nature Medicine* 2, 1096-1103, (1996).
101. **Gabrilovich D.** Mechanisms and Functional Significance of Tumour-Induced Dendritic-Cell Defects. *Nature Reviews immunology* 4, 941-952, (2004).
102. **Dhodapkar M, Dhodapkar K, Palucka A.** Interactions of Tumor Cells with Dendritic Cells: Balancing Immunity and Tolerance. *Cell Death Differ* 15, 39-50, (2008).
103. **Huang A, Gilmour N, Imami P, Amjadi D, Henderson T & Allen-Mersh.** Increased Serum Transforming Growth Factor- α in Human Colorectal Cancer Correlates with Reduced Circulating Dendritic Cells and Increased Colonic Langerhans Cell Infiltration. *Clin. Exp. Immunol* 134, 270-278, (2003).
104. **Sharma M, Stolina Y, Lin B, Gardner P, Miller M & Kronenberg D.** T Cell-Derived Il-10 Promotes Lung Cancer Growth by Suppressing Both T Cell and Apc Function. *J. Immunol* 163, 5020-5028, (1999).
105. **Bellone G, Carbone A, Smirne C, Scirelli T, Buffolino A, Novarino A, Stacchini A, Bertetto O, & Palestro G, Sorio C, Scarpa A, Emanuelli G, Rodeck U.** Cooperative Induction of a Tolerogenic Dendritic Cell Phenotype by Cytokines Secreted by Pancreatic Carcinoma Cells. *J Immunol* 1, 3448-3460, (2006).
106. **Zou W, Chen L.** Inhibitory B7-Family Molecules in the Tumour Microenvironment. *Nat Rev Immunol* 8, 467-477, (2008).
107. **Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L & K, Shain.** Regulation of the Innate and Adaptive Immune Responses by Stat-3 Signaling in Tumor Cells. *Nat Med* 10, 48-54, (2004).
108. **García-Barriga E.** Flora Medicinal De Colombia Botánica Médica. *Imprenta nacional ed Bogotá*, (1974).
109. **Blasquez M, Zafra-polo M, Villar A.** Efecto Antibacteriano in Vitro Del Extracto Acuoso De Vainas De Caesalpinia Spinosa (Tara) En Cepas De Sthapylococcus Aureus Y Streptococcus Pyogenes. *Tesis Pregrado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.*, (1980).
110. **Aldave A, Mostacero J.** Efecto Antibacteriano in Vitro Del Extracto Acuoso De Vainas De Caesalpinia Spinosa (Tara) En Cepas De Sthapylococcus Aureus Y Streptococcus Pyogenes. *Tesis Pregrado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann*, (1988).

111. **Sung I.** Efecto Antibacteriano in Vitro Del Extracto Acuoso De Vainas De Caesalpinia Spinosa (Tara) En Cepas De Sthapylococcus Aureus Y Streptococcus Pyogenes. *Tesis Pregrado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.*, (2000).
112. **Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B, Vikova E & Kokoska L.** Antibacterial Screening of Some Peruvian Medicinal Plants Used in Callería District. *Journal of ethnopharmacology* 99, 309-312, (2005).
113. **Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Kilburn J, Rakariyatham N,** . Antimicrobial Gallic Acid from Caesalpinia Mimosoides Lamk. *Food Chemistry.* 100, 1044-1048, (2007).
114. **Nakamura S, Kurosaky F, Arisawa M, Mukainaka T, Takayasu J, Okuda M, Tokuda H, Nishino H & Pastore F.** Cancer Chemopreventive Effects of a Brazilian Folk Medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 135-137, (2002).
115. **Gandhi N, Nair C.** Protection of DNA and Membrane from Gamma Radiation Induced Damage by Gallic Acid. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 278, 111-117, (2005).
116. **Fiuza S, Gomes C, Teixeira L, Girao da Cruz M, Cordeiro M, Milhazes N, Borges F, Marques M,**. Phenolic Acid Derivates with Potencial Anticancer Properties-a Structure- Activity Relationship Study. Part 1: Methyl, Propyl and Octyl Esters of Caffeic and Gallic Acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12, 3581-3589, (2004).
117. **Locatelli C, Rosso R, Santos-Silva M, de Souza C, Licínio M, Leal P, Bazzo M, Yunes R & Creczynsky-Pasa T.** Ester Derivates of Gallic Acid with Potencial Toxicity toward L1210 Leukemia Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, 3791-3799, (2008).
118. **Primo de la Cruz L.** Aprovechamiento Integral Y Racional De La Tara Caessalpinia Spinosa - Caesalpinia Tinctoria. *Revista instituto de investigación FIGMMG* 7, 64-73, (2004).
119. **Srivastava M & Kapoor VP.** Seed Galactomannans: An Overview. *Chem Biodivers* 2, 295-317, (2005).
120. **Tevashova A, Olsuf'eva E, Preobrazhenskaia M, Klesov A, Zomer E, Platt D,**. New Conjugates of Antitumor Antibiotic Doxorubicin with Water-Soluble Galactomannan: Synthesis and Biological Activity. *Bioorg Khim* 33, 148-155, (2007).
121. **Tizard IR, Carpenter RH, McAnalley BH, Kemp MC,**. The Biological Activities of Mannans and Related Complex Carbohydrates. *Mol Biother* 1, 290-296, (1989).
122. **Persat F, Noirey, N., Diana, J., Gariazzo, M. J., Schmitt, D., Picot, S. & Vincent, C.** Binding of Live Conidia of Aspergillus Fumigatus Activates in Vitro-Generated Human Langerhans Cells Via a Lectin of Galactomannan Specificity. *Clin Exp Immunol* 133, 370-377, (2003).

123. **Serrano D, Dominguez-Soto A, Ancochea J, Jimenez J, Leal J, Corbi A.** Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule 3-Grabbing Nonintegrin Mediates Binding and Internalization of *Aspergillus Fumigatus* Conidia by Dendritic Cells and Macrophages. *J Immunol* 173, 5635-5643, (2004).
124. **Garlanda C, Hirsch E, S., Bozza, A., Salustri, De Acetis M, Nota R, A, Maccagno, Riva F, Bottazzi B, Peri G, Doni A, Vago L, Botto M, De Santis R, Carminati P, Siracusa G, Altruda F, Vecchi A, Romani L & Mantovani A.** Non-Redundant Role of the Long Pentraxin Ptx3 in Anti-Fungal Innate Immune Response. *Nature* 420, 182-186, (2002).
125. **Noieto G, Merce A, Iacomini M, Gorin P, Soccol V & Oliveira M.** Effects of a Lichen Galactomannan and Its Vanadyl (Iv) Complex on Peritoneal Macrophages and Leishmanicidal Activity. *Mol Cell Biochem* 233, 73-83, (2002).
126. **Duncan C, Pugh N, Pasco D, Ross S.** Isolation of a Galactomannan That Enhances Macrophage Activation from the Edible Fungus *Morchella Esculenta*. *J Agric Food Chem.* 25, 5683-5685, (2002).
127. **Ono L, Wollinger W, Rocco I, Coimbra T, Gorin P, Sierakowski M.** In Vitro and in Vivo Antiviral Properties of Sulfated Galactomannans against Yellow Fever Virus (Beh111 Strain) and Dengue 1 Virus (Hawaii Strain). *Antiviral Res* 60, 201-208, (2003).
128. **Holdridge L, Grenke W, Hatheway W, Liang T, and Tosi J.** Forest Environments in the Tropical Life Zone. *Pergamon Press, Oxford* (1971).
129. **Montes G.** *Medicina Popular En Colombia*, (1981).
130. **Correa J, Bernal H.** Especies Vegetales Promisorias De Los Países Del Convenio Andres Bello. *Tomo XI. Secretaria educativa del convenio Andres Bello. CECAP. Bogotá, Colombia*, 621, (1998).
131. **Gupta M.** *270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Convenio Andrés Bello.*, Vol. 1era edición (1995).
132. **Lopes-Martins R, Pegoraro D, Woisky R, Penna S, Sertié J.** The Anti-Inflammatory and Analgesic Effects of a Crude Extract of *Petiveria Alliacea* L.(Phytolaccaceae). *Phytomedicine* 9, 245-248, (2002).
133. **Camargo M.** Contribuição Etnofarmacobotânica Ao Estudo De *Petiveria Alliacea* L.–Phytolacaceae– (“Amansa-Senhor”) E a Atividade Hipoglicemiante Relacionada a Transtornos Mentais. *Dominguezia* 23, 21-25, (2007).
134. **Chirinos D.** *El Milagro De Los Vegetales 200 Casos Curados De Cancer Y Leucemia.* Vol. 2, (1988).
135. **Rossi V.** Antiproliferative Effects of *Petiveria Alliacea* on Several Tumor Cell Lines. *Pharmacol Res Suppl* 22, 434, (1990).
136. **Rossi V, Marini S, Jovicevic L, D'Atri S, Turri M, Giardina B.** Effects of *Petiveria Alliacea* L. On Cell Immunity. *Pharmacol Res Suppl* 1, 111-112, (1993).

137. **Malpezzi E, Davino S, Costa L, Freitas J, Giesbrecht A, Roque N.** Antimitotic Action of Extracts of *Petiveria Alliacea* on Sea Urchin Egg Development. *Braz J Med Biol Res* 27, 749-754, (1994).
138. **Ximenes S, Barros J, Santos E, Junior A, Sousa Filho S, Silveira A, Higino J, Monteiro de Melo A.** Dterminacao Da CI50 E Ensaio Toxicologico Agudo Do Extracto Bruto Seco Das Folhas De *Petiveria Alliacea* Linné (*Phytolaccaceae*) En Raton. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, (2008).
139. **García M, Morales T, Ocampo R , Pazos L.** Subchronic and Acute Preclinic Toxicity and Some Pharmacological Effects of the Water Extract from Leaves of *Petiveria Alliacea* (*Phytolaccaceae*). *Int. J. Trop. Biol* 54, 1323-1326, (2006).
140. **Del Carmen R.** Actividad Anti-Inflamatoria Y Analgésica De *Petiveria Alliacea*. *Farmacopea Caribeña*, 247, (1988).
141. **Cáceres A, Fletes L, Aguilar L.** Plants Used in Guatemala for the Treatment of Gastrointestinal Disorders. Confirmation of Activity against Enterobacteria of 16 Plants. *J. Ethopharmacol* 28, 31-38, (1993).
142. **Cifuentes C, Castañeda D, Urueña C, Fiorentino S.** A Fraction from *Petiveria Alliacea* Induces Apoptosis Via a Mitochondria- Dependent Pathway and Regulates Hsp70 Expression. *Universitas Scientiarum* 14, 2-3, (2009).
143. **Rosner H, Williams LAD, Jung A, Kraus W.** Disassembly of Microtubules and Inhibition of Neurite Outgrowth, Neuroblastoma Cell Proliferation, and Map Kinase Tyrosine Dephosphorylation by Dibenzyl Trisulphide. *Biochim Biophys Acta* 1540, 166-177, (2001).
144. **Williams L, Rösner H, Moller W, Conrad J, Nkurunziza J, Kraus W.** In Vitro Anti-Proliferation/Cytotoxic Activity of Sixty Natural Products on the Human Sh-Sy5y Neuroblastoma Cells with Specific Reference to Dibenzyl Trisulphide. *West Indian Med J* 534, 208, (2004).
145. **Williams L, Rösner H, Moller W, Kraus W.** Anti-Proliferation Cytotoxic Action of Dibenzyl Trisulphide, a Secondary Metabolite of *Petiveria Alliacea*. *J. Sci. Technol* 15, 54-60, (2004).
146. **Delavueau P, Lallouette P, Tessier A.** Stimulation of the Phagocytic Activity of Reticuloendothelial System by Plant Drugs. *Planta Med* 40, 49-54, (1980).
147. **Quadros M, Souza Brito A, Queroz M.** *Petiveria Alliacea* L Extract Protects Mice against *Listeria Monocytogenes* Infection- Effects on Bone Marrow Progenitor Cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 21, 109-124, (1999).
148. **Queiroz M, Quadros M, Santos L.** Cytokine Profile and Natural Killer Cell Activity in *Listeria Monocytogenes* Infected Mice Treated Orally with *Petiveria Alliacea* Extract. *IMMUNOPHARMACOLOGY AND IMMUNOTOXICOLOGY* 22, 501-518, (2000).

149. **Germano D, Caldeira T, Mazella A, Bachi E, Sertié J.** Topical Anti-Inflammatory Activity and Toxicity of *Petiveria Alliacea*. *Fitoterapia*, 459-462, (1993).
150. **Awad A, Chen Y, Fink C, Hennessy T.** Beta-Sitosterol Inhibits Ht-29 Human Colon Cancer Cell Growth and Alters Membrane Lipids. *Anticancer Res* 16, 2797-2804, (1996).
151. **Williams L, Rosner H, Conrad J, Moller W, Beifuss U, Chiba K, .** Selected Secondary Metabolites from Phytolaccaceae and Their Biological/Pharmaceutical Significance. *Recent Res Devel in Phytochem* 6, 13-68, (2002).
152. **Roncero M.** Obtención De Una Secuencia "Tcf" Con La Aplicación De Ozono Y Enzimas, Para El Blanqueo De Pastas Madereras Y De Origen Agrícola. Optimización De La Etapa Z. Análisis De Los Efectos En La Fibra Celulósica Y Sus Componentes. *Universidad Politécnica de Cataluña*, (2001).
153. **Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F, .** Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356, (1956).
154. **Masahiro A, Yasunori F, Mami I, Kazuya N, Makiko S, Yasuko F, Noboru T, Yoshimitsu Y & O., Syuichi.** Glycoprotein Derived from the Hot Water Extract of Mint Plant, *Perilla frutescens* Britton. *J. Agric. Food Chem* 47, 468-472, (1999).
155. **Kenneth J & Livak Schmittgen.** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative Pcr and the 22ddct Method. *Methods* 25, 402- 408, (2001).
156. **Lemus M , García M, Batista A, Guardia O, Castillo A.** La Tableta De Anamú: Un Medicamento Herbario Inmunoestimulante. *Medisan* 8, 57-64, (2004).
157. www.RaintreeNutrition.com.
158. **FAO**, Food and Nutrition Papers, (1998).
159. **Mizuno T, Yeohlui P, Kinoshita T, Zhuang C, Ito H, Mayuzumi Y, .** Antitumor Activity and Chemical Modification of Polysaccharides from Niohshimeiji Mushroom, *Tricholoma Giganteum*. *Bios Biotech Biochem* 60, 30-33, (1996).
160. **Mizuno T, Zhuang C.** *Grifola Frondosa*: Pharmacological Effects. . *Food Res Interna* 11, 135-149, (1995).
161. **Mueller A, Raptis J, Rice P, Kalbfleisch J, Stout R, Ensley H, Browder W & Williams D.** The Influence of Glucan Polymer Structure and Solution Conformation on Binding to (1-->3)-Beta-D-Glucan Receptors in a Human Monocyte-Like Cell Line. *Glycobiology* 10, 339-346, (2000).
162. **Zhang M, Cul SW, Cheung PC, Wang Q, .** Antitumor Polysaccharides from Mushrooms: A Review on Their Isolation Process, Structural Characteristics and Antitumor Activity. *Trends in Food Science & Technology* 18, 4-19, (2007).

163. **Lombard Y.** A New Method for Studying the Binding and Ingestion of Zymosan Particles by Macrophages. *Journal of Immunological Methods* 174, 155-163, (1994).
164. **Muller K, Wirth M.** Real-Time Rt-Pcr Detection of Retroviral Contaminations of Cells and Cell Lines. *Cytotechnology* 38, 147-153, (2002).
165. **Yoshimura S, Bondeson J, Foxwell BM, Brennan FM, Feldmann M.** Effective Antigen Presentation by Dendritic Cells Is Nf-Kappab Dependent: Coordinate Regulation of Mhc, Co-Stimulatory Molecules and Cytokines. *Int Immunol* 13, 675–683, (2001).
166. **Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA.** The Il-12 Family of Heterodimeric Cytokines: New Players in the Regulation of T Cell Responses. *Immunity* 19, 641-644, (2003).
167. **Yu-Li Lin, Shiu-Sheng Lee, Shin-Miao Hou, Bor-Luen Chiang.** Polysaccharide Purified from Ganoderma Lucidum Induces Gene Expression Changes in Human Dendritic Cells and Promotes T Helper 1 Immune Response in Balb/C Mice. *Molecular Pharmacology* 70, 637-644, (2006).
168. **Kalergis A, Iruetagoiena M, Barrientos M, González P, Herrada A, Leiva E, Gutiérrez M, Riedel C, Bueno S, Jacobelli S.** Modulation of Nuclear Factor-Kappab Activity Can Influence the Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus. *immunology* 128, 306-314, (2009).
169. **Williams L, Rosner H, Levy H, Barton EN.** A Critical Review of the Therapeutic Potential of Dibenzyl Trisulphide Isolated from Petiveria Alliacea L (Guinea Hen Weed, Anamu). *West Indian Med J* 56, 17-21, (2007).
170. **Adler H, Steinbrink K.** Tolerogenic Dendritic Cells in Health and Disease: Friend and Foe!. *Eur J Dermatol* 17, 476-491, (2007).
171. **Pulendran B, Tang H, Manicassamy S.** Programming Dendritic Cells to Induce T(H)2 and Tolerogenic Responses. *Nat Immunol* 11, 647-655, (2010).
172. **Maldonado R, Von Andrian U.** How Tolerogenic Dendritic Cells Induce Regulatory T Cells. *Adv Immunol* 108, 111-165, (2010).
173. **Tan JK & O'Neill HC.** Maturation Requirements for Dendritic Cells in T Cell Stimulation Leading to Tolerance Versus Immunity. *J Leukoc Biol.* 78, 319-324, (2005).
174. **Auffermann-Gretzinger S, Keeffe EB, Levy S.** Impaired Dendritic Cell Maturation in Patients with Chronic, but Not Resolved, Hepatitis C Virus Infection. *Blood* 97, 3171–3176, (2001).
175. **Bennett C, Misslitz A, Colledge L, Aebischer T, Blackburn CC.** Silent Infection of Bone Marrow-Derived Dendritic Cells by Leishmania Mexicana Amastigotes. *Eur J Immunol* 31, 876-883, (2001).
176. **Santander S, Cuéllar A, Thomas Mdel C, Guzmán F, Gómez A, López M, Puerta C.** Expression of Markers on Dendritic Cells from Chronic Chagasic Patients Stimulated with the Kmp-11 Protein and the K1 Peptide from Trypanosoma Cruzi. *Biomedica* 27, 18-27, (2007).

177. **Cuellar A, Santander S, Thomas Mdel C, Guzmán F, Gómez A, López M, Puerta C.** Monocyte-Derived Dendritic Cells from Chagasic Patients Vs Healthy Donors Secrete Differential Levels of Il-10 and Il-12 When Stimulated with a Protein Fragment of Trypanosoma Cruzi Heat-Shock Protein-70. *Immunol cell Biol* 86, 255-260, (2008).
178. **Palucka A, Ueno H, Fay J, Banchereau J.** Dendritic Cells and Immunity against Cancer. *J Intern Med* 269, 64-73, (2011).
179. **Rabinovich G, Gabrilovich D, Sotomayor E.** Immunosuppressive Strategies That Are Mediated by Tumor Cells. *Annu Rev Immunol.* 25, 267-296., (2007).
180. **Kaisho T, Akira S.** Regulation of Dendritic Cell Function through Toll-Like Receptors. *Curr Mol Med* 3, 373-385, (2003).
181. **Chen J, He Q, Zhang R, Chu Y, Wang Y, Liu Q, Xiong S.** Allogenic Donor Splenocytes Pretreated with Antisense Peptide against B7 Prolong Cardiac Allograft Survival. *Clin Exp Immunol* 138, 245-250, (2004).
182. **Borriello F, Sethna MP, Boyd SD, Schweitzer AN, Tivol EA, Jacoby D, Strom TB, Simpson EM, Freeman GJ, Sharpe AH.** B7-1 and B7-2 Have Overlapping, Critical Roles in Immunoglobulin Class Switching and Germinal Center Formation. *Immunity* 6, 303-313, (1997).
183. **Schweitzer A, Sharpe A.** Studies Using Antigen-Presenting Cells Lacking Expression of Both B7-1 (Cd80) and B7-2 (Cd86) Show Distinct Requirements for B7 Molecules During Priming Versus Restimulation of Th2 but Not Th1 Cytokine Production. *J immunology* 161, 2762-2771, (1998).
184. **Sharpe A, Freeman G.** The B7-Cd28 Superfamily. *Nature Rev immunol* 2, 116-126, (2002).
185. **Schwartz R.** A Cell Culture Model for T Lymphocyte Clonal Anergy. *Science* 248, 1349-1356, (1990).
186. **Tanaka J, Asaka M, Imamura M.** T-Cell Co-Signalling Molecules in Graft-Versus-Host Disease. *Ann Hematology* 79, 283-290, (2000).
187. **Jonker M, Ossevoort And MA, Vierboom M.** Blocking the Cd80 and Cd86 Costimulation Molecules: Lessons to Be Learned from Animal Models. *Transplantation* 73, 23-26, (2002).
188. **Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, Flavell RA.** Icos Co-Stimulatory Receptor Is Essential for T-Cell Activation and Function. *Nature* 4, 97-101, (2001).
189. **Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, Collins M, Honjo T, Freeman GJ, Carreno BM.** Pd-1: Pd-L Inhibitory Pathway Affects Both Cd4(+) and Cd8(+) T Cells and Is Overcome by Il-2. *Eur journal Immunology* 32, 634-643, (2002).
190. **Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, Koulmanda M, Freeman GJ, Sayegh MH, Sharpe AH.** Tissue Expression of Pd-L1 Mediates Peripheral T Cell Tolerance. *journal Experimental Medicine* 203, 883-895, (2006).

