

TESIS DOCTORAL  
RESPUESTA ALÓGENICA INDUCIDA POR  
CÉLULAS DENDRÍTICAS  
PLASMACITOIDES  
MARÍA DEL MAR NARANJO GÓMEZ

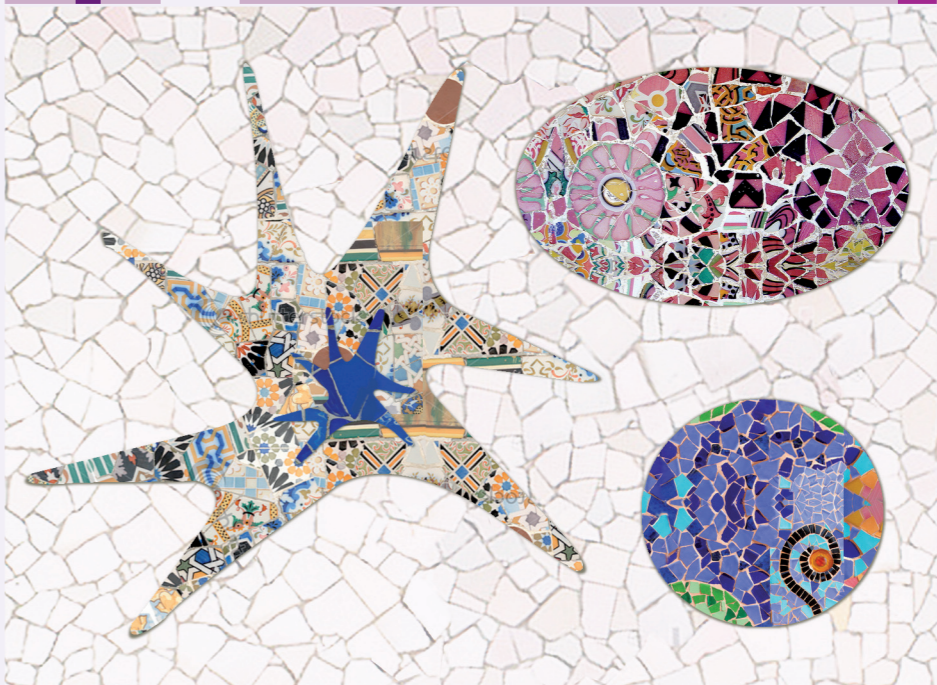
BANC DE SANG I TEIXITS (BST)  
INSTITUT D' INVESTIGACIÓ  
GERMANS TRIAS I PUJOL  
DEPARTAMENT DE BIOLÒGIA  
CEL·LULAR, FISIOLÒGIA I IMMUNOLÒGIA  
UNIVERSITAT AUTÒNOMA  
DE BARCELONA,  
2009