191. **Suh W, Gajewska B, Okada H, Gronski M, Bertram E, Dawicki W, Duncan G, Bukczynski J, Plyte S, Elia A, Wakeham A, Itie A, Chung S, Da Costa J, Arya S, Horan T, Campbell P, Gaida K, Ohashi P, Watts T, Yoshinaga S, Bray M, Jordana M, Mak T.** The B7 Family Member B7-H3 Preferentially Down-Regulates T Helper Type 1-Mediated Immune Responses. *Nature immunology* 4, 899-906, (2003).
192. **Puré E, Inaba K, Crowley MT, Tardelli L, Witmer-Pack MD, Ruberti G, Fathman G, Steinman RM.** Antigen Processing by Epidermal Langerhans Cells Correlates with the Level of Biosynthesis of Major Histocompatibility Complex Class II Molecules and Expression of Invariant Chain. *J Exp Med* 172, 1459-1469, (1990).
193. **Wilson N, El-Sukkari D, Villadangos J.** Dendritic Cells Constitutively Present Self Antigens in Their Immature State in Vivo and Regulate Antigen Presentation by Controlling the Rates of Mhc Class II Synthesis and Endocytosis. *Blood* 103, 2187-2195, (2004).
194. **Villadangos J, Cardoso M, Steptoe R, van Berkel D, Pooley J, Carbone F, Shortman K.** Mhc Class II Expression Is Regulated in Dendritic Cells Independently of Invariant Chain Degradation. *Immunity* 14, 739-749, (2001).
195. **Kropshofer H, Hämmerling GJ, Vogt AB.** How Hla-Dm Edits the Mhc Class II Peptide Repertoire: Survival of the Fittest? *Immunology Today* 18, 77-82, (1997).
196. **Villadangos J, Schnorrer P, Wilson N.** Control of Mhc Class II Antigen Presentation in Dendritic Cells: A Balance between Creative and Destructive Forces. *immunol Rev* 207, 191-205, (2005).
197. **Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M, Goto E, Aoki M, Mito-Yoshida M, Uematsu M, Hasegawa T, Koseki H, Ohara O, Nakayama M, Toyooka K, Matsuoka K, Hotta H, Yamamoto A, Ishido S.** Novel Regulation of Mhc Class II Function in B Cells. *EMBO J* 26, 846-854, (2007).
198. **Shin J, Ebersold M, Pypaert M, Delamarre L, Hartley A, Mellman I.** Surface Expression of Mhc Class II in Dendritic Cells Is Controlled by Regulated Ubiquitination. *Nature* 444, 115-118, (2006).
199. **Ishido S, Matsuki Y, Goto E, Kajikawa M, Ohmura-Hoshino M.** March-I: A New Regulator of Dendritic Cell Function. *Mol cells* 29, 229-232, (2010).
200. **Ohmura-H, Matsuki Y, Mito-Y, Goto E, Aoki-K, Nakayama M, Ohara O, Ishido S.** Cutting Edge: Requirement of March-I-Mediated Mhc II Ubiquitination for the Maintenance of Conventional Dendritic Cells. *J Immunol* 183, 6893-6897, (2009).
201. **De Gassart A, Camosseto V, Thibodeau J, Ceppi M, Catalan N, Pierre P, Gatti E.** Mhc Class II Stabilization at the Surface of Human Dendritic Cells Is the Result of Maturation-Dependent March I Down-Regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 3491-3496, (2008).

202. **Zhou L, Schwarting R, Smith H, Tedder T.** A Novel Cell-Surface Molecule Expressed by Human Interdigitating Reticulum Cells, Langerhans Cells, and Activated Lymphocytes Is a New Member of the Ig Superfamily. *J Immunol* 149, 735-742, (1992).
203. **Prazma C, Tedder T.** Dendritic Cell Cd83: A Therapeutic Target or Innocent Bystander? *immunology letters* 115, 1-8, (2008).
204. **Cramer S, Trumpfheller C, Mehlhoop U, Moré S, Fleischer B, Von Bonin A.** Activation-Induced Expression of Murine Cd83 on T Cells and Identification of a Specific Cd83 Ligand on Murine B Cells. *Int Immunol* 12, 1347-1351, (2000).
205. **McKinsey T, Chu Z, Tedder T, Ballard D.** Transcription Factor Nf-Kappab Regulates Inducible Cd83 Gene Expression in Activated T Lymphocytes. *Mol Immunol* 37, 733-738, (2000).
206. **Lechmann M, Krooshoop DJ, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor CG, Schuler G, Steinkasserer A.** Lechmann M, Krooshoop Dj, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor Cg, Schuler G, Steinkasserer A. *J Exp Med* 194, 1813-1821, (2001).
207. **Zinser E, Lechmann M, Golka A, Lutz MB, Steinkasserer A.** Prevention and Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Soluble Cd83. *J Exp Med* 200, 345-351, (2004).
208. **Xu J, Huang B, Yin H, Xiong P, Feng W, Xu Y, Fang M, Zheng F, Wang C, Gong F.** A Limited Course of Soluble Cd83 Delays Acute Cellular Rejection of Mhc-Mismatched Mouse Skin Allografts. *transpl int* 20, 266-276, (2007).
209. **Pashine A, Göpfert U, Chen J, Hoffmann E, Dietrich PS, Peng SL.** Failed Efficacy of Soluble Human Cd83-Ig in Allogeneic Mixed Lymphocyte Reactions and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Implications for a Lack of Therapeutic Potential. *Immunol Lett* 115, 9-15, (2008).
210. **Tze LE, Horikawa K, Domasch H, Howard DR, Roots CM, Rigby RJ, Way DA, Ohmura-Hoshino M, Ishido S, Andoniou CE, Degli-Esposti MA, Goodnow CC.** Cd83 Increases Mhc li and Cd86 on Dendritic Cells by Opposing Il-10-Driven March1-Mediated Ubiquitination and Degradation. *J Exp Med* 208, 149-165, (2011).
211. **Adachi Y, Ohno N, Ohsawa M, Oikawa S & Yadomae T.** Macrophage Activation in Vitro by Chemically Cross-Linked (1----3)-Beta-D-Glucans. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 38, 988-992, (1990).
212. **Czop J, Austen K.** Generation of Leukotrienes by Human Monocytes Upon Stimulation of Their Beta-Glucan Receptor During Phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 2751-2755, (1985).
213. **Péter G, Károly V, Imre B, János F & Kaneko Y.** Effects of Lentinan on Cytotoxic Functions of Human Lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 10, 157-163, (1988).

214. **Chai LY, Vonk AG, Kullberg BJ, Verweij PE, Verschueren I, van der Meer JW, Joosten LA, Latgé JP, Netea MG.** Aspergillus Fumigatus Cell Wall Components Differentially Modulate Host Tlr2 and Tlr4 Responses. *Microbes Infect* 13, 151-159, (2011).
215. **Hua K, Hsu H, Chao L, Chen S, Yang W, Hsu J, Wong C.** Ganoderma Lucidum Polysaccharides Enhance Cd14 Endocytosis of Lps and Promote Tlr4 Signal Transduction of Cytokine Expression. *J Cell Physiol* 212, 537-550, (2007).
216. **Shih V, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A.** A Single Nfkb System for Both Canonical and Non-Canonical Signaling. *Cell Res* 21, 86-102, (2011).
217. **Sun S, Ley S.** New Insights into Nf-Kappab Regulation and Function. *Trends Immunol* 29, 469-478, (2008).
218. **Campbell I, Van Nieuwenhuijze A, Segura E, O'Donnell K, Coghill E, Hommel M, Gerondakis S, Villadangos J, Wicks I.** Differentiation of Inflammatory Dendritic Cells Is Mediated by Nf-Kb1-Dependent Gm-Csf Production in Cd4 T Cells. *J Immunol* 186, 5468-5477, (2011).
219. **Zheng Y, Vig M, Lyons J, Van Parijs L, Beg AA.** Combined Deficiency of P50 and Crel in Cd4+ T Cells Reveals an Essential Requirement for Nuclear Factor Kappab in Regulating Mature T Cell Survival and in Vivo Function. *J Exp Med* 197, 861-874, (2003).
220. **Ouaaz F, Arron J, Zheng Y, Choi Y, Beg AA.** Dendritic Cell Development and Survival Require Distinct Nf-Kappab Subunits. *Immunity* 16, 257-270, (2002).
221. **Heath W, Belz G, Behrens G, Smith C, Forehan S, Parish I, & Davey G, Wilson N, Carbone F, Villadangos J.** Cross-Presentation, Dendritic Cell Subsets, and the Generation of Immunity to Cellular Antigens. *Immunol. Rev.* 199, 9-26, (2004).
222. **Lee J, Lee M, Yun Y, Kim Y, Kim J, Kim Y, Kim K, Han S, Lee C.** Acemannan Purified from Aloe Vera Induces Phenotypic and Functional Maturation of Immature Dendritic Cells. *int immunopharmacology* 1, 1275-1284, (2001).
223. **Lin Y, Lee S, Hou S, Chiang B.** Polysaccharide Purified from Ganoderma Lucidum Induces Gene Expression Changes in Human Dendritic Cells and Promotes T Helper 1 Immune Response in Balb/C Mice. *Mol Pharmacol* 702, 637-644, (2006).
224. **Hsieh C, Macatonia S, Tripp C, Wolf S, O'Garra A, Murphys K.** Development of Th1 Cd4+ T Cells through Il-12 Produced by Listeria-Induced Macrophages. *Science* 260, 547-549, (1993).
225. **Kastelein R, Hunter C, Cua D.** Discovery and Biology of Il-23 and Il-27: Related but Functionally Distinct Regulators of Inflammation. *Annu Rev Immunol* 25, 221-242, (2007).
226. **Belkaid Y, Butcher B, Sacks DL.** Analysis of Cytokine Production by Inflammatory Mouse Macrophages at the Single-Cell Level: Selective Impairment of Il-12 Induction in Leishmania-Infected Cells. *Eur J Immunol* 28, 1389-1400, (1998).

227. **Liu J, Cao S, Kim S, Chung EY, Homma Y, Guan X, Jimenez V, Ma X.** Interleukin-12: An Update on Its Immunological Activities, Signaling and Regulation of Gene Expression. *Curr Immunol Rev* 1, 119-137, (2005).
228. **Quinones M, Ahuja SK, Melby PC, Pate L, Reddick RL, Ahuja SS.** Preformed Membrane-Associated Stores of Interleukin (Il)-12 Are a Previously Unrecognized Source of Bioactive Il-12 That Is Mobilized within Minutes of Contact with an Intracellular Parasite. *J Exp Med* 192, 507-516, (2000).
229. **Trinchieri G.** Interleukin-12: A Proinflammatory Cytokine with Immunoregulatory Functions That Bridge Innate Resistance and Antigen-Specific Adaptive Immunity. *Annu Rev Immunol* 13, 251-276, (1995).
230. **Ishii K, Kurita-Taniguchi M, Aoki M, Kimura T, Kashiwazaki Y, Matsumoto M, Seya T.** Gene-Inducing Program of Human Dendritic Cells in Response to Bcg Cell-Wall Skeleton (Cws), Which Reflects Adjuvancy Required for Tumor Immunotherapy. *immunology letters* 98, 280-290, (2005).
231. **Trinchieri G.** Interleukin-12 and the Regulation of Innate Resistance and Adaptive Immunity. *Nat Rev Immunol.* 3, 133-146, (2003).
232. **Park W, Park C, Tomura M, Ahn H, Nakahira Y, Iwasaki M, Gao P, Abe R, Hamaoka T, Fujiwara H.** Cd28 Costimulation Is Required Not Only to Induce Il-12 Receptor but Also to Render Janus Kinases/Stat4 Responsive to Il-12 Stimulation in Tcr-Triggered T Cells. *Eur J Immunol* 31, 1456-1464, (2001).
233. **Carter L, Murphy K.** Lineage-Specific Requirement for Signal Transducer and Activator of Transcription (Stat)4 in Interferon Gamma Production from Cd4(+) Versus Cd8(+) T Cells. *J Exp Med* 189, 1355-1360, (1999).
234. **Macatonia S, Hosken N, Litton M, Vieira P, Hsieh C, Culpepper J, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy K, O'Garra A.** Dendritic Cells Produce Il-12 and Direct the Development of Th1 Cells from Naive Cd4+ T Cells. *J Immunol* 154, 5071-5079, (1995).
235. **Fiorentino D, Bond M, Mosmann T.** Two Types of Mouse T Helper Cell. Iv. Th2 Clones Secrete a Factor That Inhibits Cytokine Production by Th1 Clones. *J Exp Med* 170, 2081-2095, (1989).
236. **O'Garra A, Stapleton G, Dhar V, Pearce M, Schumacher J, Rugo H, Barbis D, Stall A, Cupp J, Moore K.** Production of Cytokines by Mouse B Cells: B Lymphomas and Normal B Cells Produce Interleukin 10. *Int Immunol* 2, 821-832, (1990).
237. **Wei S, Kryczek I, Zou L, Daniel B, Cheng P, Mottram P, Curiel T, Lange A, Zou W.** Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Cd8+ Regulatory T Cells in Human Ovarian Carcinoma. *Cancer Res* 65, 5020-5026, (2005).
238. **O'Garra A, Vieira P.** T(H)1 Cells Control Themselves by Producing Interleukin-10. *Nature Reviews immunology* 7, 425-428, (2007).

239. **McGeachy M, Bak-Jensen K, Chen Y, Tato C, Blumenschein W, McClanahan T, Cua D.** Tgf-Beta and Il-6 Drive the Production of Il-17 and Il-10 by T Cells and Restrain T(H)-17 Cell-Mediated Pathology. *Nature immunology* 8, 1390-1397, (2007).
240. **Moore K, De W, Coffman R, O'Garra A.** Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683-765, (2001).
241. **Mosser D, Zhang X.** Interleukin-10: New Perspectives on an Old Cytokine. *Immunology Reviews*. 226, 205-218, (2008).
242. **Boonstra A, Rajsbaum R, Holman M, Marques R, Asselin-Paturel C, Pereira JP, Bates EE, Akira S, Vieira P, Liu YJ, Trinchieri G, O'Garra A.** Macrophages and Myeloid Dendritic Cells, but Not Plasmacytoid Dendritic Cells, Produce Il-10 in Response to Myd88- and Trif-Dependent Tlr Signals, and Tlr-Independent Signals. *J Immunol* 177, 7551-7558, (2006).
243. **Shortman K, Naik S.** Steady-State and Inflammatory Dendritic-Cell Development. *Nat Rev Immunol*. 7, 19-30, (2007).
244. **Dillon S, Agrawal S, Banerjee K, Letterio J, Denning TL, Oswald-Richter K, Kasprovicz DJ, Kellar K, Pare J, van Dyke T, Ziegler S, Unutmaz D, Pulendran B.** Yeast Zymosan, a Stimulus for Tlr2 and Dectin-1, Induces Regulatory Antigen-Presenting Cells and Immunological Tolerance. *J Clin Invest* 116, 916-928, (2006).
245. **Chen C, Del Gatto-Konczak F, Wu Z, Karin M.** Stabilization of Interleukin-2 Mrna by the C-Jun Nh2-Terminal Kinase Pathway. *Science* 19, 1945-1949, (1998).
246. **Cheneval D, Kastelic T, Fuerst P, Parker CN.** A Review of Methods to Monitor the Modulation of Mrna Stability: A Novel Approach to Drug Discovery and Therapeutic Intervention. *J Biomol Screen* 15, 609-622, (2010).
247. **Shaw G, Kamen R.** A Conserved Au Sequence from the 3' Untranslated Region of Gm-Csf Mrna Mediates Selective Mrna Degradation. *Cell* 46, 659-667, (1986).
248. **Brewer G.** An a + U-Rich Element Rna-Binding Factor Regulates C-Myc Mrna Stability in Vitro. *Mol Cell Biol* 11, 2460-2466, (1991).
249. **Müllner E, Kühn L.** A Stem-Loop in the 3' Untranslated Region Mediates Iron-Dependent Regulation of Transferrin Receptor Mrna Stability in the Cytoplasm. *Cell* 53, 815-825, (1988).
250. **Bakheet T, Williams BR, Khabar KS.** Ared 3.0: The Large and Diverse Au-Rich Transcriptome. *Nucleic Acid Res* 1, 111-114, (2006).
251. **Sarkar S, Han J, Sinsimer KS, Liao B, Foster RL, Brewer G, Pestka S.** Rna-Binding Protein Auf1 Regulates Lipopolysaccharide-Induced Il10 Expression by Activating Ikappab Kinase Complex in Monocytes. *Mol Cell Biol* 31, 602-615, (2011).
252. **Bandyopadhyay S, Sengupta TK, Fernandes DJ, Spicer EK.** Taxol- and Okadaic Acid-Induced Destabilization of Bcl-2 Mrna Is Associated with Decreased Binding of Proteins to a Bcl-2 Instability Element. *Biochem Pharmacol* 66, 1151-1162, (2003).

253. **Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yoshimoto T, Nakanishi K.** Interleukin-18: A Novel Cytokine That Augments Both Innate and Acquired Immunity. *Adv Immunol* 70, 281-312, (1998).
254. **Moussion C, Ortega N, Girard JP.** The Il-1-Like Cytokine Il-33 Is Constitutively Expressed in the Nucleus of Endothelial Cells and Epithelial Cells in Vivo: A Novel 'Alarmin'?. *PLoS One.* 3, 3331, (2008).
255. **Martinon F, Mayor A, Tschopp J.** The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annu Rev Immunol* 27, 229-265, (2009).
256. **Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J.** Nalp3 Forms an Il-1beta-Processing Inflammasome with Increased Activity in Muckle-Wells Autoinflammatory Disorder. *Immunity* 20, 319-325, (2004).
257. **Church L, Cook G, McDermott M.** Primer: Inflammasomes and Interleukin 1beta in Inflammatory Disorders. *Nat Clin Pract Rheumatology* 4, 34-42, (2008).
258. **Kanneganti T, Ozören N, Body-Malapel M, Amer A, Park J, Franchi L, Whitfield J, Barchet W, Colonna M, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant E, Akira S, Núñez G.** Bacterial Rna and Small Antiviral Compounds Activate Caspase-1 through Cryopyrin/Nalp3. *Nature* 440, 233-236, (2006).
259. **Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Métivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G.** Calreticulin Exposure Dictates the Immunogenicity of Cancer Cell Death. *Nat Med* 13, 54-61, (2007).
260. **Lotze M, Zeh H, Rubartelli A, Sparvero L, Amoscato A, Washburn N, Devera M, Liang X, Tör M, Billiar T.** The Grateful Dead: Damage-Associated Molecular Pattern Molecules and Reduction/Oxidation Regulate Immunity. *Immunol Rev*, 60-81, (2007).
261. **Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, Vermaelen K, Panaretakis T, Mignot G, Ullrich E, Perfettini JL, Schlemmer F, Tasdemir E, Uhl M, Génin P, Civas A, Ryffel B, Kanellopoulos J, Tschopp J, André F, Lidereau R, McLaughlin NM, Haynes NM, Smyth MJ, Kroemer G, Zitvogel L.** Activation of the Nlrp3 Inflammasome in Dendritic Cells Induces Il-1beta-Dependent Adaptive Immunity against Tumors. *Nat Med* 15, 1170-1178, (2009).
262. **Hagemann T, Balkwill F, Lawrence T.** Inflammation and Cancer: A Double-Edged Sword. *Cancer cell* 12, 300-301, (2007).
263. **Yuki M, Koichi I, Morichika K, Hiroaki N.** A Polysaccharide Extracted from *Grifola Frondosa* Enhances the Anti-Tumor Activity of Bone Marrow-Derived Dendritic Cell-Based Immunotherapy against Murine Colon Cancer. *Cancer Immunol Immunother* 59, 1531-1541, (2010).
264. **Ruffa M, Perusina M, Alfonso V, Wagner M, Suriano M, Vicente C, Campos R, Cavallaro L.** Antiviral Activity of *Petiveria Alliacea* against the Bovine Viral Diarrhea Virus. *Chemotherapy* 48, 144-147, (2002).