TESIS DOCTORAL 2009

MARÍA DEL MAR NARANJO GÓMEZ

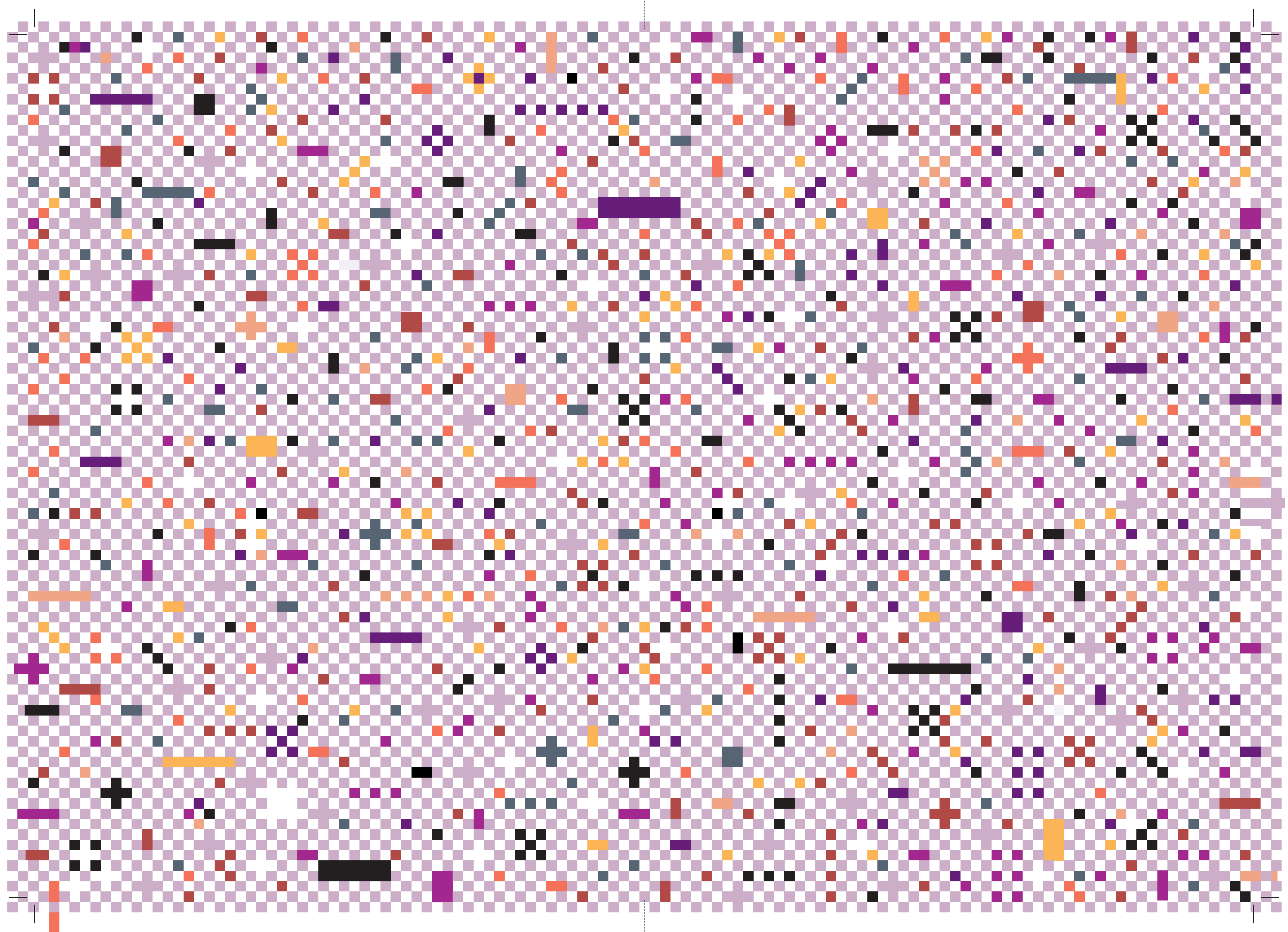
TESIS DOCTORAL

RESPUESTA ALÓGENICA INDUCIDA POR  
CÉLULAS DENDRÍTICAS  
PLASMACITOIDES



MARÍA DEL MAR NARANJO GÓMEZ

DIRECTOR: FRANCESC E. BORRÀS SERRES







Diseño de portada: **Berta Hernández**, comunicació gràfica - [www.bertahernandez.net](http://www.bertahernandez.net)

Diseño interior y maquetación: María del Mar Naranjo Gómez

Esta tesis ha sido financiada por el "Fondo de Investigaciones Sanitarias" a través de la concesión de ayudas con expedientes FIS 01/3120 y FIS 03/0142. La doctoranda ha percibido ayudas de la Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca de la Generalitat de Catalunya a través de la beca 2006 BE-2 00155 (programa: "Beques per a estades per a la recerca fora de Catalunya"); del "Fondo de Investigaciones Sanitarias" (FIS 03/0142) y del *Banc de Sang i Teixits* (BST).

La impresión de esta tesis ha sido posible gracias a las ayudas económicas de la UAB.



Universitat Autònoma de Barcelona  
Facultat de Ciències  
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Programa de Doctorat en Immunologia

**RESPUESTA ALOGÉNICA INDUCIDA POR CÉLULAS  
DENDRÍTICAS PLASMACITOIDES.  
Factores implicados en su activación**

Autora: María del Mar Naranjo Gómez

Director: Francesc E. Borràs Serres

Memoria de la Tesis presentada para la obtención del grado de Doctor en  
Inmunología por la Universitat Autònoma de Barcelona

Tesis Doctoral, Julio 2009







Departament de Biologia Cel·lular,  
Fisiologia i Immunologia

Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol

Universitat Autònoma de Barcelona

Ctra. del Canyet s/n  
08916 Badalona  
Telf. 34.497.86.66  
Fax. 34.497.86.68  
e-mail:

[feborras.liradbst.germanstrias@gencat.cat](mailto:feborras.liradbst.germanstrias@gencat.cat)

Laboratori d'Immunologia per a  
la Recerca i Aplicacions  
Diagnòstiques (LIRAD)

Banc de Sang i Teixits (BST)



Laboratoris d'Immunologia  
i Diagnòstic Molecular - LIRAD  
BANC DE SANG I TEIXITS



Institut d'Investigació  
Germans Trias i Pujol

Francesc E. Borràs Serres, Investigador Biomèdic en la Unitat de Immunologia LIRAD-BST de l'Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol

Certifica:

Que la tesis titulada: "Respuesta alogénica inducida por células dendríticas plasmacitoides. Factores implicados en su activación" ha sido realizada por M. Mar Naranjo Gómez bajo su dirección, en la Unitat d'Immunologia LIRAD-Banc de Sang i Teixits (BST) de l'Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol. Y que es apta para ser presentada y optar al grado de Doctor en Immunología por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que quede constancia firma la presente certificación a Badalona, 8 de Junio del 2009.

Director,

Dr. Francesc E. Borràs Serres



VISTES AL MAR

(fragment)

[...]

El cel ben serè,  
torna el mar més blau,  
d'un blau que enamora  
al migdia clar:  
entre els pins me'l miro...

Dues coses hi ha  
que el mirar-les juntes  
em fa el cor més gran:  
la verdor dels pins,  
la blavor del mar.

[...]

*JOAN MARAGALL*

(Barcelona 1860–1911)

A les Dra Montse Batlle i Susana Vives

13 d'Agost del 2008



TESIS DOCTORAL

RESPUESTA ALÓGENICA INDUCIDA POR  
CELULAS DENDRITICAS  
PLASMACITOIDES

MARÍA DEL MAR NARANJO GÓMEZ



### A

AIRE: *Autoimmune Regulator*

APCs: *Antigen Presenting Cells*

ATP: *Adenosine Triphosphate*

AZA: azatioprina

### B

BDCA: *Blood Dendritic Cell Antigen*

### C

cDCs: *Conventional Dendritic Cells*

CD40L: CD40 Ligando (CD154)