265. **Cavalcanti X.** Ensaios Toxicológicos Pré-Clínicos Com Extrato Bruto Seco Das Folhas De *Petiveria Alliacea* Linné. *Universidade Federal de Pernambuco* 104, (2008).
266. **Santander S, Urueña C, Castañeda D, Cifuentes C, Aristizabal F, Cordero C, Fiorentino S.** Influencia Del Tratamiento De *Petiveria Alliacea* En La Expresión Diferencial De Genes En Células TumORAles. *Universitas Medicina* 50, 284-296, (2009).
267. **Serafini M, Peluso I, Raguzzini A.** Flavonoids as Anti-Inflammatory Agents. *Proc Nutr Soc* 69, 273-278, (2010).
268. **Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R.** Polyphenols, Intracellular Signalling and Inflammation. *Ann Ist Super Sanita* 43, 394-405, (2007).
269. **Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC.** The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer. *Pharmacol Rev* 52, 673-751, (2000).
270. **Funakoshi-Tago M, Nakamura K, Tago K, Mashino T, Kasahara T.** Anti-Inflammatory Activity of Structurally Related Flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. *int immunopharmacology* 11, 1150-1159, (2011).
271. **Yoon M, Lee J, Choi B, Jeong Y, Lee C, Park J, Moon Y, Sung S, Lee S, Chang Y, Chung H, Park Y.** Apigenin Inhibits Immunostimulatory Function of Dendritic Cells: Implication of Immunotherapeutic Adjuvant. *Mol Pharmacol* 70, 1033-1044, (2006).
272. **Del Valle L, Macías C, Cruz C, Rivero R, Nadal E.** Efecto De Un Extracto De *Petiveria Alliacea* L Sobre La Proliferación De Linfocitos Humanos. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 9, 134-135, (1993).
273. **Batista A, Duarte I, Urdaneta L, Colon M, Esmerido J, Puente E, Alfonso A, Castillo H, Salas H, Lemuz M.** Efecto Protector De *Petiveria Alliacea* L. (Anamú) Sobre La Inmunosupresión Inducida Por 5-Fluoruracilo En Ratones Balb/C. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10, 256-264, (2011).
274. **De Vries I, Lesterhuis W, Scharenborg N, Engelen L, Ruiter D, Gerritsen M, Croockewit S, & Britten C, Torensma R, Adema G, Figdor C, Punt CJ.** Maturation of Dendritic Cells Is a Prerequisite for Inducing Immune Responses in Advanced Melanoma Patients. *Clin Cancer Res.* 9, 5091-5100, (2003).
275. **Dunn G, Schreiber D.** The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* 21, 137-148, (2004).

11. Anexos

11.1 ARTICULO 3: Influencia del tratamiento de *Petiveria alliacea* en la expresión diferencial de genes en células tumorales.

(Artículo publicado en la revista Universitas Medica 50(3): 284-296. 2009).



Galactomannan from *Caesalpinia spinosa* induces phenotypic and functional maturation of human dendritic cells

S.P. Santander^a, M. Aoki^c, J.F. Hernandez^a, M. Pombo^b, H. Moins-Teisserenc^{c,d}, N. Mooney^c, S. Fiorentino^{a,*}

^a Immunology and Cellular Biology Group, Faculty of Sciences, Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, Colombia

^b Fundación Universitaria Juan N. Corpas, Bogotá, Colombia

^c INSERM, U940, Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris 7, Paris, France

^d Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Saint-Louis, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 November 2010

Received in revised form 24 December 2010

Accepted 4 January 2011

Available online 19 January 2011

Keywords:

Dendritic cells
Immunomodulation
Gene expression
Galactomannan
Polysaccharide
Caesalpinia spinosa

ABSTRACT

Plant polysaccharides present an interesting potential as immunomodulators, particularly in the induction of antitumoral responses, principally because of their molecular complexity and low *in vivo* toxicity. Activation of dendritic cells (DCs) could improve antitumoral responses usually diminished in cancer patients, and natural adjuvants provide a possibility of inducing this activation. Herein, we investigated the immunomodulatory activity of a neutral plant polysaccharide Galactomannan on human monocyte-derived DCs (MDDC). MDDCs were stimulated with Galactomannan (GLM) from *Caesalpinia spinosa* and both phenotypic and functional activities were assessed by flow cytometry and real-time PCR. The phagocytic ability of MDDCs was determined by using E-coli pHrodo particles and induction of T-lymphocyte allostimulation was determined after T-cell staining with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE).

In MDDCs, purified Galactomannan induced phenotypic maturation revealed by increased expression of CD83, CD86, CD206, and HLA-DR. Functional experiments showed the loss of particulate antigen uptake in Galactomannan-stimulated DCs and increased alloantigen presentation capacity. Finally, Galactomannan increased protein and mRNA levels of pro-inflammatory cytokines including IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, and TNF- α . These data reveal that Galactomannan obtained from *Caesalpinia spinosa* promotes effective activation of MDDCs. This adjuvant-like activity may have therapeutic applications in clinical settings where immune responses need boosting.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The role for polysaccharides in the antitumoral immune response was first reported 40 years ago [1]. Since then, the use of polysaccharides as antitumor drugs has been repeatedly suggested and recent studies revealing their low level of toxicity have contributed to the increasing interest in polysaccharides as therapeutic agents [2,3]. To date, polysaccharides, principally of fungal origin, have been studied. Their antitumoral or immunomodulatory activities were attributed to either a protective or an immunostimulatory role or even to direct antitumoral activity. The most extensively studied polysaccharides with antitumoral activity are β -1, 3 and β -1, 6-glucans. However, a wide range of polysaccharides with different structures also have biological and immunomodulatory activities [4].

Antigen-presenting cells (APCs) play a key role in initiating the cognate immune response. Plant polysaccharides have been shown to

activate DCs, the most potent APCs [2], possibly by interacting with Toll-like receptors (TLR), collectins, or scavenger receptors (SRs) [5]. These receptors are considered pattern recognition receptors and induce, via ligand binding, the expression of innate immunity genes [6], favoring the development of both innate and cognate immune responses. A complete activation of DCs, leading to high expression of surface major histocompatibility complex (MHC) class-II and co-stimulatory molecules, as well as secretion of IL-12, is crucial for the induction of CD4⁺ T-lymphocyte responses. Conversely, incomplete activation may impair T-cell activation and function, as reported within the context of antitumoral immune responses [7,8]. Therefore, the identification and the characterization of new adjuvants leading to optimal activation of DCs are crucial to improve vaccine strategies and immunotherapy in general.

The stimulatory effects of certain polysaccharides on human DCs have been described [9–11]; however, their potential use as adjuvants is limited by the restricted availability of purified products.

Galactomannans, polysaccharides widely used as emulsion stabilizers in the pharmaceutical and food industries are mainly obtained from endosperm of leguminous seeds. Given their low toxicity, they are also used in the cosmetic and biomedical industries [12], either alone or

* Corresponding author. Carrera 7 No. 43–82 Ed. 53 Of. 608. Tel.: +1 571 3208320x4149 4103; fax: +1 571 3208320x4021.

E-mail address: susana.fiorentino@javeriana.edu.co (S. Fiorentino).

conjugated to antitumoral drugs [13]. The biological activity of Galactomannans has not been extensively studied, but an immunomodulatory effect, similar to that reported for Acemannan [14], can be envisaged, as these polysaccharides share similar mannose content. Galactomannans are heterogeneous in terms of origins, structure and biological activities. Among them, conidia from *Aspergillus fumigatus* induces maturation of human Langerhans cells, mainly localized in the skin. This signal is transmitted via a Galactomannan-recognizing receptor [15], identified as the DC-SIGN receptor, expressed on macrophages and dendritic cells. Interaction of conidia from *Aspergillus* with DC-SIGN favors macrophage infection and IL-10 production, along with decreasing antigen presentation [16].

Galactomannan from *Caesalpinia spinosa* and from *Aspergillus fumigatus* binds to the pentraxin receptor [17], leading to the activation of innate immune response, but the underlying molecular mechanism is still unknown.

Purified Galactomannan from lichen *Ramalina celastri* and *Morchella esculenta* increases the activity of rat peritoneal macrophages [18] and activation of the transcription factor NF- κ B, largely associated with inflammatory responses [19]. Galactomannan extracted from *Mimosa scabrella* and *Leucaena leucocephala* was reported to protect against infection by flavivirus (e.g. yellow fever virus or dengue virus) after sulfation. Collectively, these data underline the pharmacological potential of these polysaccharides [20].

In the present study, we evaluated the immunomodulatory activity on human MDDCs of purified Galactomannan obtained from *Caesalpinia spinosa*, better known as Tara. Several parts of the tree has been used since ancient times as anti-inflammatory for bronchial infections, sinusitis and rheumatism symptoms; however there are not known reports about traditional knowledge for cancer, but oral tradition suggests that in some regions of Colombia, *Caesalpinia* is used for cancer, and that Galactomannan had been used as a chewing of peasants, known as flu protector [21]. The immunostimulatory activity of this polysaccharide was demonstrated by transcriptional, phenotypic, and functional analysis, thus raising the possibility of developing a novel therapeutic approach to enhance antitumoral immunotherapy or vaccination strategies.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Immature pods of *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze were collected in Suba (Bogotá, Colombia). The plant was authenticated by Dr. Antonio Mejía from Fundación Universitaria Juan N. Corpas. Plant material was compared with the Colombian National Herbarium sample, registry number 523714.

2.2. Galactomannan extraction and purification from *Caesalpinia spinosa*

Seeds were manually removed from the pods, cleaned and treated in a steam bath at 92 °C for 5 min. The endosperm was then manually separated from the germ and hull and treated with UV radiation for 1 h and then refrigerated. Distilled water was added in a 1:5 (endosperm:water) proportion and the suspension was left to rest for 24 h. The suspension was further diluted to 1:10 (suspension:water) and mixed for 5 min proceeding to filtration through a gauze followed by centrifugation at 3800 g (IEC Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) for 20 min at 20 °C. Precipitation of Galactomannan was carried out by ethanol addition (99.8%, Riedel-de Haën) to the supernatant at a vol:vol ratio of 2:1. Ethanol was decanted and the precipitated Galactomannan was lyophilized and stored at 4 °C [22].

2.3. Preparation of solutions

The Galactomannan solution was prepared according to a previously described protocol with minor modifications [23]. Briefly, the required amount of polysaccharide was gradually added to the appropriate amount of distilled water and mixed for 1 h at room temperature, followed by heating to 80 °C for 30 min with continuous mixing. Insoluble material was removed by centrifugation at 3000 g (IEC Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) for 1 h at room temperature and the solution concentration was calculated from the dry matter content.

2.4. Chemical characterization of Galactomannan

Monosaccharide composition was determined by thin layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis; polysaccharide acid hydrolysis was carried out according to the method described by Roncero [24]. Polysaccharide was treated with 72% H₂SO₄ at room temperature for 4 h, followed by digestion at 110 °C for 4 h in 0.5 M H₂SO₄. The resulting suspension was neutralized with Na₂CO₃ and then evaporated under N₂ and dissolved in methanol. After several methanol extractions to remove Na₂SO₄ crystals, the sample was re-dissolved in distilled water to a known concentration. TLC analysis was performed on Silica Gel 60 plates (Merck KGaA) with ethyl acetate/propanol/acetic acid/water (4:2:2:1) and sugars were detected with anisaldehyde-sulfuric acid reagent. HPLC was performed on a Prominence LC-20AT (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) using an Aminex HPX-87P column (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), a fixed temperature of 84 °C and a water flow rate of 0.4 ml/min. The eluate was monitored by refraction index RID-10A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

2.5. Preparation of DCs

Fresh buffy coats (60 ml) were obtained from healthy volunteers upon informed consent and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified by ficoll density centrifugation (Amersham, GE Health Care Europe GmbH). Monocytes were isolated by positive selection using anti-CD14⁺ microbeads and the MiniMACS Systems according to manufacturer instructions (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The percentage of purity of these cells was confirmed by flow cytometry and was greater than 98%. Monocytes were cultivated for 5 days in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin, streptomycin (Eurobio, Paris, France) supplemented with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (800 IU/ml) and IL-4 (1000 IU/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Half of the culture medium was replaced with fresh medium containing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-4 on day 3 and MDDCs were routinely used on day 5 of culture. On day 5, the MDDCs were stimulated for 2 days with Galactomannan (7 and 21 μ g/ml) purified as described above. Lipopolysaccharide (LPS) stimulation was carried out in parallel as a positive control of MDDC stimulation (1 μ g/ml) and cells cultured without any stimulus were used as negative controls. All reagents were tested for the presence of LPS by the Lymulus spp assay (Bio Whittaker Inc., Walkersville, MD, USA). In addition, the Galactomannan used in the assays was treated with agarose beads coated with polymyxin B (PolB) to eliminate any LPS contamination (Sigma, St Louis, MO, USA). Cell viability was determined with trypan blue to monitor potential Galactomannan toxicity.

2.6. Flow cytometry and proliferation analysis

MDDC phenotypes were analyzed by using the following monoclonal antibodies (mAbs): CD1a-pacific blue, CD86-PE, CD83-FITC,

Table 1
Real time primer sequences.

| | Genes | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (5'-3') | Size |
|-----------------------|---|------------------------|--------------------------|------|
| Housekeeping gene | GAPDH | AGCCGAGCCACATCGCT | CCCTGGTGACCAGGC | 87 |
| Cytokines | IL1- β | ACAGACCTTCCAGGAGAATG | GCAGTTCAGTGATCGTACAG | 127 |
| | IL-4 | TGTGCTCCGGCAGTTCTACAG | TGGCTTCTTACAGGACAGG | 164 |
| | IL-6 | AATTCGGTACATCCTCGACGG | AATTCGGTACATCCTCGACGG | 100 |
| | IL-10 | GTGATGCCCAAGCTGAGA | CACGGCCTTGCTCTTGTTTT | 138 |
| | IL12p40 | TGGAGTGCCAGGAGGACAGT | TCTTGGGTGGGTGCGTTTG | 147 |
| | IL-23 | TGGAGTGCCAGGAGGACAGT | TCTTGGCAAGCAGAATGA | 76 |
| | IFN- γ | TCAGCTCGCATCGTTTTGG | GTTCCATTATCCGTACATCTGGA | 120 |
| | TNF- α | TCTTCTCGAACCCCGAGTGA | CCTCTGATGGCACCACCAG | 151 |
| | TGF β | TCTTCTCGAACCCCGAGTGA | AAGCGGAAGCCCTCAATTT | 136 |
| | Bcl-X | CTGGCGTGGAAAGCGTAGA | TGCTGCATTGTTCCCATGAG | 153 |
| Apoptosis regulator | TLR4 | AGCAACAATTCTGGCGATA | AAACTCGGATGGGGTTTCC | 117 |
| | NF- κ B | AGAAGTGCAGGGTCTGGATT | GCGGATTAGCTCTTTTCCCG | 145 |
| Toll-like receptor | PU.1 | ATTTGAAACTGGAAGCACGA | CTCGTGCCTTGGCGTTGGTATAGA | 101 |
| | cJUN | TGGAAACGACCTTCATGACGA | GTTGCCTGGACTGGATTATCAGG | 242 |
| Transcription factors | GATA3 | CGGCTTCGGATGCAAGTC | GTCGAGGTTGCCCCACAG | 81 |
| | Leukocyte immunoglobulin-like receptor (LIR) family | ILT2 | TCCTCTCTCTCTCTCTTC | 225 |

HLA-DR-APC-H7, CD209-PerCP-Cy5, and CD206-APC. All cells were collected and washed in PBS containing 2% FCS and 0.1% sodium azide. Immunostaining of non-stimulated or Galactomannan or LPS-stimulated MDDCs was performed by incubating the cells with the aforementioned antibodies for 20 min at 4 °C. After washing, flow cytometry was performed by using a FACSARIA™ (Becton-Dickinson, Colombia) and results were analyzed with Flowjo 8.7 software (Tree Star, Ashland, OR, U).

2.7. Phagocytosis assay

DC phagocytic activity was assayed using the pHrodo *Escherichia coli* BioParticles (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 1×10^5 DC per well were cultivated in RPMI supplemented with 5% fetal calf serum and pretreated or not for 48 h with either LPS (1 μ g/ml) or Galactomannan (7 or 21 μ g/ml). DCs were washed with HANKS buffer and mixed with 100 μ L (0.5 μ g/ml) pHrodo *E. coli* bioparticles for 3 h at 37 °C. Particle fluorescence was measured at an excitation of 530 nm and emission of 590 nm in a fluorometer (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA). The percentage of phagocytic cells was analyzed by flow cytometry. Dendritic cells were stained with CD11c-APC antibody, and double labeled cells were analyzed. Tests were carried out in triplicate and flow cytometry was performed as previously described.

2.8. Mixed leukocyte reaction

MDDCs were differentiated from human monocytes and stimulated for 48 h with LPS (1 μ g/ml) or Galactomannan at different concentrations (7 and 21 μ g/ml) in complete medium. Stimulated cells were collected, washed, and cultured in fresh RPMI media supplemented with 5% AB human serum GemCell™ (Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA, USA). Allogenic PBMC were purified on a ficoll hypaque gradient, stained with 2.5 μ M CFSE (Molecular Probes Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer instructions and cultured in 24 well plates with 5×10^5 MDDC at different ratios (1:2, 1:5, 1:10). After 5 days of co-culture, T lymphocytes were collected and stained with viability dye aqua fluorescent reactive (Invitrogen) and then with CD3-PerCP, CD4-APC-H7, and CD8-Pacific Blue (BD Biosciences). Flow cytometry was performed as previously described.

2.9. Real-time PCR expression profiling

MDDCs were stimulated or not with LPS (1 μ g/ml), Galactomannan (7 and 21 μ g/ml) for 24 h and total RNA was extracted by using TRIzol reagent according to manufacturer instructions (Invitrogen). The quality and quantity of RNA were assessed with a NanoDrop spectro-

photometer (NanoDrop Technologies). cDNA was synthesized with RNA PCR Core using Random hexamers, following manufacturer instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). We used 3 μ L of a 1:20 dilution of the reverse transcription reaction in a quantitative

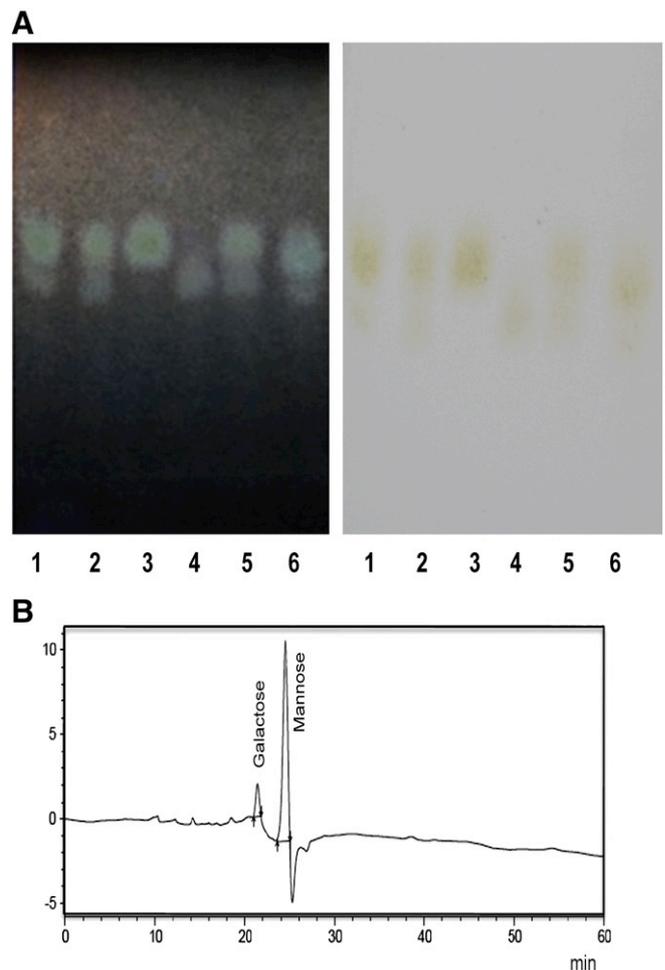


Fig. 1. Chemical characterization of Galactomannan purified from *Caesalpinia spinosa*. Panel (A) shows TLC chromatograms at 360 nm (left) and visible range (right) performed on Silica Gel 60 plates (Merck KGaA) ethyl acetate/propanol/acetic acid/water (4:2:2:1) detected with anisaldehyde - sulphuric acid reagent. Panel (B) shows the chromatogram obtained by HPLC-RI using an Aminex HPX-87P column, at a fixed temperature 84 °C and a flow rate of water 0.4 mL/min; (1) Galactose and (2) Mannose.

real-time PCR (qPCR) reaction, using 12.5 μ l of 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 50–400 nM of forward and reverse primers (Table 1) in a total volume of 25 μ l. The reactions were performed in duplicate in 96-well optical plates using an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The thermal

cycling conditions were as follows: an initial denaturing step at 95 $^{\circ}$ C for 10 min, 40 cycles at 95 $^{\circ}$ C for 15 s, and 60 $^{\circ}$ C for 60 s (or 62 $^{\circ}$ C for 30 s), followed by a dissociation stage (95 $^{\circ}$ C for 15 s, 60 $^{\circ}$ C for 15 s, and 95 $^{\circ}$ C for 15 s). The specificity of the amplified products was examined by a post-amplification melt curve analysis. Amplification

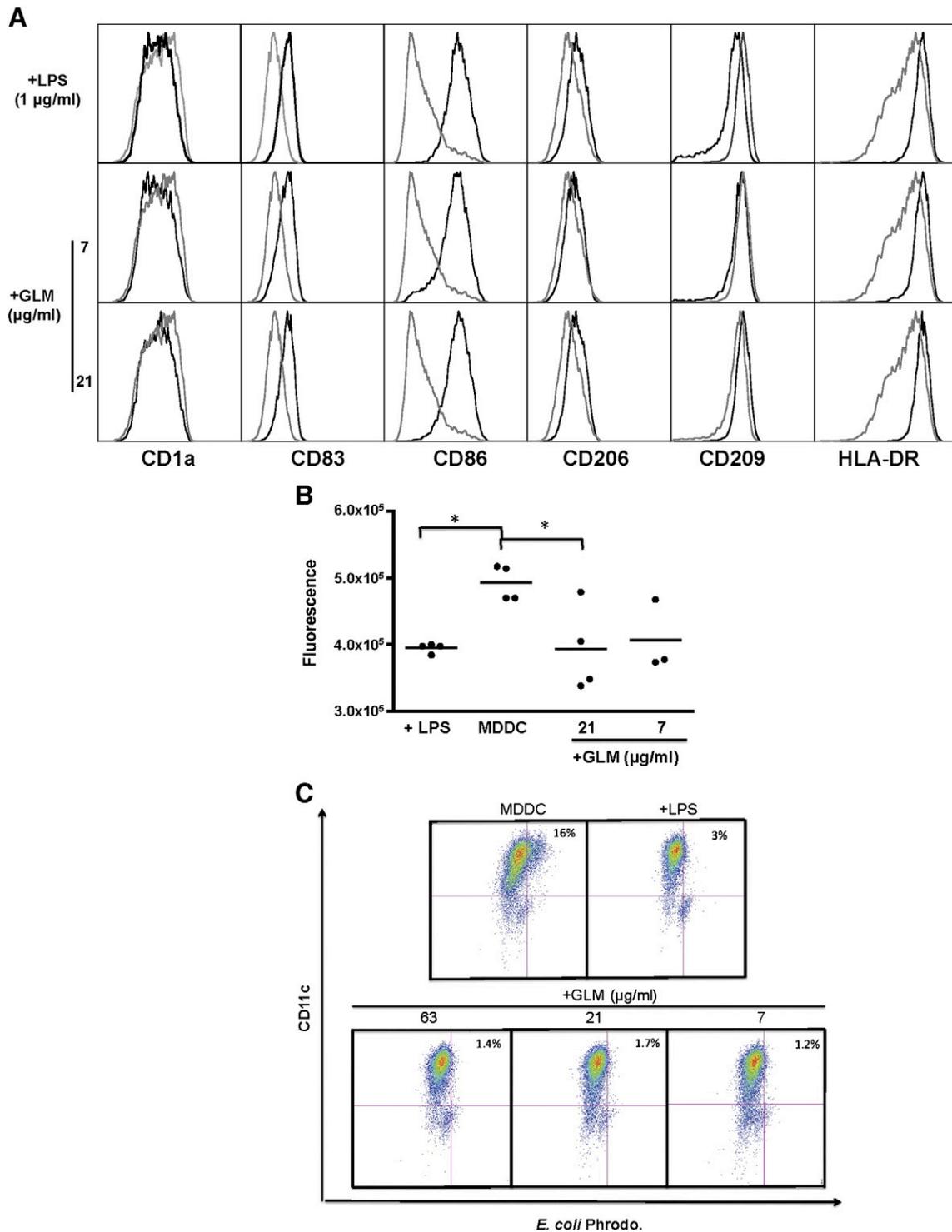


Fig. 2. Galactomannan induces phenotypic and functional maturation of DCs. (A) MDDCs were cultured for 48 h with LPS (1 μ g/mL) and GLM (7 and 21 μ g/mL). The expression levels of cell surface molecules including HLA-DR, CD86 and CD83 were increased after incubation with different concentrations of Galactomannan. Histograms representing one of four independent experiments. (gray histogram MDDCs and black histogram MDDCs phenotype after treatments). (B) Phagocytic capacity of MDDCs after 48 h of stimulation with LPS (1 μ g/mL) or GLM (7 and 21 μ g/mL) was measured using the phagocytic marker *E. coli* pHProdo for 3 h. Phagocytosis is considered positive when the emitted fluorescence is higher than that produced by the bio particles themselves. The figure show the mean of four independent experiments. Statistical significance was determined using one way ANOVA test with Bonferroni's multiple comparison post test. * $p < 0.05$. (C) Phagocytosis was confirmed by staining the MDDCs with CD11c-APC antibody and determine by flow cytometry. The scatter plots show cells after different treatments. MDDC, MDDC plus LPS, MDDC with GLM (63 μ g/mL), MDDC with GLM (21 μ g/mL), MDDC with GLM (7 μ g/mL). Dot plots are representing one of four independent experiments.

efficiency for each primer set was evaluated by a standard curve analysis with serial dilutions of each cDNA in a preliminary PCR experiment. A mean threshold cycle (Ct) value was calculated for each independent experiment. The expression level of each transcript was normalized to the endogenous control gene for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Relative expression was calculated by using the comparative method $2^{-\Delta\Delta CT} = [(CT \text{ gene of interest} - CT \text{ internal control}) \text{ sample A} - (CT \text{ gene of interest} - CT \text{ internal control}) \text{ sample B}]$. Sample A corresponds to treated MDDCs and sample B is non-stimulated MDDCs [25].

2.10. Measurement of cytokine levels

Cytokine secretion was evaluated after 48 h of stimulation with Galactomannan or controls (LPS or sterile water) by using the human inflammation cytometric bead array kit (BD Biosciences). Levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, and TNF- α were measured in culture supernatants according to manufacturer instructions (CBA; BD Biosciences). Briefly, MDDC supernatants (1×10^6 cells per well) cultures were collected and stored at -80°C until analysis. The analysis was performed by using a FACSCanto II™ flow cytometer with the program for Cytometric Bead Array kit (CBA) (BD Biosciences, San Jose, CA).

2.11. Supplementary methods

To exclude the presence of contaminating LPS in the trials, all reagents were analyzed by using limulus amoebocyte lysate (LAL PYROGENT®) (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD, USA). No endotoxin detection was determined in Galactomannan samples (sensitivity limit test 0,10 EU/mL); however, to ensure endotoxin free sample, Galactomannan was treated with agarose beads coated with PolB twice to eliminate any LPS contamination (Sigma, St Louis, MO, USA).

3. Results

3.1. Chemical characterization of Galactomannan obtained from *Caesalpinia spinosa*

Polysaccharide obtained from *Caesalpinia spinosa* immature pods was hydrolyzed in acid media to obtain free monosaccharide units, which were characterized by chromatographic techniques. Fig. 1A shows a TLC plate developed with anisaldehyde-sulphuric acid reagent. The Galactomannan hydrolyzed sample migrates with the same Rf and spot coloration at 360 nm (green and green-gray) as those obtained from migration of a 1:1 mixture of galactose and mannose patterns [26]. Different TLC chromatographic plates performed with monosaccharide (glucose, fructose) and disaccharide patterns (lactose, sucrose, trehalose) confirmed that only mannose and galactose were detected in the purified material (Data not shown).

Thereafter, we carried out HPLC separation on a Pb⁺² cation exchange resin column AMINEX HPX87P coupled with a refraction index detector, which allows high resolution and selectivity for pentose and hexose analysis; Fig. 1B shows the chromatogram of hydrolyzed Galactomannan. Two peaks were detected (retention times 22 and 25 min), corresponding precisely to the retention times of mannose and galactose. Furthermore, HPLC analysis showed the absence of different monosaccharides from mannose and galactose in the sample; thus, confirming the data obtained from TLC experiments and the purity of our polysaccharide.

3.2. Galactomannan increases the expression of MHC class-II and co-stimulatory molecules on MDDCs

Induction of an adaptive immune response requires the expression of peptide-bound MHC class-II and co-stimulatory molecules on DCs to induce T-lymphocyte activation. The ability of purified Galactomannan from *Caesalpinia spinosa* to modify the MDDC antigen-

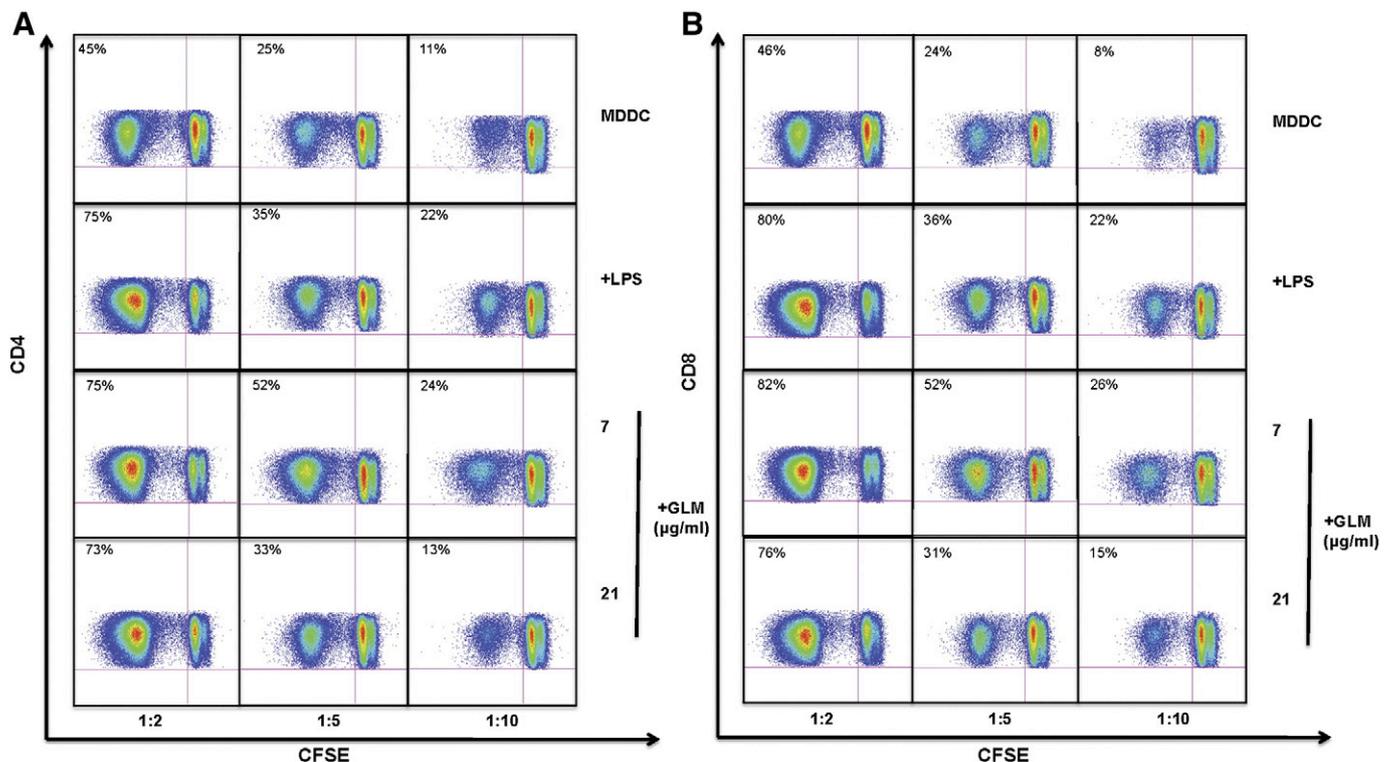


Fig. 3. MDDCs induced allogenic CD4 and CD8 T-lymphocyte proliferation after GLM treatment. MDDC antigen presentation after stimulation with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) or GLM (7 or 21 $\mu\text{g/ml}$) was determined by T-cell proliferation assays. Stained PBMCs with CFSE (2,5 μM) were co-culture with MDDCs in ratios 1:2, 1:5 and 1:10 (DCs: PBMC) during 5 days. CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) cell proliferation was determined using specific antibodies and analyzed through flow cytometry. Dot plot are representing one of four independent experiments.

Table 2
CD4 and CD8 T-lymphocyte allogenic proliferative responses.

| A. | | | | |
|---|-------|------------------------|----------|---------|
| % CD4 ⁺ T cell proliferation | | | | |
| (MDDCs:PBMC) | MDDC | + LPS 1 | + GLM 21 | + GLM 7 |
| | | (μg mL ⁻¹) | | |
| 1:2 | 30±8 | *54±12 | *55±16 | *54±12 |
| 1:5 | 25±5 | 25±5 | 28±7 | *44±7 |
| 1:10 | 8±3 | 16±3 | 19±6 | 32±13 |
| B. | | | | |
| % CD8 ⁺ T cell proliferation | | | | |
| (MDDCs:PBMC) | MDDC | + LPS 1 | + GLM 21 | + GLM 7 |
| | | (μg mL ⁻¹) | | |
| 1:2 | 32±12 | 52±13 | 50±14 | *53±12 |
| 1:5 | 14±3 | 27±6 | 25±4 | *38±4 |
| 1:10 | 5±0 | 16±3 | 17±1 | *27±6 |

MDDCs stimulated for 48 h with LPS (1 μg mL⁻¹) or Galactomannan (7 and 21 μg mL⁻¹) induced allogenic CD4 and CD8 T-lymphocyte proliferation after 5 days of co-culture at different ratios (1:2, 1:5, 1:10). CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes stained with CFSE were determined using specific antibodies (CD3, CD4 and CD8) and stained with viability dye. The table shows the proliferation mean percentage ± SEM of 4 independent experiments. Statistical significance was determined by using one-way ANOVA test with Bonferroni's Multiple Comparison post Test * *p* < 0.05.

presenting and co-stimulatory molecules was determined after culture for 48 h in the presence of different concentrations of polysaccharide (7 and 21 μg/ml). Fig. 2A reveals that Galactomannan induces phenotypic changes comparable to those induced by LPS at both concentrations tested. MDDC activation was revealed by increased expression of HLA-DR and the co-stimulatory molecule CD86 on Galactomannan-stimulated MDDCs. The DC maturation marker protein CD83 was also increased, as was CD206. MDDCs activation by Galactomannan was selective as neither expression of CD1a nor of CD209 was altered.

3.3. Stimulation with Galactomannan reduces particulate antigen phagocytosis by DCs

Given that DC maturation is associated with reduced ability for antigen uptake [8,27], we tested phagocytosis of particulate antigen

before and after stimulation with Galactomannan. Analysis of the *E. coli* bioparticle pHrodo™ captured by MDDCs treated or not with different stimuli showed that Galactomannan induces a statistically significant (*p* < 0.005) decrease in the uptake of *E. coli*, similar to that observed with LPS (Fig. 2B and C).

3.4. Galactomannan increases antigen presentation by DCs

Allotimulation assays were used as a read-out of the functional ability of DCs for antigen presentation after Galactomannan stimulation; DCs were cultured for 5 days with different ratios of CFSE-labeled allogeneic PBMC. The percentage of proliferating CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ lymphocytes was determined by measuring CFSE fluorescence. In Galactomannan, stimulated MDDCs induced proliferation of alloreactive CD4 and CD8 T lymphocytes confirming the immunostimulatory activity of this polysaccharide. A representative experiment (one of four independent experiments) is shown in Fig. 3A and B (data are summarized on Table 2).

3.5. Stimulation of DC with Galactomannan increases mRNA expression levels of selected immune response genes

MDDCs were treated with Galactomannan, LPS, or the respective solvent for 24 h and mRNA relative expression of selected genes was studied by real-time PCR (Table 1). We used GAPDH as a housekeeping gene given that transcript expression was unaltered by MDDC stimulation by either LPS or Galactomannan [25,28]. By comparing gene expression of immature vs. Galactomannan-treated MDDCs, we found that polysaccharide treatment significantly increased the transcript expression of cytokines implicated in pro-inflammatory immune responses: IL-1β (8 fold), IL-12p40 (7.6 fold), IL-23 (5 fold), IL-6 (5 fold), INF γ, (3 fold), TNF-α (2.8 fold) and IL-4 (2 fold), as well as NF-κB in which the increase was 2.3 fold (Fig. 4). Interestingly, Galactomannan decreased TLR4 expression by 5 fold and TGFβ by 2 fold.

Overall, LPS-treated MDDCs had an expression profile of the genes studied, which was similar to Galactomannan-treated MDDCs (Fig. 4). However, IL-12, IL-1β, IL-6, IL-23, and INF-γ are higher after Galactomannan activation. In contrast, IL-10, GATA3, and c-jun are down modulated after LPS activation but not with Galactomannan. These results indicate that both Galactomannan and LPS induce

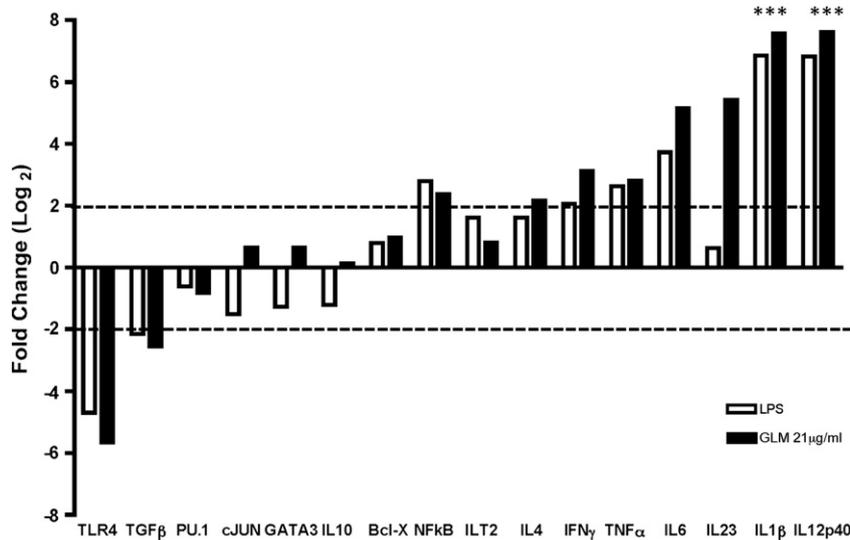


Fig. 4. Real-time PCR gene expression in MDDCs after treatment with GLM. Expression levels of genes involved in the induction of immune response by MDDCs were analyzed after 24 h of stimulation with LPS (1 μg/mL white bars) or GLM (21 μg/mL black bars). The levels of gene expression in stimulated MDDCs were compared with unstimulated MDDCs. Relative gene expression was calculated using the method $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Data represent the mean of 2 independent experiments. Statistical significance was determined using two-way ANOVA test with Bonferroni's multiple comparison post test. * *p* < 0.0001. Black dotted line indicates the over level (>2) and under level of expression (<-2). The results are expressed using \log_2 of $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

predominantly pro-inflammatory cytokine gene expression with a superior effect of Galactomannan on cytokines known to be involved in antitumor response. [29]

3.6. Galactomannan-treated MDDCs predominantly produce pro-inflammatory cytokines

To confirm the cytokine transcript profiles found by RT-PCR, we measured the cytokine concentrations in culture supernatants from

MDDCs treated with either LPS or Galactomannan. The results show that higher concentration (21 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of Galactomannan activate a highly IL-1 β secretion, detected after 24 and 48 h of stimulation, compared with LPS. Additionally, IL-6, IL-10, IL-12p70, and TNF- α were also increased in accordance with the results obtained by real-time PCR (Fig. 5). IL-8 was also significantly increased after 24 h but a decrease after 48 h was observed, as noted with TNF- α and IL-6 compared to LPS. IL-12p70 was also detected, but at a lower concentration compared with LPS. Interestingly, Galactomannan