CLRs: *C-type Lectin Receptors*

CMKLR1: *Chemokine-like receptor 1* (también denominado ChemR23)

col.: colaboradores

CpG: *Cytosine linked to a Guanine by a phosphate bond*

CpG-A ODN: ODN containing a CpG motif with bases linked by phosphodiester bonds

CpG-B ODN: ODN containing a CpG motif with bases linked by phosphorothioate bonds

CsA: ciclosporina

CTLA-4: *Cytotoxic T lymphocyte-associated 4*

## Abreviaturas

---

### D

DAMPs: *Damage-Associated Molecular Pattern molecules*

DCs: *Dendritic Cells*, células dendríticas

DCIR: *Dendritic Cell Immunoreceptor*

DC-SING: *DC-Specific Intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin*

DNA: ácido desoxiribonucleico

### E

ER: Endoplasmic Reticulum

### F

FasL: Fas Ligando

FK506: tacrolimus

Flt3L: *FMS-related tyrosine kinase 3 ligand*

Foxp3: *Forkhead Box Protein 3*

### G

GC: glucocorticoides

G-CSF: *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*

GL: ganglio linfático

GM-CSF: *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*



### H

HEV: *High Endothelial Venule*

HLA-DR: *Human Leukocyte Antigen -DR (HLA class II)*

HMGB1: *High-Mobility Group Box 1 protein*

Hsps: *Heat Shock Proteins*

### I

ICOSL: *Inducible Costimulator Ligand*

IDO: *indoleamine 2,3-dioxygenase*

IFNs I: interferones de tipo I (IFN  $\alpha/\beta$ )

IFN- $\gamma$ : Interferón gamma

Igs: inmunoglobulinas

IL: Interleuquina

ILT: *Inhibitory Immunoglobulin-Like Transcript*

IntDC: células intersticiales

IPC: *Interferon Producing Cells*

IRF: *Interferon-Regulatory Factor*

IS: inmunosupresores

### L

LCs: células de Langerhans

LOX-1: *Lectin-like Oxidized low-density lipoprotein receptor-1*

LP: lamina propia

## Abreviaturas

---

LPS: lipopolisacárido bacteriano

### M

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

M-CSF: *Macrophage Colony-Stimulating Factor*

MDDCs: *Monocyte Derived Dendritic cells*

MHC: *Major Histocompatibility Complex*

MICL: *Myeloid Inhibitory C-type Lectin Receptor*

mlr: mixed leukocyte reaction

MMF: *Mycophenolate mofetil*

mRNA: RNA mensajero

### N

NK: *Natural Killer*

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

NLRs: receptores tipo Nod

### O

ODN: *Oligodeoxynucleotides*

### P

PAMPs: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

pDCs: *Plasmacytoid Dendritic Cells*

PD-L: *Programmed Death Ligand*

PGE2: prostaglandina E2

p-MHC: complejo: péptido-MHC

PP: placa de Peyer

PRRs: *Pattern Recognition Receptors*

### R

RAGE: *Receptor for Advanced Glycation End products*

RAPA: rapamicina

RIG I: *RIG-I-like receptors*

RNA: Ácido ribonucleico

### S

STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*

### T

TAP: *Transporter associated with Antigen Presentation*

TGF: *Transforming Growth Factor*

Th: Linfocitos T *helper*

TLRs: *Toll-like Receptors*, receptores tipo Toll

TNF: *Tumour Necrosis Factor*

Treg: linfocitos T reguladores

TSLP: *Thymic Stromal Lymphopoietin*



# SUMARIO

Abreviaturas	
Resumen.....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>1. SISTEMA INMUNITARIO Y RESPUESTA INMUNE</b>	<b>3</b>
<b>2. LA CÉLULA DENDRÍTICA (DC)</b>	<b>5</b>
2.1 GENERALIDADES.....	5
2.2 SUBTIPOS DE DCS.....	8
2.2.1 cDCs/ mDCs	11-14
2.2.1.1 Morfología	
2.2.1.2 Fenotipo	
2.2.1.3 Función	
2.2.2 pDCs	14-20
2.2.2.1 Morfología	
2.2.2.2 Fenotipo	
2.2.2.3 Función	
<b>3. FUNCIONES DE LAS DCs</b>	<b>20</b>
3.1 CAPTURA Y PROCESAMIENTO.....	22
3.1.1 Captura del antígeno	22-23
3.1.2 Procesamiento y presentación del antígeno	
3.1.2.1 Vía clásica (MHC)	24-25
3.1.2.2 Vía no clásica (CD1)	25

3.2 MIGRACIÓN .....	25
3.3 ACTIVACIÓN Y MADURACIÓN.....	26
3.3.1 Tipos de estímulos	
3.3.1.1 Moléculas derivadas de microorganismos	
3.3.1.1.1 Toll-like Receptors	30
3.3.1.1.2 Receptores lectina tipo C	32
3.3.1.1.3 NLRs	33
3.3.1.1.4 Otros receptores	34
3.3.1.2 Citocinas proinflamatorias	34
3.3.1.3 Señales de peligro	41
3.3.1.4 Señalización CD40-CD40L	43
3.3.2 Combinación de estímulos	44
3.3.3 Tiempo de activación	45
<b>4. INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA Y LA TOLERANCIA INMUNOLÓGICA MEDIADA POR DCS</b>	<b>46</b>
4.1 COORDINACIÓN ENTRE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA INNATO Y LOS COMPONENTES DEL SISTEMA ADAPTATIVO .....	46
4.2 ACTIVACIÓN DE LOS EFECTORES ADAPTATIVOS.....	48
4.2.1 Linfocitos T	48
4.2.1.1 Respuesta inducida en linfocitos T alogénicos	52
4.2.1.2 Inhibición farmacológica de la respuesta inmune. Los inmunosupresores	54