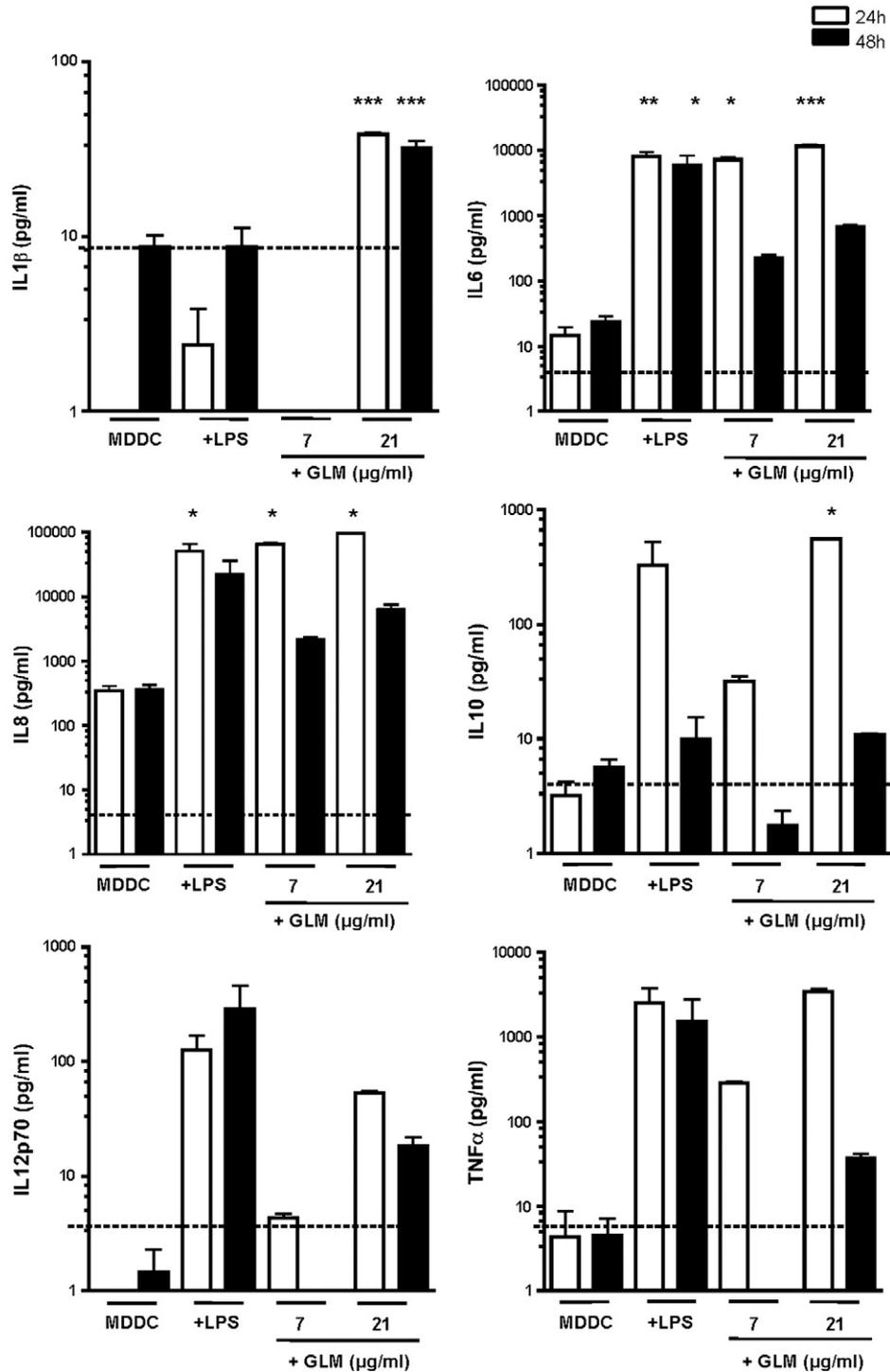


Fig. 5. Galactomannan induces secretion of pro-inflammatory and immunosuppressive cytokines in MDDCs. IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and TNF- α levels were quantified in MDDCs supernatants after 24 and 48 h of treatment with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or GLM (7 and 21 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Data represent the mean of 3 independent experiments. Statistical significance was determined comparing stimulated and unstimulated MDDCs, by using unpaired T test (* p < 0.05). Cytokine concentrations were measured using CBA kit (BD Biosciences) by flow cytometry. Black dotted line indicates the CBA kit detection limit.

induced the secretion of a higher concentration of IL-10 after 24 h in a dose-dependent manner; however, after 48 h IL-10 production is significantly lower. No change was observed in the IL-10 gene expression with Galactomannan, suggesting that the initial rapid production of this cytokine could be due to translation of mRNA present at the baseline in the cell. Increased values of IL-1 β , TNF- α , and IL-12 p70 were also observed in ELISA assays after 48 h (data not shown).

4. Discussion

The results of this study show that Galactomannan purified from *Caesalpinia spinosa* induces phenotypic maturation of MDDCs with increased expression of CD83, CD86, CD206, and HLA-DR and increased expression of pro-inflammatory cytokines at both the transcriptional and the protein levels, such as IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-23, and TNF- α . Additional evidence that Galactomannan provides a maturation stimulus to MDDCs is the loss of their capacity for particulate antigen uptake and the increased allostimulation of T lymphocytes. DC activation plays a central role in the induction of immune responses against pathogens and tumor cells, but the efficacy of the response is determined by DC maturity. Activation of DCs through the sensors of the innate immune system [30] leads to increased antigen presentation, expression of co-stimulatory molecules, and cytokine secretion, ultimately leading to optimal T-lymphocyte activation. When antigen presentation is not optimal, lymphocyte activation may be compromised, leading to the possibility of unresponsiveness [7]. Because the lack of T-cell responsiveness has been documented in a tumor environment, the use of adjuvants like Galactomannan to promote and amplify DC maturation, in the presence of tumor antigens, could allow the induction of specific antitumor immune responses.

The marked increase of IL-1 β production, both at the transcriptional and protein levels, in Galactomannan-treated MDDCs, is important because IL-1 β is necessary for the induction of specific adaptive antitumor responses [29]. Although purinergic receptors are involved in IL-1 β production [31,32], Galactomannan seems to independently induce IL-1 β secretion. It could be possible that this polysaccharide acts as mannan isolated from yeast, which is able to induce the production of TNF- α and IL-1 β by binding to one of the C-type lectins mannanose receptor family expressed by APCs [33], activating an alternative activation pathway.

Secretion of IL-6 and TNF- α induced by Galactomannan might contribute to the establishment of an inflammatory environment, which can initiate or maintain DC activation. Additionally, TNF- α may participate in inducing death of tumor cells, [34,35]. The signals required for the production of these cytokines can be mediated by activation of MyD88 through TLR2 and TLR4 [36] as reported for LPS [37,38]. In fact, TLR4 have a high affinity for mannan [39], which might act as a danger signal. We are currently evaluating whether Galactomannan may, therefore, act through the mannan receptor or TLR4 so we hypothesized that Galactomannan should interact with DCs through the mannan receptor (CD206) which has high affinity for highly branched mannanose structures or TLR4 since GLM and α -mannan share a backbone composed of mannanose (differing only in anomeric configuration).

The type of cytokines produced during antigen presentation can polarize the T-cell response toward a Th-1, Th-2, Th-9, Th-17, or regulatory T-cell profile [40]. Galactomannan induced transcriptional and translational increase of IL-12 but only translational increase of IL-10 [41]. It might allow assuming that Galactomannan favors the Th-1 generation, mediated by IL-12 with a further activation of IFN- γ producing cells [42]. In contrast, early secretion of IL-10 could play a role in the limitation of the pro-inflammatory response as proposed for LPS [43] ([44]). In general terms, Galactomannans have been shown to have immunostimulatory activity, such as those obtained from the *Morchella esculenta* fungus [19] or the Galactomannan rich fraction purified from *Trigonella foenum* which enhanced active phagocytosis

of zymosan particles in rat peritoneal macrophages [45]. However, unlike *Caesalpinia spinosa* polysaccharide, the Galactomannan of *Aspergillus* induces high IL-10 production without IL-12 production, potentially due to stimulation through the DC-SIGN receptor [16]. It is possible that structural differences between those polysaccharides could explain functional differences.

This study provides novel data revealing the immunoregulatory capacity of Galactomannan from *Caesalpinia spinosa* in human DCs and, thus, provides further evidence for the therapeutic potential of this polysaccharide. We are currently evaluating the immunomodulatory activity in a specific tumor antigen model, both *in vitro* and *in vivo*, to validate its future utility as an antitumoral adjuvant.

Acknowledgements

Financial support was provided by the Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco Jose de Caldas” (COLCIENCIAS) Bogotá, Colombia. Grant number 324-2007 Cod 1203408204 (S. Fiorentino). M.A. was a postdoctoral fellow funded by Fondation de France. S.P.S. and J.F.H. are PhD student funded by COLCIENCIAS.

References

- Chihara G, Maeda Y, Hamuro J, Sasaki T, Fukuoka F. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk) sing. *Nature* 1969;222(5194):687–8.
- Tzianabos A. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structural aspects and biologic function. *Clin Microbiol Rev* 2000;13(4):523–33.
- Pascual D, Morales R, Gil E, Munoz L, Lopez J, Casanueva L. Adjuvants: Present regulatory challenges. *Vaccine* 2006;24(Suppl 2) S2-88-9.
- Zhanga M, Cuia S, Cheungb P, Wanga Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci Technol* 2007;18(4-19).
- Lombard Y, Giaimis J, Makaya-Kumba M, Fonteneau P, Poindron P. A new method for studying the binding and ingestion of zymosan particles by macrophages. *J Immunol Meth* 1994;174(1-2):155–65.
- Kim Y, Ryu J, Han S, et al. Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and beta-1, 3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. *J Biol Chem* 2000;275(42):32721–7.
- Adlerc H, Steinbrink K. Tolerogenic dendritic cells in health and disease: Friend and foe! *Eur J Dermatol* 2007;17(6):476–91.
- Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: Which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002;23(9):445–9.
- Mei-Chi L, Hwang S, Chang F, et al. Immunostimulatory effect of *Antrodia camphorata* extract on functional maturation of dendritic cells. *Food Chem* 2009;113(4):1049–57.
- Kim GY, Ko WS, Lee JY, et al. Water extract of *Cordyceps militaris* enhances maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells *in vitro*. *Biol Pharm Bull* 2006;29(2):354–60.
- Schepetkin I, Quinn M. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol* 2006;6(3):317–33.
- Srivastava M, Kapoor V. Seed galactomannans: An overview. *Chem Biodivers* 2005;2(3):295–317.
- Tevyashova A, Olsufyeva E, Preobrazhenskaya M, et al. New conjugates of antitumor antibiotic doxorubicin with water-soluble Galactomannan: Synthesis and biological activity. *Russ J Bioorg Chem* 2007;33(1):139–45.
- Tizard I, Carpenter R, McAnalley B, Kemp M. The biological activities of mannans and related complex carbohydrates. *Mol Biother* 1989;1(6):290–6.
- Persat F, Noiret N, Diana J, et al. Binding of live conidia of *Aspergillus fumigatus* activates *in vitro*-generated human Langerhans cells via a lectin of galactomannan specificity. *Clin Exp Immunol* 2003;133(3):370–7.
- Serrano D, Dominguez A, Ancochea J, Jimenez J, Leal A, Corbi A. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J Immunol* 2004;173(9):5635–43.
- Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, et al. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* 2002;420(6912):182–6.
- Noleto G, Merce A, Iacomini M, Gorin P, Socol V, Oliveira M. Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. *Mol Cell Biochem* 2002;233(1-2):73–83.
- Duncan C, Pugh N, Pasco D, Ross S. Isolation of a galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus *Morchella esculenta*. *J Agric Food Chem* 2002;25(20):5683–5.
- Ono L, Wollinger W, Rocco I, Coimbra T, Gorin P, Sierakowski R. *In vitro* and *in vivo* antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). *Antivir Res* 2003;60(3):201–8.

- [21] Correa J, Bernal H. Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello. *SECAB* 1990;3:231–6.
- [22] Cerqueira M, Pinheiro A, Souza B, et al. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. *Carbohydr Polym* 2009;75:408–14.
- [23] Sittikijyothin W, Torres D, Gonçalves M. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. *Carbohydr Polym* 2005;59:339–50.
- [24] Roncero V. Obtención de una secuencia "TCF" con la aplicación de ozono y enzimas, para el blanqueo de pastas madereras y de origen agrícola. Optimización de la etapa Z. Universidad Politécnica de Cataluña: Análisis de los efectos en la fibra celulósica y sus componentes; 2001.
- [25] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3(6):1101–8.
- [26] Waksmunda-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T. Thin layer chromatography in phytochemistry. CRC Press Taylor Francis Group 2008:267–73.
- [27] Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: Downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;182(2):389–400.
- [28] Türeci O, Bian H, Nestle F, et al. Cascades of transcriptional induction during dendritic cell maturation revealed by genome wide expression analysis. *FASEB J* 2003;17(8):836–47.
- [29] Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 2009;15(10):1170–8.
- [30] Baccala R, Gonzalez-Quintal R, Lawson B, et al. Sensors of the innate immune system: Their mode of action. *Nat Rev Rheumatol* 2009;5(8):448–56.
- [31] Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6(4):232–41.
- [32] Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28(9):465–72.
- [33] Sheng K, Pouniotis D, Wright M, et al. Mannan derivatives induce phenotypic and functional maturation of mouse dendritic cells. *Immunology* 2006;118(3):372–83.
- [34] Aymeric L, Apetoh L, Ghiringhelli F, et al. Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Res* 2010;70(3):855–8.
- [35] Van Herreweghe F, Festjens N, Declercq W, Vandenabeele P. Tumor necrosis factor-mediated cell death: To break or to burst, that's the question. *Cell Mol Life Sci* 2010;67(10):1567–79.
- [36] Kawai T, Akira S. Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther* 2005;7(1):12–9.
- [37] Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: Dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 2000;164(11):5564–74.
- [38] Fan J, Kapus A, Marsden P, et al. Regulation of Toll-like receptor 4 expression in the lung following hemorrhagic shock and lipopolysaccharide. *J Immunol* 2002;168(10):5252–9.
- [39] Hsu T, Cheng S, Yang W, et al. Profiling carbohydrate-receptor interaction with recombinant innate immunity receptor-Fc fusion proteins. *J Biol Chem* 2009;284(50):34479–89.
- [40] Wan Y. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology* 2010;130(2):166–71.
- [41] Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: Impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 2000;1(4):311–6.
- [42] Apte S, Groves P, Olver S, et al. IFN-gamma inhibits IL-4-induced type 2 cytokine expression by CD8 T cells in vivo and modulates the anti-tumor response. *J Immunol* 2010;185(2):998–1004.
- [43] Mosser D, Zhang X. Interleukin-10: New perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 2008;226:205–18.
- [44] Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol* 2001;166(7):4312–8.
- [45] Ramesh HP, Yamaki K, Tsushida T. Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. *Carbohydr Polym* 2002;50:79–83.

**Immunomodulatory effects of aqueous and organic fractions from *Petiveria alliacea*
on human dendritic cells**

Sandra Paola Santander ¹, John Fredy Hernández ¹, Claudia Cifuentes C²,
Aoki M³, Moins-Teisserenc H³⁻⁴ and Susana Fiorentino ¹

¹Immunology and Cellular Biology Group, Faculty of Sciences, Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, Colombia. ²Department of Biochemistry, Faculty of Sciences. Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, Colombia. ³INSERM, U940, Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris Diderot. ⁴Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (AP–HP), Hôpital Saint-Louis, Paris, France.

Corresponding autor: Susana Fiorentino PhD.

E-mail: susana.fiorentino@javeriana.edu.co; Postal address: Carrera 7 No. 43-82 Ed. 53 Of. 608, Bogotá, Colombia; Tel 571-3208320 Ext. 4149-4103; Fax 571-3208320 Ext. 4021

Pages 16, Figures 3, Tables 3.

Abstract

Petiveria alliacea is a plant traditionally known for its anti-inflammatory and anti-tumor activities; however, the molecular and cellular mechanisms explaining its immunomodulatory properties are still unknown. Dendritic cells (DC) promote adaptive immune response by activating T lymphocytes, inducing an effector response or tolerance depending on the DC differentiation level. Herein, we evaluated the immunomodulatory

activity of aqueous and organic plant fractions from *P. alliaceae* using human monocyte-derived dendritic cells. The phenotype, cytokine secretion and gene expression were estimated after treatment with the plant fractions. We found that *P. alliaceae* aqueous fraction induces morphological changes and co-stimulatory expression of CD86, indicating partial DC maturation. In addition, pro-inflammatory cytokines as IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, and TNF α were secreted. The fraction also increased NF κ B gene expression while down-regulating TGF β gene. These results suggest that the aqueous fraction can induce partial DC activation, a situation that can be relevant in tolerance induction. It is important to state that the organic fraction by itself does not show any immunomodulatory activity. This study provides evidence for possible immunomodulatory activity of *P. alliaceae* extracts which has been used in traditional medicine in Colombia.

Keywords: *Petiveria alliaceae*, Immunomodulation, Dendritic cells, Cytokines, Gene expression

Introduction

Throughout history, plants have been used as a major source of new medicines because of their antitumor and immunomodulatory properties. The plant *Petiveria alliaceae* or anamu grows in the Caribbean, South America, and West Africa (Rosner *et al.*, 2001) and has been used in traditional medicine since the Aztecs for treating several diseases (Queiroz *et al.*, 2000). The plant roots and leaves have been attributed anti-inflammatory, anti-tumor, antispasmodic, antibacterial, and analgesic activities (Lopes-Martins *et al.*, 2002). However, the types of immunomodulation and plant metabolites involved in such activities are not yet fully defined.

It has been reported that a hydro-alcoholic root extract from *P. alliacea* can stimulate the phagocytic activity of mice injected intraperitoneally with *Escherichia coli* (Delavueau *et al.*, 1980). In addition, *P. alliacea* root extracts may also act as chemo protectors as reported in *Listeria monocytogenes* infected mice, inducing natural killer cell activity, IL-2 and IFN γ secretion and an increase in granulocyte and monocyte colony numbers (Queiroz *et al.*, 2000), (Quadros *et al.*, 1999). By contrast, anti-inflammatory activities have been seen in other experimental models with a decrease in granuloma formation and dermatitis in rodents, previously treated with pro-inflammatory agents (Germano *et al.*, 1993). β -sitosterol a compound present in *P. alliacea* extracts inhibits the activity of prostaglandin synthetase, and may therefore contribute to the anti-inflammatory activity (Awad *et al.*, 1996). Dibenzyl trisulphide (DTS) a compound present in *P. alliacea* displays antitumor, anti-inflammatory, antibacterial, and antifungal activities (Webster *et al.*, 2008), with decreasing production of pro-inflammatory cytokines.

Dendritic cells (DCs) can promote immune responses by activating T lymphocytes (Banchereau *et al.*, 2000). DC activation and maturation result in either tolerogenic or effector immune response, depending upon the surroundings signals in which antigen presentation occurs (Banchereau *et al.*, 2000), (Liu *et al.*, 2001), (Steinman *et al.*, 2007), (Théry *et al.*, 2001), (Blanco *et al.*, 2008). Immature DC are highly efficient in capturing antigens, but not as antigen presenting cells, due to the low expression of co-stimulatory molecules as CD86, CD83, CD80 and major histocompatibility complex class II (MHC-II). In addition, they are unable to secrete polarizing cytokines (Lutz *et al.*, 2002). In contrast, mature DCs display low endocytosis activities, but they are efficient antigen presenting cells and secrete pro-inflammatory cytokines (Steinman *et al.*, 2002). However, Lutz *et al.*

identified an intermediate differentiation stage after TNF α activation, in which DCs express co-stimulatory molecules, along with high levels of MHC-II, but are unable to secrete proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-12p70 or TNF α (Lutz *et al.*, 2002).

We examined the potential immunomodulatory activities of two *P. alliacea* fractions; the aqueous fraction (AF), characterized by its high contents in primary metabolites and the organic fraction (OF), rich in secondary metabolites during the maturation process of monocyte-derived DCs (MDDC). Our results show that AF was able to induce partial activation of MDDC with an intermediate maturation profile and preferential secretion of IL-1 β , which may therefore modulate subsequent immune responses.

Materials and Methods

Plant material

The plant material was collected in Viotá (Cundinamarca, Colombia), authenticated by Dr. Antonio Luis Mejía Piñeros from Fundación Universitaria Juan N. Corpas as *Petiveria alliacea* L. by comparing the plant material with a sample of the Colombian National Herbarium, registry number 333406 of August 12, 1991.

Organic fraction extraction

P. alliacea dry ground leaves and stems (300 g) were extracted in Soxhlet (60 °C) with 96% ethanol (1.5 l) during 3 hours (h). The extract was filtered, concentrated under vacuum (175 mbar) until half volume and then flocculated by adding distilled water and heating to 65 °C for 20 minutes (min) with constant shaking. The precipitate was discarded and the supernatant recovered by filtration. In a separation funnel the supernatant was exhaustively

extracted (seven times) with ethyl acetate. The ethyl acetate soluble fraction was named organic fraction (OF). The OF was characterized using HPLC/MS/MS and compounds identified by dereplication were linalool/geranylacetone, 7-demethyl linalool and DTS (Santander *et al.*, 2009).

Aqueous fraction extraction

P. alliacea dry ground leaves and stems (500 g) previously sterilized with ethylene oxide were extracted with 96% ethanol (2.5 l) for 3 days (d). The residue ethanol-insoluble was extracted with distilled water (1 l) at 60 +/- 1 °C for 2 h. The aqueous solution was concentrated under reduced pressure and ethanol (2000 ml, 75%) was added to selectively precipitate polysaccharides and glycoproteins (Ebringerová *et al.*, 2003), corresponding to the fraction enriched in primary metabolites (FAO *et al.*, 1998). The precipitate was recovered by centrifugation at 3500 rpm for 5 min (22 °C), lyophilized and stored at 4 °C. A stock solution was prepared (50 mg/ml) and named aqueous fraction (AF). A preliminary fraction characterization was carried out with colorimetric assays to determine the presence of sugars, tannins, and phenolic compounds. Anthrone and phenol-sulfuric acid assays were used to confirm sugar presence in the sample (Dubois *et al.*, 1956). The protein content was determined by Bradford assay giving a concentration of 927 µg/ml. The presence of glycoproteins was determined with periodic acid– Schiff staining after SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) separation (Masahiro *et al.*, 1999).

Preparation of DCs

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from fresh buffy coats (60 ml) of healthy volunteers, who signed informed consent. Mononuclear cells purification was carried out by Ficoll density gradient centrifugation (Amersham, GE Health Care Europe GmbH). Monocytes were isolated by positive selection using anti-CD14⁺ micro-beads with MiniMACS Systems according to manufacturer instructions (MiltenyiBiotec, BergischGladbach, Germany). The cells used in the assays had more than 98% of purity in accordance to flow cytometry estimations. Monocytes were cultured for 5 days in RPMI 1640 medium, 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin, streptomycin (Eurobio, Paris, France), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (800 IU/ml) and IL-4 (1000 IU/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). On day 3 half of the medium was replaced with fresh media containing GM-CSF and IL-4. On day 5 the MDDCs were stimulated for 2 days with increasing amounts of AF (6, 12.5 and 25 µg/ml) or OF (7, 25, and 63 µg/ml). The assayed concentrations were chosen above and below the IC₅₀ previously calculated on tumor cells K562 (81.58 µg/ml) (Santander et al., 2009). Stimulation with lipopolysaccharide (LPS) was used as a positive control of MDDC stimulation (1 µg/ml). Results with cells cultured with solvents used as fraction eluents were considered as the negative controls. Plant fractions AF and OF were treated with polymyxin B coated agarose beads (Sigma, St Louis, MO, USA) to eliminate any possible LPS contamination (Sigma, St Louis, MO, USA). All reagents were tested for LPS presence using Lymulus spp assay (Bio Whittaker Inc., Walkersville, MD, USA). Normal human mesenchymal cells and fibroblasts were cultured in the presence of increasing concentrations of AF and OF (31.2, 62.5, 125, 250 and 500 µg/ml) to estimate cell cytotoxicity in a trypan blue exclusion test.

Assessment of phenotype changes

MDDC phenotypes were analyzed using the following monoclonal antibodies (mAbs): CD1a- Pacific Blue™, CD86-PE, CD83-FITC, HLA-DR-APC-H7, and CD209-PercP-Cy5 (BD Biosciences, San Jose, CA). Cells were collected and washed in PBS containing 2% FCS and 0.1% sodium azide. For immunostaining treated or untreated MDDCs, cells were incubate with mAbs for 20 min at 4°C. After washing, data acquisition was performed on a FACSAria™ (Becton-Dickinson, Colombia) and analyzed using Flowjo 8.7 software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Measurement of cytokine levels

The production of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, and TNF α was determined from culture supernatants after 24 or 48 h stimulation with either LPS, AF or OF using the Cytometric Bead Array kit of human inflammation (BD Biosciences), according to manufacturer instructions, followed by acquisition data on a FACSCanto II™ flow cytometer with the program Cytometric Bead Array kit (CBA) and FCAP array software (BD Biosciences).

Real-time PCR expression profiling

Total RNA was extracted from unstimulated MDDCs or stimulated with LPS, AF and OF for 24 and 48h using TRIzol reagent (GIBCO) according to manufacturer instructions (Invitrogen). Total RNA was quantified in a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies), and the quality was confirmed by migration in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. cDNA was synthesized with RNA PCR Core using Random hexamers following the manufacturer instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA,

USA). 3 µl of a 1:20 dilution was used for reverse transcription reaction in a real-time PCR quantitative (qPCR) reaction, using 12.5 µl of 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 50 - 400 nM of forward and reverse primers (Table 1) in 25-µl volume. Reactions were performed in 96-well optical plates using an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) and in duplicates. The thermal cycling conditions were previously describe in (Santander *et al.*, 2011).

Results

Determination of the cytotoxicity of the fraction

The potential cytotoxicity of AF evaluated with human mesenchymal cells, using the increasing concentrations detailed above, did not show any deleterious effect on cell viability. Based on these findings, MDDCs viability was confirmed from 6 to 50 µg/ml AF concentrations. However, variations in cell shapes were observed at concentrations below 25 µg/ml, similar to those reported during DC maturation.

The OF cytotoxicity was evaluated on human fibroblasts during 24, 48 and 72 h. Neither morphological alterations nor cytotoxicity was observed at any of the tested concentrations on normal cells. Based on these results, we chose to use fractions at 25 µg/ml.

***P. alliacea* AF increases CD86 (co-stimulatory molecule) expression on MDDC.**

The expression of cell surface molecules on MDDC was evaluated after either AF or OF stimulation and compared to the results obtained with LPS. Results showed that AF increased CD86 expression with no effect on the cell markers (Figure 1). In addition, the

fraction induced morphological changes such as dendrite elongation, a well-known cytoskeletal characteristic of mature DC phenotype, (West *et al.*, 2004), (Mellman *et al.*, 2001) (Figure 2).

OF did not induce the expression of any of the molecules tested and, as expected, no morphological changes were observed, exhibiting a very similar behavior as with ethanol (vehicle) treatment.

***P. alliacea* aqueous fraction increases gene and protein expression of pro-inflammatory cytokines**

To further characterize MDDCs activation state (immunostimulatory or regulatory), we evaluated the cytokine produced by MDDCs matured with AF or OF. Gene expression and/or protein secretion of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF α , TGF β , and NF κ B transcription factor were quantified after 24 or 48 hrs. Our results show that AF is able to induce IL-1 β , IL-6, and TNF α both at the transcript and the levels, with a slight delay compared with cytokine production in the presence of LPS. In addition IL-10 was secreted and detected on the supernatants, while the mRNA levels decrease by 1.7 fold as compared to the control (Figure 3 and Table 2). (The fraction also decreased TGF β by 7.8 fold and an increase NF κ B by 2.9 fold (Table 2). OF showed only minor and not significant changes.

To evaluate if AF induced activity were lasting, MDDC cytokine gene expression and protein secretion were estimated after stimulating for 48 h. Expression of IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α , and IL-12p70 were increased; coinciding with an increase of IL-12 mRNA levels after 24 h of treatment (Table 2).

No differences were found between 24 and 48 h of OF treatment related to cytokine secretion (Figure 3). IL-8 protein secretion levels were evaluated on both fractions and only

AF induced a sustained production during the assessed time (Figure 3). The selected time frame of 24 and 48h was chosen based on previous reports for LPS and some polysaccharides activity over DCs (Ishii K, 2005), (YL Lin, 2006), (Kim J, et al., 2007), (Santander *et al.*, 2007), (Santander *et al.*, 2011).

Discussion

Petiveria alliacea traditional usage is in infusions made from plants. This type of preparation has been suggested to exhibit immunomodulatory activity (Ruffa *et al.*, 2002), (Lopes-Martins *et al.*, 2002). However, the cell target and metabolites involved in this activity have not been clearly identified. Previous studies by our group and others have shown that the plant organic fractions, rich in secondary metabolites are active against tumor cells (Santander *et al.*, 2009), (Urueña *et al.*, 2008), (Cifuentes *et al.*, 2009), (Rosner *et al.*, 2001). In addition, some reports indicate that an hexanol-extract of the plant increases hematopoietic stem cell mobilization from the bone marrow (Quadros *et al.*, 1999). Although, the AF toxicity has been previously studied (Cavalcanti *et al.*, 2008), the immunomodulatory activity has not been evaluated.

In the present work, we observed that human MDDC cultured in the presence of *P. alliacea* aqueous and organic fractions induce distinct responses. The partial increase of CD86 expression by AF suggests an incomplete DC activation and therefore tolerance induction to antigens presented under these conditions (Lutz *et al.*, 2002), (Heath *et al.*, 2004), (Blancoa *et al.*, 2008). However, AF is able to induce an increase of IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-10, and IL-12p70 cytokines at mRNA and protein levels, suggesting that AF could have an

unknown mechanism to activate dendritic cells and that this mechanism induces increased NF κ B.

For several years, it has been proposed that *P. alliacea* antitumor and immune-stimulant activity is due to the presence of dibenzyl trisulfide (DTS) (Rosner *et al.*, 2001). We have previously shown that the organic fraction, partially characterized by our group (Santander *et al.*, 2009), containing DTS, was unable to induce any detectable activity on dendritic cells, suggesting that other metabolites contained in AF could be involved in this activity.

Since the cytokine secretion in human DCs is affected by AF, it can be suggested that *P. alliacea* fraction could influence the cellular microenvironment and modulate the inflammatory immune response. Interestingly, secretion of IL-1 β by DCs has been associated with inflammasome activation, an essential complex for priming CD8⁺ T cells against dying tumor cells, inducing IFN γ secretion (Ghiringhelli and Zitvogel. *et al.*, 2009). This activity could partially explain the *P. alliacea* traditional use as an antitumor agent (Williams *et al.*, 2007).

In general, *P. alliacea* crude extracts are commonly used as anti-inflammatory agents (Germano *et al.*, 1993), activity attributed to Th1-type cytokine production, as TNF α , IL-6, and IL-1 β and to the increase of Th2 cytokines as IL4 (Rossi *et al.*, 1993), (Williams *et al.*, 2002), (Cifuentes *et al.*, 2009), (Urueña *et al.*, 2008). Del Valle (1993) has reported that T lymphocytes treated with a *P. alliacea* ethanolic extract did not induce proliferation but a synergic activity appears when combined with PHA stimulation (Del Valle, 1993). A preclinical study showed that the lyophilized preparation of *P. alliacea* leaves (1200 μ g/ml) has a protector effect on immunosuppressed (5-fluorouracil induced) Balb/c mice

inducing lymphocytosis, neutrophilia and protector effects on B cells, together with an increase of bone marrow cellularity (Batista and Lemuz *et al.*, 2011).

The present work is the first study evaluating a differential immunomodulatory activity of *P. alliacea* fractions on immune system cells and providing relevant information concerning the different biological activities of aqueous and organic fractions. Currently, we are characterizing the AF metabolites and centering our study on primary metabolites as polysaccharides.

Acknowledgments

The authors acknowledge Nuala Mooney for her interesting contributions, the Pontificia Universidad Javeriana Science Faculty and the Fundación Universitaria Juan N. Corpas for their support to the present work and the Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología "Francisco Jose de Caldas" (COLCIENCIAS) Bogotá, Colombia, for the financial support, grant number 324-2007. M.A. post doctoral fellow funded by France Foundation. S.P.S. and J.F.H. are PhD students sponsored by COLCIENCIAS.

Bibliography

Awad, A., Y. Chen, C. Fink and T. Hennessy. Beta-Sitosterol Inhibits Ht-29 Human Colon Cancer Cell Growth and Alters Membrane Lipids. *Anticancer Res.* 16: 2797-2804. 1996.

Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. Liu, B. Pulendran and K. Palucka. Immunobiology of Dendritic Cells. *Ann Rev Immu.* 18: 767-811. 2000.

Batista, A., I. Duarte, L. Urdaneta, M. Colon, J. Esmerido, E. Puente, A. alfonso, H. Castillo, and H.S.a.M. Lemuz. Efecto Protector De Petiveria Alliacea L. (Anamú) Sobre La Inmunosupresión Inducida Por 5-Fluoruracilo En Ratones Balb/C. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 10: 256-264. 2011.

Blanco, P., A. Paluckad, V. Pascuald and J. Banchereaud. Dendritic Cells and Cytokines in Human Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Cytokine Growth Factor Revi*. 19: 41-52. 2008.

Cavalcanti, X., Ensaio Toxicológico Pré-Clinico Com Extrato Bruto Seco Das Folhas De Petiveria Alliacea Linné. *Universidade Federal de Pernambuco*. 104: 2008.

Cifuentes, C., D. Castañeda, C. Urueña and S. Fiorentino. A Fraction from Petiveria Alliacea Induces Apoptosis Via a Mitochondria- Dependent Pathway and Regulates Hsp70 Expression. *Universitas Scien*. 14: 2-3. 2009.

Delavueau, P., P. Lallouette and A. Tessier. Stimulation of the Phagocytic Activity of Reticuloendothelial System by Plant Drugs. *Plan Med*. 40: 49-54. 1980.

Dubois, M., K. Gilles, J. Hamilton, P. Rebers and F. Smith. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem*. 28: 350-356. 1956.

Ebringerová, A., A. Kardošová, Z. Hromádková and V. Hřibalová. Mitogenic and Comitogenic Activities of Polysaccharides from Some European Herbaceous Plants. *Fitoterapia*. 74: 52-61. 2003.

FAO., Carbohydrates in Human Nutrition. 1998.

Germano, D., T. Caldeira, A. Mazella, E. Bachi and J. Sertié. Topical Anti-Inflammatory Activity and Toxicity of Petiveria Alliacea. *Fitoterapia*. 459-462. 1993.

Ghiringhelli, F., L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J. Perfettini, F. Schlemmer, E. Tasdemir, M. Uhl, P. Génin, A. and K.a.L. Zitvogel., Activation of the Nlrp3 Inflammasome in Dendritic Cells Induces Il-1 β -Dependent Adaptive Immunity against Tumors. *Nat Med*. 15: 1170-1179. 2009.

Heath, W., G. Belz, G. Behrens, C. Smith, S. Forehan, I. Parish, G. Davey, N. Wilson, F. Carbone and J. Villadangos. Cross-Presentation Dendritic Cell Subsets, and the Generation of Immunity to Cellular Antigens. *Immunolo Rev*. 199: 9-26. 2004.

Lopes-Martins, R., D. Pegoraro, R. Woisky, S. Penna and J. Sertié. The Anti-Inflammatory and Analgesic Effects of a Crude Extract of Petiveria Alliacea L. (Phytolaccaceae). *Phytomedicine*. 9: 245-248. 2002.

Liu, Y., Dendritic Cell Subsets and Lineages, and Their Functions in Innate and Adaptive Immunity. *Cell*. 106: 259-262. 2001.

Lutz, M.a.G.S., Immature, Semi-Mature and Fully Mature Dendritic Cells: Which Signals Induce Tolerance or Immunity? *Trends Immunol.* 23: 445-449. 2002.

Masahiro, A., F. Yasunori, I. Mami, N. Kazuya, S. Makiko, F. Yasuko, T. Noboru, Y. Yoshimitsu and O. Syuichi. Glycoprotein Derived from the Hot Water Extract of Mint Plant, *Perilla Frutescens* Britton. *J Agric Food Chem.* 47: 468-472. 1999.

Mellman, I.a.R.S., Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines. *Cell.* 106: 255-258. 2001.

Quadros, M., B. Souza and M. Queroz. *Petiveria Alliacea* L Extract Protects Mice against *Listeria Monocytogenes* Infection- Effects on Bone Marrow Progenitor Cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 21: 109-124. 1999.

Queiroz, M., M. Quadros and L. Santos. Cytokine Profile and Natural Killer Cell Activity in *Listeria Monocytogenes* Infected Mice Treated Orally with *Petiveria Alliacea* Extract. *Immunopharmacol and Immunotoxicol.* 22: 501-518. 2000.

Rosner, H., L. Williams, A. Jung and W. Kraus. Disassembly of Microtubules and Inhibition of Neurite Outgrowth, Neuroblastoma Cell Proliferation, and Map Kinase Tyrosine Dephosphorylation by Dibenzyl Trisulphide. *Biochemical Biophys Acta.* 1540: 166-177. 2001.

Rossi, V., S. Marini, L. Jovicevic, S. D'Atri, M. Turri and B. Giardina. Effects of *Petiveria Alliacea* L. On Cell Immunity. *Pharmacol Res Supplement.* 1: 111-112. 1993.

Ruffa, M., M. Perusina, V. Alfonso, M. Wagner, M. Suriano, C. Vicente, R. Campos and L. Cavallaro. Antiviral Activity of *Petiveria Alliacea* against the Bovine Viral Diarrhea Virus. *Chemotherapy.* 48: 144-147. 2002.

Santander, S., A. Cuéllar, C. Thomas, F. Guzmán, A. Gómez, M. López and C. Puerta. Expression of Markers on Dendritic Cells from Chronic Chagasic Patients Stimulated with the Kmp-11 Protein and the K1 Peptide from *Trypanosoma Cruzi*. *Biomedica.* 27: 18-27. 2007.

Santander, S., C. Urueña, D. Castañeda, C. Cifuentes, F. Aristizabal, C. Cordero and S. Fiorentino. Influencia Del Tratamiento De *Petiveria Alliacea* En La Expresión Diferencial De Genes En Células Tumorales. *Universitas Med.* 50: 284-296. 2009.

Santander, S., M. Aoki, J. Hernandez, M. Pombo, H. Moins-Teisserenc, N. Mooney and S. Fiorentino. Galactomannan from *Caesalpinia Spinosa* Induces Phenotypic and Functional Maturation of Human Dendritic Cells. *Inter Immunopharmacol.* 11: 652-660. 2011.

Steinman, R., Dendritic Cells: Understanding Immunogenicity. *Eur J immunol.* 37: 553-560. 2007.

Steinman, R., Exploiting Dendritic Cells to Improve Vaccine Efficacy. *J Clinical Investigation*. 109: 1519-1526. 2002.

Théry, C.a.S.A., The Cell Biology of Antigen Presentation in Dendritic Cells. *Curr Opin Immunol*. 13: 45-51. 2001.

Urueña, C., C.Cifuentes, D. Castañeda, A. Arango, P. Kaur, A. Asea and S. Fiorentino. *Petiveria Alliacea* Extracts Uses Multiple Mechanisms to Inhibit Growth of Human and Mouse Tumoral Cells. *BMC Complement Alternative Medicine*. 8: 60. 2008.

Webster, S., S. Mitchell, W. Gallimore, L. Williams and M. Ahmad. Biosynthesis of Dibenzyl Trisulfide (Dts) from Somatic Embryos and Rhizogenous Embryogenic Callus Derived from Guinea Hen Weed (*Petiveria Alliacea* L.) Leaf Explants. *In Vitro Cellular Develop Biology-Plant*. 44: 112-118. 2008.

West, M., R. Wallin, S. Matthews, H. Svensson, R. Zaru, H. Ljunggren, A. Prescott and C. Watts. Enhanced Dendritic Cell Antigen Capture Via Toll-Like Receptor-Induced Actin Remodeling. *Science*. 305: 1153-1157. 2004.

Williams, L., H. Rosner, H. Levy and E. Barton. A Critical Review of the Therapeutic Potential of Dibenzyl Trisulphide Isolated from *Petiveria Alliacea* L (Guinea Hen Weed, Anamu). *West Indian Med J*. 56: 17-21. 2007.

Williams, L., H. Rosner, J. Conrad, W. Moller, U. Beifuss and K. Chiba. Selected Secondary Metabolites from *Phytolaccaceae* and Their Biological/Pharmaceutical Significance. *Recent Res Develop Phyto*. 6: 13-68. 2002.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *P. alliacea* AF increases CD86 expression in MDDC. MDDCs were stimulated with LPS (1 µg/ml) or AF (25 µg/ml) or OF (25 µg/ml). Histograms represent one of five independent experiments (gray for controls and black for treated samples). The phenotype profiles show an increase in CD86 expression by AF while OF shows no visible effect.

Figure 2. Effect of *P. alliacea* fractions on MDDC morphology. Differences in the morphology of non-stimulated MDDCs or MDDCc treated with LPS (1 µg/ml) or AF (25

µg/ml) or OF (25 µg/ml)) for 48 h. AF induces morphological changes similar to mature MDDC stimulated with LPS.

Figure 3. *P. alliaceae* AF induces pro-inflammatory cytokine secretion. AF induces secretion of IL1β, IL6, IL8, IL10, IL12p70, and TNFα after treatment for 24 and 48h. AF displays similar behavior as LPS stimulation on MDDC, while OF did not show any effect. Each graph represents the mean of three independent experiments. Statistical significance is carryout comparing treated MDDCs and their controls using unpaired T test (* p < 0.05).

TABLE LEGENDS

Table 1. Real-time primer sequences.

Table 2. Gene expression regulation of by *P. alliaceae* fractions. Relative gene expression is calculated by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Data represents the mean of two independent experiments. Statistical significance is carryout comparing treated MDDCs with their controls using unpaired T test (* p < 0.05).