4.3 TOLERANCIA INMUNOLÓGICA.....	58
4.3.1. Las DCs y la tolerancia inmunológica	
4.3.1.1 Tolerancia central	59
4.3.1.2 Tolerancia periférica	60
<b>2. HIPÓTESIS y OBJETIVOS.....</b>	<b>65</b>
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
Resultados I.....	71
<b>Primary Alloproliferative TH1 Response Induced by Immature Plasmacytoid Dendritic Cells in Collaboration with Myeloid DCs.</b>	
<u>M. Naranjo-Gómez</u> , M.A. Fernández, M. Bofill, R. Singh, C.V. Navarrete, R. Pujol-Borrell and F.E. Borràs. American Journal of Transplantation 2005; 5: 2838-2848	
Resultados II.....	73
<b>Expression and function of the IL-2 receptor in activated human plasmacytoid dendritic cells.</b>	
<u>Mar Naranjo-Gómez</u> , Harold Oliva, Nuria Climent, Marco A. Fernández, Marta Ruiz-Riol, Margarita Bofill, José M. Gatell, Teresa Gallart, Ricardo Pujol-Borrell and Francesc E. Borràs. Eur. J. Immunol. 2007. 37: 1764-1772	
Resultados III.....	75
<b>Tacrolimus treatment of plasmacytoid dendritic cells inhibits dinucleotide (CpG-)-induced tumour necrosis factor-alpha secretion</b>	
<u>Mar Naranjo-Gómez</u> , Nuria Climent, Joan Cos, Harold Oliva, Margarita Bofill, José M. Gatell, Teresa Gallart, Ricardo Pujol-Borrell and Francesc E. Borràs. Immunology, 119, 488-498	
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>

6. BIBLIOGRAFÍA.....	95
7. PUBLICACIONES.....	125
8. AGRADECIMIENTOS.....	127







## RESUMEN

**L**as células dendríticas (*Dendritic Cells*, DCs) tienen como misión principal la captura, el procesamiento y la presentación de antígenos a los linfocitos T. Constituyen una población celular heterogénea de la que en sangre periférica se distinguen dos subtipos mayoritarios: células dendríticas convencionales (cDCs) y células dendríticas plasmacitoides (pDCs). Ambos subtipos celulares están implicados en el inicio de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa.

El papel que los distintos subtipos de células dendríticas juegan en la respuesta a los aloantígenos, como modelo de respuesta inmune, no está bien definido. Experimentos *in vitro* han demostrado repetidamente que las cDCs son capaces de inducir una potente respuesta proliferativa en los linfocitos T. Sin embargo, las pDCs sólo muestran una gran capacidad estimuladora tras su activación.

Nuestra hipótesis inicial de trabajo considera que en la generación de una respuesta inmune fisiológica intervienen los dos subtipos mayoritarios de células dendríticas (cDC y pDC): la cDC lleva a cabo la captura y presentación de antígenos, mientras que la pDC puede colaborar en la generación de la respuesta inmune.

Utilizando como modelo *in vitro* la respuesta alogénica, los resultados obtenidos sugieren que la cooperación de cDCs y pDCs juega un papel determinante en la magnitud y el fenotipo de la respuesta T generando una respuesta del tipo Th1 con una mayor producción de IFN- $\gamma$  (si se compara a las cDCs como únicas células presentadoras de antígeno) (*Antigen Presenting Cells*, APCs). Hemos comprobado también que la supervivencia y la maduración inducidas en las pDCs son relevantes para la obtención de la respuesta T generada. En este sentido, los factores claves implicados sobre la biología de las pDCs serían, principalmente, la interleuquina 3 (IL-3) y el CD40L. También hemos descrito, por primera vez, que la IL-2 influye directamente sobre distintos aspectos celulares de las pDCs como son la viabilidad, el fenotipo y la secreción de citocinas. Finalmente, hemos determinado el efecto del tacrolimus o FK506 (agente inmunosupresor), ampliamente utilizado tanto para trasplante como para diversas situaciones patológicas, sobre las pDCs.





# INTRODUCCIÓN



## 1. SISTEMA INMUNITARIO Y RESPUESTA INMUNE

**E**l sistema inmunitario está formado por un conjunto de tejidos, células y moléculas cuya función principal es la protección del organismo contra agentes infecciosos como son los hongos, las bacterias y los virus. Para hacer frente a la amplia variedad de patógenos, el sistema inmunitario ha desarrollado múltiples mecanismos que persiguen una eliminación eficaz y específica de los agentes infecciosos, sin alterar la homeostasis del individuo y preservando “lo propio”. El conjunto de mecanismos y procesos encaminados a mantener esta función se engloba con el término de respuesta inmunitaria. Esta respuesta se basa principalmente en la capacidad del sistema inmunitario de reconocer señales de peligro y reaccionar en consecuencia. La respuesta inmunitaria puede clasificarse en función de distintos criterios. Quizás el más ampliamente aceptado distingue entre la respuesta inmunitaria innata o antígeno inespecífica y la respuesta inmune adaptativa o antígeno-específica [1, 2]. Cada tipo de respuesta tiene sus características esenciales, y comprenden tanto elementos celulares como factores solubles.

La respuesta innata tiene como función elemental el rápido reconocimiento de patógenos y/o tejidos dañados y la señalización de la presencia de señales de peligro a las células de respuesta adaptativa [3]. La respuesta innata está mediada por componentes celulares como son las células fagocíticas y las células asesinas (*natural killer*: NK), así como factores solubles como son el complemento y los interferones de tipo I (IFNs I). Las células de la respuesta innata utilizan una gran variedad de receptores de reconocimiento de patrones (por ejemplo: *Toll-like Receptors*, TLRs). Estos patrones corresponden a determinadas estructuras que se repiten entre los distintos patógenos y que se han conservado a lo largo de la evolución. Algunos ejemplos son el lipopolisacárido bacteriano (LPS), determinados carbohidratos (cadenas que contienen residuos de manosa), y la doble cadena de RNA viral [4]. Las células que desarrollan la respuesta innata desempeñan un papel esencial en la iniciación y subsiguiente dirección de las respuestas inmunitarias adaptativas.

La respuesta adaptativa es altamente específica. Cada linfocito posee receptores de antígeno con una única especificidad. Ésta se genera por selección clonal de los linfocitos antígeno-específicos y el reordenamiento de los genes de la familia de las inmunoglobulinas, permitiendo la creación de una amplia diversidad de clones antígeno-específicos. Otro fundamento imprescindible en la respuesta adaptativa es la memoria inmunológica. Ésta garantiza una respuesta más rápida y efectiva en un segundo encuentro con el mismo tipo de patógeno, y por lo tanto facilita una inmunidad protectora de larga duración, siendo pues una de las consecuencias biológicas más importantes del desarrollo de la inmunidad adaptativa. Los efectores de este tipo de respuesta son los linfocitos B y T. De modo muy resumido, los linfocitos T, especialmente aquellos que han recibido la estimulación, generan señales de activación que determinan la respuesta inmune. Existen dos tipos principales de linfocitos T efectores: células CD8+ o linfocitos T citotóxicos, y los CD4+ o linfocitos T colaboradores (T *helper*, Th). Clásicamente, estos últimos se subdividen en Th1 o Th2 en función del estímulo recibido y del patrón de citocinas secretado. Así, se define una respuesta del tipo Th1, cuando los linfocitos T CD4+ producen principalmente IFN- $\gamma$  e IL-2 y favorecen una respuesta inmune celular. Por el contrario, una respuesta del tipo Th2 se caracteriza por la secreción de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, y en la que se promueve una fuerte respuesta mediada por anticuerpos. Las células polarizadas a Th1 o Th2 no sólo producen un perfil de citocinas distinto, sino también muestran una expresión diferencial de marcadores de activación [5, 6].

Sin embargo, recientemente a esta taxonomía clásica de subtipos de linfocitos CD4 deben incorporarse otros perfiles funcionales distintos, como son los linfocitos T reguladores (Treg) [7] y los linfocitos Th17 [8].

Por lo que al primer grupo se refiere, su misión principal es el mantenimiento de la homeostasis y de la tolerancia inmunológica. Este grupo de linfocitos engloba un gran número de tipos celulares distintos. En primer lugar, los denominados linfocitos T reguladores naturales (CD4+CD25+Foxp3+), cuyo origen es tímico. En segundo lugar, los linfocitos T que adquieren esta propiedad de regulación del sistema inmune en periferia. Destacamos de este segundo grupo, los Tr1 (hallados en



la mucosa intestinal y caracterizados por la producción de IL-10 y TGF- $\beta$ ) y los Th3 (gran productores de TGF- $\beta$  y relacionados con la tolerancia oral). Pero además, no sólo los linfocitos CD4 tienen propiedades reguladoras sino que otro tipo de linfocitos T muestran dichas funciones (por ejemplo, células supresoras T CD8+, linfocitos NKT, células T CD4-CD8- y linfocitos T  $\gamma\delta$ ).

Respecto al segundo tipo de linfocito T a tener en cuenta, Th17, destacar su implicación en la eliminación de patógenos durante las infecciones y la inducción de inflamación en enfermedades autoinmunes. Se caracterizan por la producción de IL-17, IL-17F, IL-22 e IL-21; sus factores de transcripción son STAT3, ROR $\gamma$ t y ROR $\alpha$ ; los factores que promueven su diferenciación son TGF- $\beta$  más IL-6 o IL-21; y la IL-23 promueve su crecimiento y estabilización.

Para que tenga lugar una respuesta inmunitaria adaptativa es necesario que las células presentadoras de antígeno (APCs) ejerzan su función sobre los linfocitos T. Así, las APCs deben presentar los antígenos procesados a través de la vía clásica, en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), o la vía no clásica a través de la familia CD1. Dentro del grupo de células presentadoras de antígeno distinguimos dos grandes grupos: células APCs “no-profesionales” en el que se incluyen los linfocitos B, los monocitos, los macrófagos y las células endoteliales; y células APCs “profesionales” constituido por las células dendríticas (DCs).

## 2. LA CÉLULA DENDRÍTICA (DC)

### 2.1 GENERALIDADES

**P**aul Langerhans, en 1868, describió por primera vez a las DCs, asumiendo que eran células nerviosas cutáneas. Después de más de 100 años, en 1973, R. Steinman y Z. Cohn describieron la existencia de una célula distinta a las que hasta el momento habían sido observadas y que presentaba una morfología particular que

la caracterizaba. Por este motivo, a este tipo celular lo denominaron células dendríticas [9]. Después de un periodo intenso de estudio (finales de los 70 principios de los 80), establecieron el papel de estas células en la regulación de la respuesta inmune [10, 11]. Actualmente, las DCs constituyen un sistema integrado de células presentadoras que controlan tanto la inmunidad como la tolerancia inmunológica.