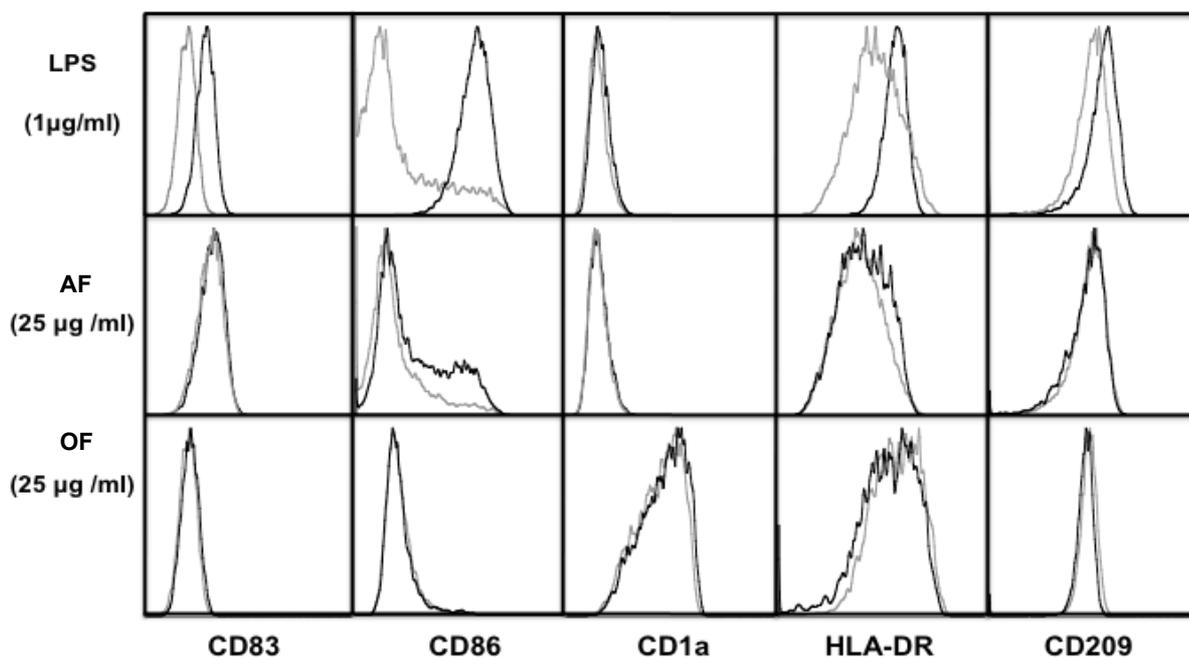


Figure 1.

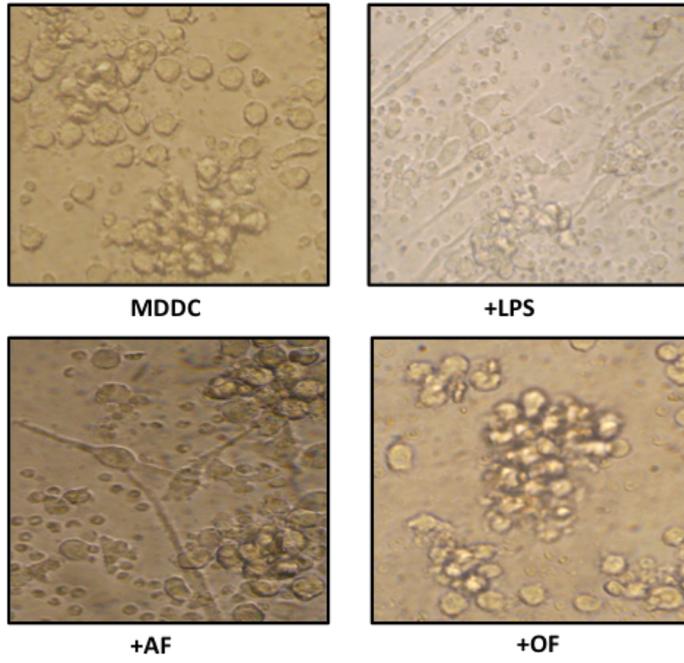


Figure 2.

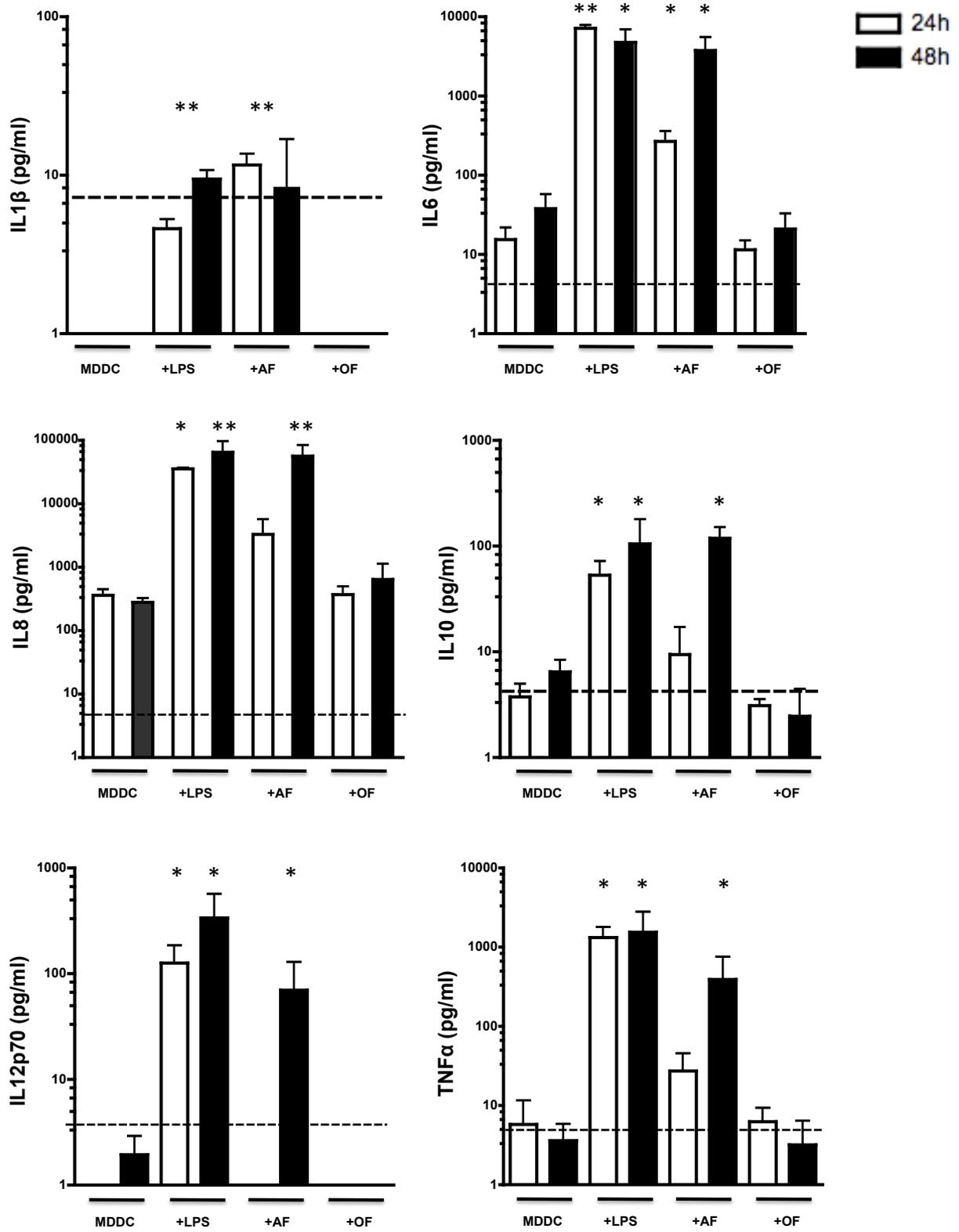


Figure 3.

| | Genes | Forward Primer (5'-3') | Reverse Primer (5'-3') | Size |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------|
| Housekeeping Gene | GAPDH | AGCCGAGCCACATCGCT | CCCTGGTGACCAGGC | 87 |
| Cytokines | IL1-β | ACAGACCTTCCAGGAGAATG | GCAGTTCAGTGATCGTACAG | 127 |
| | IL-6 | AATTCGGTACATCCTCGACGG | GGTTGTTTTCTGCCAGTGCC | 100 |
| | IL-10 | GTGATGCCCCAAGCTGAGA | CACGGCCTTGCTCTTGTTTT | 138 |
| | IL-12p35 | TGGAGTGCCAGGAGGACAGT | TCTTGGGTGGGTCAGGTTTG | 147 |
| | TNFα | TCTTCTCGAACCCCGAGTGA | CCTCTGATGGCACCACCAG | 151 |
| | TGFβ | CAGCAACAATTCCTGGCGATA | AAGGCGAAAGCCCTCAATTT | 136 |
| Transcription factors | NFkB | ATTTGAAACACTGGAAGCACGA | GCGGATTAGCTCTTTTTCCCG | 145 |

Table 1. Real- time primer sequences

| Gene Description | Fold Change | | | | |
|------------------------------|-------------|-------|-------|-------|------|
| | LPS | | AF | | OF |
| | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h |
| Cytokines | | | | | |
| IL-1 β | 4.6 | 3.1 | 3.2 | -2.5 | 3.6 |
| IL-6 | 14.2* | 3.4 | 1.7 | -3.4 | -2.3 |
| IL-10 | -4.6 | -8.2* | -1.3 | -6.2* | -1.8 |
| IL-12p35 | 32.9* | 193* | 5.8* | -1.6 | -1.8 |
| TNF α | 5.5 | 1.7 | 1.4 | -2.4 | 1.5 |
| TGF β | -14.5* | -3.9 | -7.8* | -1.7 | -1.4 |
| Transcription Factors | | | | | |
| NF κ B | 9* | 2.7 | 2.9 | 1.1 | -2 |

Table 2. Gene expression regulation of by *P. alliaceae* fractions. Relative gene expression is calculated by $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Data represents the mean of two independent experiments. Statistical significance is carryout comparing treated MDDCs with their controls using unpaired T test (* $p < 0.05$).

Influencia del tratamiento de *Petiveria alliacea* en la expresión diferencial de genes en células tumorales

SANDRA PAOLA SANTANDER¹

CLAUDIA URUEÑA¹

DIANA CASTAÑEDA¹

CLAUDIA CIFUENTES^{1,2}

FABIO ARISTIZÁBAL³

CLAUDIA CORDERO³

SUSANA FIORENTINO⁴

Resumen

El estudio del perfil de expresión génica en las células eucariotas se constituye como una herramienta importante en el entendimiento de las huellas moleculares generadas en respuesta a un estímulo farmacológico. A partir de *Petiveria alliacea*, una de las plantas colombianas con actividad antitumoral, se ha obtenido la fracción FAST 8 7:3, en la cual se han encontrado diferentes compuestos, como el trisulfuro de dibencilo, uno de los componentes antitumorales más potentes reportados para la planta. Esta fracción también posee actividad citotóxica sobre la línea de células tumorales K562 e induce cambios en el perfil de expresión de genes, que podrían estar relacionados de alguna forma con la actividad antitumoral tradicional reportada para esta planta. Esta actividad puede ser ejercida, en parte, por la presencia del trisulfuro de dibencilo y por la actividad de los otros componentes de la fracción. En este contexto, proponemos el uso del ADNc-AFLP como herramienta útil en la tamización del perfil de genes transcritos en las células tumorales y, también, como herramienta útil para el descubrimiento de nuevos fármacos antitumorales.

Palabras clave: AFLP, *Petiveria alliacea*, expresión diferencial de genes, fármacos antitumorales, productos naturales.

-
- 1 Estudiante de Doctorado en Ciencias Biológicas, Grupo de Inmunobiología y Biología Celular, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.
 - 2 Profesora asistente, Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.
 - 3 Departamento de Farmacia, Grupo de Farmacogenética del Cáncer, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.
 - 4 Directora, Grupo de Inmunobiología y Biología Celular, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

Recibido: 26-01-2009

Revisado: 17-04-2009

Aceptado: 18-06-2009

Title

Differential gene expression in tumor cells induced by *Petiveria alliacea* treatment

Abstract

Gene expression profile in eukaryotic cells is a very useful tool to understand the molecular footprint responsible for the pharmacological response to a stimulus. In the present study a fraction named FAST 8 (7:3), obtained from *Petiveria alliacea*, was used as stimulus to track out the gene expression profile on K562 cell line. *P. alliacea* is a plant that grows in Colombia, and in traditional medicine is used for its anti-tumoral activity. Of the different compounds present in the fraction, dibenzyl trisulfide (DTS), is a compound described by previous reports to have anti-tumoral properties. The fraction exhibits cytotoxic activity over tumor cell line K562 inducing changes in gene expression profile. DTS might be in part responsible for the fraction activity, but the other compounds may also contribute to the biological response. Herein, we propose the use of cDNA-AFLP as a useful tool for gene expression profile screening of tumoral cells and in the discovery of new anti-tumoral drugs.

Key words: AFLP, *Petiveria alliacea*, gene differential expression, antitumor drugs, natural products.

Introducción

Las plantas han sido utilizadas por siglos como fuente de medicina popular para el tratamiento de diferentes enfermedades, pero sólo hasta ahora ese conocimiento tradicional comienza a ser utilizado y estudiado en la medicina moderna, redescubriendo medicamentos para el tratamiento del cáncer. Un ejemplo de ello es el taxol, aislado de la planta *Taxus brevifolia* y caracte-

rizado de manera experimental como fármaco antitumoral, ya que tiene la capacidad de unirse y desestabilizar los microtúbulos de diferentes líneas celulares tumorales[2]. Debido a esta actividad, actualmente es usado en el tratamiento de cáncer de mama y de ovario[3].

En Colombia, existen diferentes plantas que también tienen un inmenso potencial farmacológico y que comienzan a ser estudiadas con el fin de encontrar nuevos productos que puedan utilizarse en la terapia antitumoral; una de ellas es *Petiveria alliacea*, conocida comúnmente como anamú. Esta planta es cultivada en diferentes áreas tropicales con propósitos medicinales[4], como diurético, antiespasmódico, analgésico y antiinflamatorio[5, 6]. Hasta el momento, se han venido realizando diferentes estudios farmacológicos con el fin de descifrar sus propiedades medicinales, las cuales han confirmado su actividad inmunomoduladora[7, 8], antimicótica[9], analgésica, antiinflamatoria[10, 11] y antitumoral[12].

La actividad antitumoral fue inicialmente reportada en las fracciones etanólicas, las cuales inducen citotoxicidad en diferentes líneas de células tumorales[13]. Diversos componentes han sido implicados como responsables de la actividad antitumoral, como el trisulfuro de dibencilo, que ejerce diferentes efectos (antiproliferativos y

citotóxicos) en células del neuroblastoma[12].

Recientemente, nuestro grupo encontró que una fracción no polar de *P. alliacea* induce apoptosis por la vía mitocondrial y disminución de la HSP70, la cual puede ser protectora contra la muerte celular (artículo en preparación). Además, el análisis del proteoma de las células tumorales tratadas con fracciones obtenidas a partir de la purificación con acetato de etilo, ha demostrado un cambio metabólico importante que podría explicar la muerte celular, unido a una actividad sobre el citoesqueleto que induce una detención de las células en la fase G2 del ciclo celular[13].

En la actualidad, el estudio del perfil de la expresión genética en células eucariotas se constituye como una herramienta importante en el entendimiento de las huellas moleculares de una variedad de enfermedades humanas[14] y, también, se utiliza en la identificación de genes expresados por tejidos y células tratadas con diversos agentes farmacológicos[15]. Aunque los mecanismos por los cuales *P. alliacea* ejerce una función antitumoral empiezan a ser estudiados, no sabemos si la expresión diferencial de proteínas[13] corresponde también a una expresión diferencial de genes o si, por el contrario, es el reflejo de un manejo diferencial de las proteínas codificadas naturalmente por la célula.

El estudio de estos mecanismos permitiría diferenciar los blancos moleculares de la planta entre los factores reguladores del procesamiento posterior a la traducción de la degradación intracelular o los reguladores de la expresión génica.

En este contexto, proponemos el uso del ADNc-AFLP basado en el polimorfismo para la longitud de fragmentos amplificados (*amplified fragment length polymorphism*, AFLP) como método de estudio rápido para observar el perfil de transcritos entre poblaciones de ARNm de células tumorales. Este método involucra la transcripción inversa de ARNm a ADNc de doble cadena, seguida por la digestión con una enzima de restricción de amplio rango de corte (EcoRI) y un segundo corte con una enzima dirigida contra secuencias menos frecuentes (MseI). Después de la digestión enzimática, se realiza la ligación de adaptadores específicos sobre el ADNc y el fraccionamiento de esta mezcla se utiliza para la amplificación selectiva por reacción en cadena de la polimerasa (PCR); estos fragmentos se separan después en geles de alta resolución y se tiñen con nitrato de plata[16, 17].

En el presente estudio encontramos que una fracción de *P. alliacea*, a la que denominamos FAST 8 7:3, presenta un compuesto muy citotóxico, previamente identificado en la plan-

ta[18], que induce muerte en la línea tumoral K562, además de generar un cambio en el perfil de expresión de genes determinado por AFLP. Estos hallazgos podrían sugerir que el cambio en el proteoma de las células[13] correspondería a un cambio en la expresión de genes, lo que podría ser el origen de su actividad antitumoral.

Materiales y métodos

Obtención de las fracciones de *Petiveria alliacea*

El material vegetal fue recolectado en Viotá, Cundinamarca, e identificado por el biólogo Antonio Luis Mejía como *P. alliacea*. La planta se comparó con la muestra del Herbario Nacional Colombiano, con número de registro 333406 del 12 de agosto de 1991.

Las hojas secas y los tallos (300 g) fueron extraídos por reflujo (60°C) con 1,5 litros de etanol al 96% por 3 horas. El extracto etanólico fue filtrado y evaporado hasta la mitad de su volumen, a presión reducida de 175 mbars. Se añadió un volumen igual de agua destilada y se calentó a 65°C por 20 minutos con agitación constante para permitir la floculación. El precipitado fue eliminado por filtración (papel Wattman) y la fracción soluble se extrajo con acetato de etilo (EtOAc) exhaustivamente (7 veces), utilizando un embudo de separación.

Análisis de la fracción FAST 8 por HPLC-MS/MS

Para la separación de la fracción, se utilizó una bomba HPLC Alliance 2795 (Waters®, UK) con detector ultravioleta de diodos PDA 996 (Waters®, UK), a las siguientes condiciones: Columna Symmetry (Waters) C18 – 2,1x150 mm – 5 µm + precolumna a 40°C; solventes: solvente A (H₂O + 0,1% HCOOH) y solvente B (CH₃OH + 0,1% HCOOH); gradiente: 0 a 45 minutos de corrido solvente A al 60% y solvente B al 40%; de los 45 a 50 minutos de corrido solvente A al 0% y solvente B al 100%, y de 52 a 65 minutos de corrido solvente A al 60% y solvente B al 40%. Para el análisis de la relación masa/carga (m/z) de los compuestos, se utilizó un espectrómetro de masas con tiempo de vuelo (LCT de MICromass®, UK) y *electrospray*. Los análisis se realizaron en el Instituto de Productos Naturales de Gif sur Yvette, Francia.

Mantenimiento y tratamiento de las células tumorales

Para el estudio se utilizó la línea celular K562 (eritroleucemia humana), obtenida de la American Type Cell Culture (ATCC) Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 con suplemento de suero fetal bovino (SFB) al 10%, 0,01 M de Heps, 100 µg de penicilina, 100 UI de estreptomycin y 2 mM de glutamina (Eurobio,

Francia), en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. La viabilidad de las células se analizó con azul de tripano.

Determinación del efecto citotóxico de la fracción FAST 8 sobre células K562 (IC50)

Para los análisis de citotoxicidad, se cultivaron 5×10^3 células K562 y se trataron con diferentes concentraciones de la fracción FAST 8 (125 a 0,9 µg/ml). Como control negativo, se utilizó etanol al 0,2% y como control positivo se agregaron diferentes concentraciones de vincristina (0,1 a 0,0008 µg/ml), por 48 horas a 37°C. Después del tratamiento, las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio RPMI 1640 con suplemento sin rojo de fenol y se trataron por 4 horas a 37°C con MTT, a una concentración final de 0,25 µg/ml [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Después de la incubación, los cristales de formazán se disolvieron con dimetil-sulfóxido (DMSO) y la absorbancia se determinó a 540 nm en un Multiskan MCC/340 (LabSystems). Finalmente, la concentración inhibitoria 50 se calculó usando un análisis Probit (MINITAB® Release 14.1. Minitab Inc. 2003 Statistical Software).