Las células dendríticas se generan a partir de precursores de médula ósea y tienen la capacidad tanto de iniciar como de modular las respuestas inmunes dependiendo de las señales recibidas por parte de los microorganismos como del microambiente y ambiente celular que las rodea [12, 13]. Ello permite al sistema inmune distintas respuestas cualitativas dependiendo del tipo de infección microbiana. Debido a su morfología particular, gracias a la presencia de unas largas prolongaciones citoplasmáticas denominadas dendritas, poseen una gran capacidad de movimiento así como también la capacidad de interactuar con los efectores tanto de la respuesta inmune innata: células NK [14-16] y NKT [17, 18], como también con las células de la respuesta inmune adaptativa, como son los linfocitos T [12, 19, 20] y los linfocitos B [21-23]. Las DCs fueron descritas como las mejores células presentadoras de antígeno, ya que presentan una mayor eficacia para estimular a los linfocitos T además de la capacidad exclusiva para activar plenamente e inducir la expansión clonal de linfocitos T naive [10].

Se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos de distintos órganos [24, 25] particularmente en aquellas zonas de interfase con el medio externo (la piel y las mucosas) [25] representando el 1-2% del total de células. El sistema de DCs está compuesto por distintos subtipos celulares que expresan diferentes receptores microbianos [26], distintas moléculas en superficie [27-29], así como un perfil de citocinas propio [30, 31] (Tabla 1 y Figura 1).

Tabla 1. Principales subtipos de DCs humanas

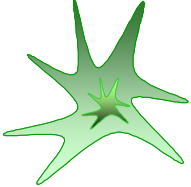
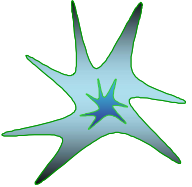

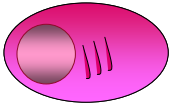
	DCs Langerhans	DCs dermales intersticiales	DCs convencionales	DCs plasmacitoides
Principales subtipos de DCs humanas				
Lectinas tipo C	Langerina	DC-SIGN Receptor de manosa	(DC-SIGN) (Receptor de manosa)	BDCA-2
Moléculas específicas	CD11c CD1a E-cadherina	CD11c CD1a/CD14 CD11b CD36 Factor XIIIa	CD11c	CD123 ILT7
Receptores tipo Toll (TLRs)	TLR1, 2, 3, 6, (7), (10)	TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, (7), 8, 10	TLR1, 6, 7, 9, 10

Tabla 1. Subtipos de DCs humanas *in vivo*. Existen dos subtipos de cDCs en la piel (LC: células de Langerhans Cells y IntDC: células intersticiales), localizadas en dos estratos dérmicos distintos. Además, en sangre periférica coexisten dos subtipos mayoritarios de DCs (cDCs o mDCs y pDCs). Estos subtipos de DCs muestran un perfil diferencial de receptores microbianos (CLR, receptores lectina tipo C; TLR, receptores tipo Toll) y una expresión específica de moléculas.

En la periferia, las DCs actúan como centinelas capturando los antígenos que son procesados y transformados en péptidos que son presentados en el contexto de las moléculas de MHC de clase I (MHC I) y MHC II (expresión constitutiva) para ser reconocidos por los linfocitos T CD8 y CD4, respectivamente. De forma que, las APCs presentan los antígenos exógenos en moléculas MHC II, mientras que los de origen endógeno (componentes propios o los producidos como consecuencia de una infección viral) lo son en moléculas MHC I. Sin embargo, en las DCs existen evidencias claras de la presentación de péptidos de origen exógeno en moléculas MHC I. Este

fenómeno se conoce como presentación cruzada (*cross-presentation*) y es de gran importancia en el caso de respuestas a agentes infecciosos que no infectan propiamente a las APCs.

La activación de las DCs es fundamental para el inicio de la inmunidad adaptativa porque hace de puente entre los eventos que ocurren en periferia, encuentro con patógenos, y la activación y expansión de linfocitos T antígeno-específicos que tiene lugar en los órganos linfoides secundarios. Las DCs dirigen las respuestas T frente a patógenos gracias a la presentación de antígenos unidos a moléculas de MHC y a la expresión de moléculas de coestimulación como son CD40, CD80 y CD86, entre otras. Además, las citocinas secretadas por las DCs proporcionan señales adicionales que determinan el resultado de las interacciones DC-linfocitos T.

Es importante señalar que el sistema de células dendríticas presenta una gran plasticidad funcional. Esta plasticidad funcional viene determinada por la diversidad de las respuestas inducidas: Th1, Th2, Th3 [31] o Th17 [8] en función del estímulo recibido y también por la capacidad de inducir tolerancia periférica [32] a través de distintos mecanismos.

## 2.2 SUBTIPOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

**E** l sistema de DCs está compuesto por varios subtipos de células con distintas funciones [33]. Existen numerosas razones para pensar en un sistema de DCs especializado. Por ejemplo, los requisitos para hacer frente a una infección viral probablemente no son los mismos que aquellos que se necesitan para eliminar bacterias, hongos y parásitos. Del mismo modo, la activación de linfocitos T difiere de la de los linfocitos B, así como los requisitos para la inducción de inmunidad deben diferir de aquellos para la inducción de tolerancia. Sin embargo, esta especialización sólo se pone de manifiesto para el reconocimiento de patógenos (Tabla 1) ya que se ha demostrado una cierta plasticidad y flexibilidad a nivel funcional [34, 35].