Obtención del ARNm y síntesis del ADNc

Para los ensayos de AFLP, se trataron 20×10^6 células K562 con 25 µg/ml

de la fracción FAST 8. Después del tratamiento, las células se observaron al microscopio para identificar posibles cambios morfológicos. El ARN total de las células K562 se obtuvo con trizol, siguiendo las recomendaciones del fabricante (GIBCO). Las muestras de ARN se cuantificaron por espectrofotometría y se observaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. El ARNm se aisló a partir del ARN total, utilizando el kit de aislamiento de ARNm PolyATract (Promega).

Para la construcción del ADNc, 1 µg del ARNm se puso en contacto con 50 ng/ml de cebadores aleatorios, 0,5 mM de dNTP, 0,005 M de DDT y 200 U de la enzima SuperScript III, en un volumen final de 20 µl (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo utilizando las siguientes temperaturas: 10 minutos a 25°C, seguida de 50 minutos a 50°C y una reacción terminal de 70°C por 5 minutos. Para la síntesis de la segunda cadena, se utilizaron 5 U de *E. coli* ligasa, 20 U de *E. coli* polimerasa I (New England Biolabs), 200 µM de dNTPs y 1 U de RNasa H (Invitrogen), en un volumen final de 28 µl. La reacción se llevó a cabo por 2 horas a 16°C. La purificación del ADNc de doble cadena se llevó a cabo utilizando fenol:cloroformo:isoamílico en una relación de 25:24:1 (Clontech).

Análisis de ADNc-AFLP

Para los análisis de AFLP, el ADNc de doble cadena se incubó con 0,5 U

de EcoRI y MseI, según las condiciones del fabricante (Invitrogen). Se incubaron 10 µl de los productos de digestión con 5 pmol de los adaptadores para EcoRI y MseI, con el fin de generar secuencias para la amplificación del ADNc. Para las preamplificaciones, se utilizaron cebadores con una base de selección en el extremo 3'. La mezcla utilizada contenía 50 ng de ADNc, 20 µl de la mezcla de iniciadores de preamplificación, PCR solución tampón AFLP 1X y taq polimerasa a 0,04 U/µl, en un volumen final de 25 µl. Con esta mezcla se realizó la PCR, con el siguiente perfil de amplificación: 94°C por 30 segundos (s), 56°C por 60 s y 72°C por 60 s, por 20 ciclos. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Para las amplificaciones selectivas, se utilizaron cebadores, que poseen la misma secuencia de los utilizados en la preamplificación, más tres bases de selección en los extremos 3' (Invitrogen-AFLP analysis system II) (tabla 3).

Análisis del gel

Para observar los cambios en el perfil de expresión de genes, la muestra obtenida de la PCR selectiva se diluyó con 20 µl de una solución de formamida al 98%, EDTA 10 mM, azul de bromofenol y cianol de xileno, la cual fue calentada por 5 minutos a

95°C y colocada en hielo inmediatamente. La muestra se corrió en geles de secuenciación de poliacrilamida al 6% (acrilamida:bisacrilamida 20:1, urea 6 M y solución tampón TBE 1X) y teñidos con nitrato de plata (Invitrogen-AFLPs analysis system II).

Resultados

Obtención y análisis de la composición química del FAST 8

Durante el proceso de purificación del extracto de *P. alliacea*, se obtuvieron tres fracciones denominadas (1:1), (7:3) y (9:1), a las que se les determinó su actividad citotóxica sobre la línea de células tumorales K562. Los resultados obtenidos muestran que la fracción 7:3, llamada FAST 8, induce mayor cambio morfológico y posee mayor actividad citotóxica sobre las células tumorales que las otras fracciones obtenidas para la *P. alliacea* (no se presentan los datos). Por lo tanto, esta fracción fue la seleccionada para continuar con los ensayos biológicos.

Mediante el análisis de la actividad citotóxica, se estableció la concentración a la cual el 50% de las células tumorales se encontraban vivas y el otro 50%, muertas (IC₅₀); se calculó para la fracción y se encontró una concentración correspondiente a 81,58 µg/ml (tabla 1).

Teniendo en cuenta este resultado, se establecieron concentraciones por debajo de la IC50 que nos permitieron observar el efecto de la fracción. Para el trisulfuro de dibencilo, uno de los compuestos reportados y presentes en la fracción, en el 2007, Williams referencia los valores de IC50 en diferentes líneas tumorales como: neuroblastoma SH-SY5Y (0,12 µg/ml), carcinoma mamario MCF7 (0,62 µg/ml) y (1,8 µg/ml), melanoma IPC (0,81 µg/ml), carcinoma primario de mama (5,27 µg/ml), leucemia de células Jurkat (0,09 µg/ml), fibrosarcoma HT1080 (0,53 µg/ml), cáncer de pulmón de células grandes H460 (1,4 µg/ml), mama M231 (0,672 µg/ml) y adenocarcinoma HeLa (0,7 µg/ml).

Al comparar estos valores con los obtenidos para nuestra fracción en la línea K562, encontramos menor actividad citotóxica en la fracción y, aunque el trisulfuro de dibencilo es uno de los compuestos mayoritarios en la misma, ésta posee componentes adi-

cionales que podrían disminuir su toxicidad, pero que también actuarían sobre otros blancos en la célula tumoral.

En el análisis del espectro de masas obtenido para la fracción, se observó la presencia de 14 relaciones masa/carga (m/z). En ellas se encontraron tres compuestos con relaciones de masas 278, 298, y 314, que correspondían a compuestos previamente identificados y reportados para *P. alliacea*, como el trisulfuro de dibencilo[18], 7-demetil leridal y leridal o petiveral, respectivamente[19, 20] (tabla 2).

Tabla 1
IC50 de la fracción de *P. alliacea* FAST 8 7:3 en la línea celular K562. Las células K562 fueron tratadas con diferentes concentraciones de FAST8 7:3 y el IC50 del extracto fue calculado usando un análisis Probit (MINITAB® Release 14.1. Minitab Inc. 2003 Statistical Software)

| | IC50 (µg/ml) | |
|------|--------------|-----------|
| | Vincristina | FAST8 7:3 |
| K562 | 1,07 | 81,58 |

Tabla 2
Caracterización de la fracción FAST 8 por HPLC-MS/MS. La fracción FAST8 fue sometida a un análisis por HPLC-MS/MS para identificar los posibles compuestos presentes en ésta. Para el análisis de la relación masa/carga (m/z) de los compuestos, se utilizó un espectrómetro de masas con tiempo de vuelo (LCT de Micromass®, UK) y *electrospray*

| Tiempo de retención (minutos) | m/z | Compuestos identificados por derreplicación |
|-------------------------------|-----|---|
| 30,65 | 314 | Leridal/petiveral |
| 33,41 | 298 | Leridal 7 demeti |
| 48,36 | 278 | Trisulfuro de dibencilo |

Tabla 3
Cebadores seleccionados para la amplificación selectiva del ADNc de la línea tumoral K562

| | M-CAA | M-CAC | M-CAG | M-CAT | M-CTA | M-CTC |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| E-AAC | √ | √ | √ | √ | √ | √ |

Las relaciones masa/carga (m/z) correspondientes a 238, 281, 294, 308, 316, 330, 344, 514, 530, 676 y 692, no se pudieron correlacionar con ningún compuesto reportado previamente para la planta. El trisulfuro de dibencilo encontrado en el FAST 8 es uno de los compuestos con mayor actividad biológica reportada inmunomoduladora como la actividad citotóxica y la antiproliferativa en líneas de células tumorales –por disminución de la fosforilación de cinasas– y la actividad inmunomoduladora[12, 21, 22]. Para compuestos como el 7-demetil leridal, leridal y petiveral, no se ha reportado ninguna actividad biológica específica.

La fracción FAST 8 induce cambios en el perfil de expresión génica de las células K562

El cultivo de células tumorales en las condiciones empleadas nos permitió conseguir una concentración suficiente de ARN total con la calidad óptima para obtener hasta 1 µg de ARNm. Las condiciones utilizadas para la síntesis de la primera y segunda cadenas de ADNc han sido optimizadas para realizar las respecti-

vas digestiones y ligaciones con los adaptadores blancos de la preamplificación y, por consiguiente, poder realizar las amplificaciones selectivas necesarias para implementar la técnica de ADNc-AFLP.

El análisis de estas amplificaciones con las diferentes combinaciones de cebadores nos ha llevado a encontrar mezclas que permiten obtener un perfil de expresión de diferentes genes en las células K562, que puede ser analizado utilizando la técnica de ADNc-AFLP (tabla 4).

La visualización de estas amplificaciones en los geles de poliacrilamida nos permitió encontrar las combinaciones con las que se puede obtener un perfil de expresión diferencial de genes (figura 1). Por ejemplo, la combinación del iniciador E-AAC y el M-CAC fue la óptima para comparar la expresión de los diferentes genes en las células K562. Como se muestra en la figura 1 (carril 16), se encontraron 21 genes expresados diferencialmente en las células tratadas con la fracción FAST 8, al comparar las células tratadas con el control negativo.

Tabla 4
Combinación de cebadores que amplifican el ADNc y permiten la observación de un perfil de expresión diferencial de genes en las células K562 tratadas con el extracto FAST 8

| | M-CAA | M-CACM-CAGM-CAT | | | M-CTA | M-CTC | | |
|-------------------|---------------|-----------------|----|---|-------|-------|----|---|
| | E-AAC | √ | √ | √ | x | √ | √ | √ |
| Bandas observadas | Nuevas | 10 | 21 | 5 | 9 | 14 | 21 | |
| | Aumentadas | | 3 | 0 | 5 | 1 | 5 | 2 |
| | Disminuidas | 4 | 4 | 0 | 0 | 2 | 1 | |
| | No expresadas | 7 | 3 | 0 | 7 | 15 | 6 | |

x: no recomendado

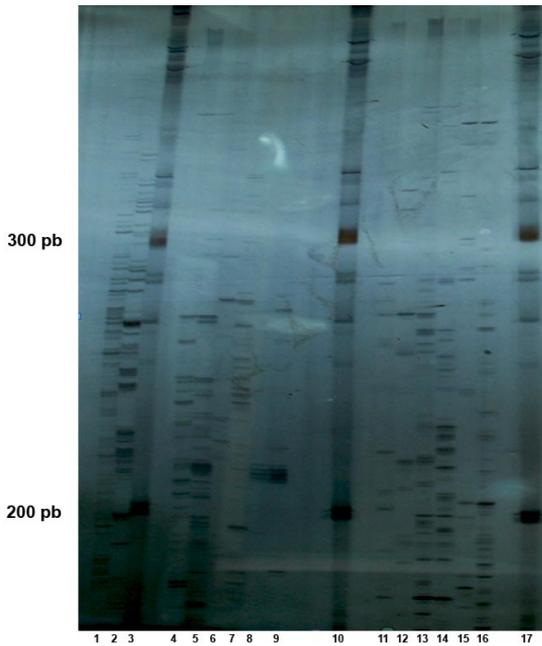


Figura 1. Análisis de la expresión diferencial de genes por ADNc-AFLP en las células tumorales K562 tratadas con el extracto FAST 8 de *Petiveria alliacea*. Las células tumorales K562 fueron tratadas por 24 horas con 25 µg/ml del extracto FAST 8 obtenido de *Petiveria alliacea*. Las amplificaciones selectivas se realizaron utilizando la siguiente combinación de cebadores: M-CAA, K562 tratadas con el solvente (KS) (línea 4) y K562 tratadas con FAST 8 (KFAST8) (línea 5); M-CAC, KS (línea 6) y KFAST8 (línea 7); M-CAG, KS (línea 8) y KFAST8 (línea 9); M-CAT, KS (línea 11) y KFAST8 (línea 12); M-CTA, KS (línea 13) y KFAST8 (línea 14); M-CTC (línea 15) y KFAST8 (línea 16). Control positivo: ADN tomate digerido con EcoR I con el cebador M-CAA (línea 1), M-CAC (línea 2); marcador de peso molecular (línea 3, 10 y 17).

La identificación de los genes expresados diferencialmente está siendo evaluada por nosotros actualmente; sin embargo, ésta es la primera demostración de que un extracto de *P. alliacea*, utilizada tradicionalmente para el tratamiento de algunas enfermedades como el cáncer, actúa sobre la célula tumoral induciendo cambios genéticos que pueden atribuirse a la presencia de uno de los compuestos encontrados en esta fracción, como lo es el trisulfuro de dibencilo, considerado principal componente activo lipofílico de la *P. alliacea*[18].

Conclusiones

Petiveria alliacea, comúnmente utilizada en la medicina tradicional en América, el Caribe, Estados Unidos y África, es una de las plantas con mayor potencial farmacológico en nuestro país y a nivel mundial, ya que ha sido seleccionada entre 14.000 extractos de plantas como una de las 34 candidatas con potencial antitumoral por la Universidad de Illinois[23].

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el extracto completo de la *P. alliacea* obtenido en nuestro laboratorio, presenta actividad citotóxica en la células K562 y contiene tres compuestos, con masas de 278, 298, y 314, que corresponden a compuestos previamente identificados y reportados para *P. alliacea*, como trisulfuro de dibencilo[18], 7-demetil

leridal y el leridal o petiveral, respectivamente[19, 20].

El trisulfuro de dibencilo se considera el principal compuesto activo contra el cáncer, presente en la planta, ya que su mecanismo de acción ha sido estudiado en diferentes células tumorales, entre ellas las de neuroblastoma, en las que se ha observado disminución en la defosforilación de las MAPcinasas y, también, desestabilización de la forma normal en la que se encuentran los microtúbulos del citoesqueleto, sin afectar la dinámica de la actina, pero inhibiendo la proliferación de las células[12]. El trisulfuro de dibencilo también posee actividad citotóxica sobre líneas tumorales como las del sarcoma TE671, el carcinoma mamario MCF-7, el melanoma IPC, el carcinoma primario de vejiga 5637 y el cáncer de pulmón[22].

En cuanto la expresión de genes, también se ha encontrado que el trisulfuro de dibencilo puede regular positivamente la expresión de E-caderina en células de neuroblastoma SH-SY5Y_{TRK-A} tratadas previamente con factor de crecimiento nervioso (NgF)[25]. La molécula de adhesión celular E-caderina es un componente primordial en la interacción célula-célula y se encuentra notablemente ausente o disfuncional en muchos de los carcinomas epiteliales o de mama más agresivos, indiferenciados y avanzados; la pérdida de esta molécula se ha

visto relacionada de manera importante en la transición de tumores epiteliales benignos a estados invasivos[26]. Por lo tanto, como se reporta, el trisulfuro de dibencilo tiene diferentes blancos citotóxicos en las células tumorales, no sólo por su acción directa a nivel de microtúbulos, sino también, a nivel molecular al inducir la expresión de genes importantes relacionados con el estado invasivo de la célula tumoral.

La demostración de la existencia de una expresión diferencial de genes por las células tumorales tratadas con la fracción FAST 8, sugiere la actividad específica del extracto de la planta sobre la línea celular K562. La identificación de los genes que se encuentran regulados positiva o negativamente, nos permitirá dilucidar los blancos moleculares específicos por los que *P. alliacea* induce su actividad antitumoral.

La validación de la actividad biológica de la planta sentará las bases científicas del conocimiento tradicional y, asimismo, conducirá al desarrollo de nuevos medicamentos derivados de productos naturales que podrán ser utilizados en la terapia antitumoral o como adyuvantes de la terapia convencional.

Agradecimientos

Agradecemos la valiosa colaboración de la doctora Pilar Márquez y Gina Paola Solano de la unidad de

Biotecnología Vegetal. Pontificia Universidad Javeriana.

Fuente de financiación

Este trabajo fue parcialmente financiado por la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana y la Fundación Terry Fox. Sandra Paola Santander y Claudia Urueña son becarias del programa de doctorado de Colciencias.

Bibliografía

1. Schiff PB, Horwitz SB. *Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells*. Proc Natl Acad Sci USA. 1980;77:1561-5.
2. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature*. 1979;22:277:665-7.
3. Jordan MA. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2002;2:1-17.
4. Girón LM, Freire V, Alonzo A, Cáceres A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *J Ethnopharmacol*. 1991;34:173-87.
5. Di Stasi LC, Oliveira GP, Carvalhaes MA, Queiroz M Jr., Tien OS, Kakinami SH, *et al*. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia*. 2002;73:69-91.
6. Caraballo A, Caraballo B, Rodríguez-Acosta A. Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the southeastern Venezuelan Ama-

- zon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004; 37:186-8.
7. Marini S, Jovicevic L, Milanese C, Giardina B, Tentori L, Leone M, *et al.* Effects of *Petiveria alliacea* L. on cytokine production and natural killer cell activity. Italian Society of Pharmacology. Congress N° 6, Rome, Italy. 1993;27:107-8.
 8. Queiroz M, Quadros M, Santos L. Cytokine profile and natural killer cell activity in *Listeria monocytogenes* infected mice treated orally with *Petiveria alliacea* extract. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2000;22: 501-18.
 9. Malpezzi EL, Davino SC, Costa LV, Freitas JC, Giesbrecht AM, Roque NF. Antimitotic action of extracts of *Petiveria alliacea* on sea urchin egg development. *Braz J Med Biol Res.* 1994;27:749-54.
 10. Germano D, Sertie J, Bacchi M. Pharmacological assay of *Petiveria alliacea*. II: Oral anti-inflammatory activity and gastrotoxicity of a hydroalcoholic root extract. *Fitoterapia.* 1995;66:195-202.
 11. Lopes-Martins RA, Pegoraro DH, Woisky R, Penna SC, Sertie JA. The anti-inflammatory and analgesic effects of a crude extract of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae). *Phytomedicine.* 2002;9:245-8.
 12. Rösner H, Williams LA, Jung A, Kraus W. Disassembly of microtubules and inhibition of neurite outgrowth, neuroblastoma cell proliferation, and MAP kinase tyrosine dephosphorylation by dibenzyl trisulphide. *Biochim Biophys Acta.* 2001;22:166-77.
 13. Uruena CP, Cifuentes C, Castañeda DM, Arango AD, Kaur P, Asea AA, *et al.* *Petiveria alliacea* extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. *BMC Complement Altern Med.* 2008; 8:60.
 14. Mazzanti C, Zeiger MA, Costouros NG, Umbricht C, Westra WH, Smith D, *et al.* Using gene expression profiling to differentiate benign versus malignant thyroid tumors. *Cancer Res.* 2004; 64:5028.
 15. Holzbeierlein J, Lal P, LaTulippe E, Smith A, Satagopan J, Zhang L, *et al.* Gene expression analysis of human prostate carcinoma during hormonal therapy identifies androgen-responsive genes and mechanisms of therapy resistance. *Am J Pathol.* 2004; 164:217-27.
 16. Breyne P, Dreesen R, Vandepoele K, De Veylder L, Van Breusegem F, Callewaert L, *et al.* Transcriptome analysis during cell division in plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99: 14825-30.
 17. Breyne P, Dreesen R, Cannoot B, Rombaut D, Vandepoele K, Rombauts S, *et al.* Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Mol Genet Genomics.* 2003; 269:173-9.
 18. Kubec R, Musah R. Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry.* 2001;58:981-5.
 19. Delle Monache C. 6-formyl and 6-C-hydroxymethyl flavones from *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry.* 1992;31: 2481-2.
 20. Delle Monache C. *Petiveria alliacea* II: Further flavonoids and triterpenes. *Gazzeta Chimica Italiana.* 1996; 126:275-7.

21. Williams L, Gardner T, Fletcher C, Naravane A, Gibbs N, Fleishhacker R. Immunomodulatory activities of *Petiveria alliacea* L. *Phytother Res.* 1997;11:1251-3.
22. Williams L, Rosner H, Levy G, Barton N. A critical review of the therapeutic potential of dibenzyl trisulphide isolated from *Petiveria alliacea* L (Guinea hen weed, anamu). *West Indian Med J.* 2007;56:17-21.
23. Mata-Greenwood E, Ito A, Westenburg H, Cui B, Mehta RG, Kinghorn AD, et al. Discovery of novel inducers of cellular differentiation using HL-60 promyelocytic cells. *Anticancer Res.* 2001;21:1763.
24. Williams L, Rosner H, Moller W, Conrad J, Nkurunziza J, Kraus W. *In vitro* anti-proliferation/cytotoxic activity of sixty natural products on the human SH-SY5Y neuroblastoma cells with specific reference to dibenzyl trisulphide. *West Indian Med J.* 2004;53:208-19.
25. Williams LAD, Rosner H, Conrad J, Moller W, Beifuss U, Chiba K. Selected secondary metabolites from phytolaccaceae and their biological/pharmaceutical significance. *Recent Res Devel in Phytochem.* 2002; 6:13-68.
26. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson S. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cell induces cell migration, invasion and metastasis. *J Cell Biol.* 2000; 148:779-90.
27. Williams L, Rosner H, Levy H, Barton N. A critical review of the therapeutic potential of dibenzyl trisulphide isolated from *Petiveria alliacea* L (Guinea hen weed, anamu). *West Indian Med J.* 2007;56:17.