*In vivo*, pueden identificarse varios tipos de células dendríticas en base a sus progenitores, distribución tisular, y a los marcadores de superficie que expresan [25, 33, 36]. En condiciones fisiológicas, las DCs se encuentran tanto en tejidos periféricos como en órganos linfoides. Los subtipos de DCs también circulan por el torrente sanguíneo. Esta heterogeneidad se ha puesto de manifiesto especialmente en las DCs murinas, gracias a la relativa accesibilidad de sus distintos tejidos linfoides (bazo, ganglios linfáticos, timo) y a la identificación de la expresión de marcadores de superficie (Tabla 2). Así marcadores comunes como el CD4 y el CD8 han servido de herramientas fundamentales para la clasificación de los subtipos de DCs murinas [37].

Tabla 2. Principales subtipos de DCs murinas

Principales subtipos de DCs murinas	CD8 $\alpha$ + CD11b -	CD8 $\alpha$ - CD11b +	pDC	DC Langerhans	DC Dermoales	CD8 $\alpha$ - CD11b -	DC derivadas monocito
<b>Fenotipo</b>	CD11c +++ CD8 $\alpha$ + CD11b - DEC205 + CD4 -	CD11c +++ CD8 $\alpha$ - CD11b + DEC205 - CD4 +(subtipo)	CD11c ++ CD8 $\alpha$ +/- CD11b - B220 + Gr-1 +	CD11c +++ CD8 $\alpha$ - DEC205 +++ Langerina +	CD11c +++ CD8 $\alpha$ - CD11b + DEC205 +	CD11c +++ CD8 $\alpha$ - CD11b - DEC205 + CD4 -	CD11c ++ CD8 $\alpha$ - CD11b + DEC205 + CD4 -
<b>Órgano</b>	Bazo, GL, PP, LP, GL mesentéricos	Bazo, GL, PP, LP, GL mesentéricos	Bazo, GL, PP, LP (?), GL mesentéricos	Epitelio de la piel, GL, GL mesentéricos	Dermis, GL	PP	Bazo inflamado, GL
<b>Localización</b>	Áreas zonas T	Z. marginales (bazo), sinus subcapsular (GL), bóveda epitelial (PP)	Zonas marginales (bazo), áreas T (GL)	Epitelio de la piel, áreas T (GL)	Dermis, áreas T (GL)	PP	Bazo inflamado, GL
<b>Citocinas</b>	IL-12p70 alta IL-10 baja	IL-12p70 baja IL-10 alta	IFN $\alpha$ (excepto PP)	?	?	IL-12p70 alta IL-10 baja	?
<b>Respuesta T-helper</b>	Th1 (excepto en LP)	Th2 (LP: Th17)	Th1 o Treg	Th1	?	?	?

GL: ganglio linfático; PP: placa de Peyer; LP: lamina propia. (*Current Opinion in Immunology*, 2008)

En cambio, los trabajos realizados sobre los subtipos de DCs humanos se han restringido, principalmente, a sangre periférica. En el hombre, aproximadamente el 0,1% de las células mononucleares de sangre periférica son DCs.

En base a la expresión del marcador mielóide CD11c se han identificado dos subtipos mayoritarios de DCs conocidos como células dendríticas convencionales o mieloides CD11c+ (cDCs o mDCs) y las células dendríticas plasmacitoides CD11c- (pDCs) [26-28]. Ambos subtipos se encuentran tanto en sangre periférica de adulto como en sangre de cordón umbilical [38] y presentan un patrón diferencial de citocinas [29] y de receptores de quimiocinas [39], una distinta localización microambiental, un diferente potencial de migración [40] así como también un perfil diferenciador en la expresión de otros marcadores de superficie entre los que destacan los receptores para el reconocimiento de moléculas relacionadas con los patógenos [41] (Tabla1 y Figura 1).

Figura 1. Subtipos mayoritarios de DCs humanas obtenidos de sangre periférica

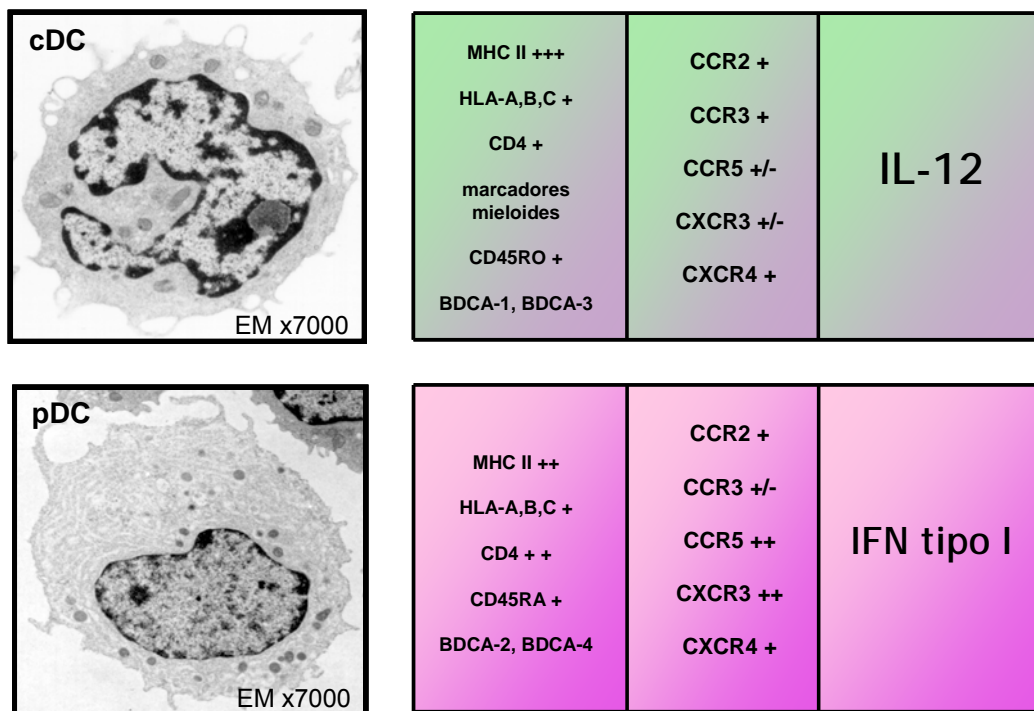



Figura 1. Subtipos de DCs humanas en sangre periférica. Existen dos subtipos mayoritarios de DCs (cDCs o mDCs y pDCs). Estos subtipos de DCs muestran un perfil diferencial de marcadores en superficie (panel izquierdo); una expresión específica de receptores de quimiocinas (panel central); así como, un patrón diferencial de citocinas (panel derecho). Microscopía electrónica x7000 (Gómez y col. *Tissue Antigens* 2004; 63(2):149-57)

Los métodos para la detección y purificación de DCs humanas frescas se basaban clásicamente en un criterio inmunofenotípico que incluía la presencia de moléculas HLA-DR y la ausencia de marcadores específicos de linaje incluyendo el CD3 típico de linfocitos T, ni de B (CD19, CD20), ni de NK (CD56), así como tampoco de monocitos (CD14) [42-44]. Sin embargo, se han descrito nuevos marcadores de células dendríticas que permiten una cuantificación [45] y caracterización más específica de distintos subtipos de DCs en sangre periférica (*Blood Dendritic Cell Antigen*; BDCA-1, BDCA-2, BDCA-3, BDCA-4) [46, 47].

A pesar del enorme progreso conseguido, nuestro conocimiento acerca de la biología de las DCs *in vivo* se ha visto limitado por la escasez que dicha población celular representa. Este hecho se ha intentado substituir con el uso de potentes factores de crecimiento *in vivo* de las DCs como son Flt3L, GM-CSF y G-CSF [48-51] así como la obtención *in vitro* de DCs a partir de distintas fuentes celulares que sirven como progenitores de dichas células [52]. Flt3L aparece como el principal factor que regula la homeostasis de las DCs en un estado de reposo ya que potencia la generación de cDCs y pDCs tanto *in vivo* [48, 51] como *in vitro* [53, 54].

### 2.2.1 DC convencionales (cDC)

 *in vivo*, podemos encontrar cDCs en al menos tres compartimentos: residentes en tejidos periféricos, en órganos linfoides secundarios y en sangre periférica.

En la piel, se pueden distinguir dos tipos de cDCs: las células de Langerhans (LCs) que residen en la epidermis; mientras que las DCs intersticiales se encuentran en la dermis [55]. Ambos subtipos presentan un patrón diferencial a nivel fenotípico [56], quimiotáctico [57] y funcional [29, 58] (Tabla 1). La mayoría de estudios realizados con los subtipos de cDCs residentes en tejidos periféricos se han llevado a cabo con DCs generadas *in vitro* [59, 60]; y los resultados obtenidos concuerdan con los hallazgos observados *in vivo* [61].

Las DCs residentes en órganos linfoides secundarios capturan antígenos microbianos rápidamente y, tras estimulación a través de los receptores que reconocen patrones específicos (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs), inducen la proliferación y la secreción de IL-2 de linfocitos T antígeno-específicos [62]. No sólo están implicadas en la inducción de la inmunidad; sino que también, en la tolerancia inmunológica a través de la captura y presentación de antígenos propios en ausencia de señales de peligro o inflamación.

Las cDC representan del 0.09-0.44% de los leucocitos de sangre periférica en humanos. El papel fisiológico de las cDCs de sangre periférica está poco claro. Podrían representar un reservorio de precursores celulares que migrarían a los tejidos para reestablecer la población de DCs. De hecho, están capacitadas para transportar los antígenos capturados, desde la periferia a los órganos linfoides secundarios (Figura 2).

Además, las cDCs están íntimamente relacionadas con los monocitos. Por ejemplo, cuando los monocitos se cultivan *in vitro* con GM-CSF y IL-4 generan células dendríticas mieloides [63, 64] (células dendríticas derivadas de monocitos, *Monocyte Derived Dendritic cells*, MDDC). Y por el contrario, mDC inmaduras si se cultivan con M-CSF se diferencian a fenotipo macrófago [65]. Sin embargo, existen algunas diferencias fenotípicas (CD1a específico para MDDCs) [66, 67] y funcionales [67-69] entre las cDCs obtenidas de sangre periférica y las MDDCs. Destacar que nuestro trabajo se centra en las cDCs obtenidas en sangre periférica.

#### 2.2.1.1 Morfología

Las cDCs muestran una morfología similar a los monocitos. Presentan un contorno celular irregular, con un núcleo hiperlobulado (ver Figura 3, panel A). Las imágenes de microscopía electrónica de cDCs de sangre periférica ponen de manifiesto que estas células poseen grandes procesos citoplasmáticos, un retículo endoplasmático escaso y numerosas mitocondrias (ver Figura 3, panel B).



Figura 2. Esquema del ciclo vital de las DCs (cDCs y pDCs)

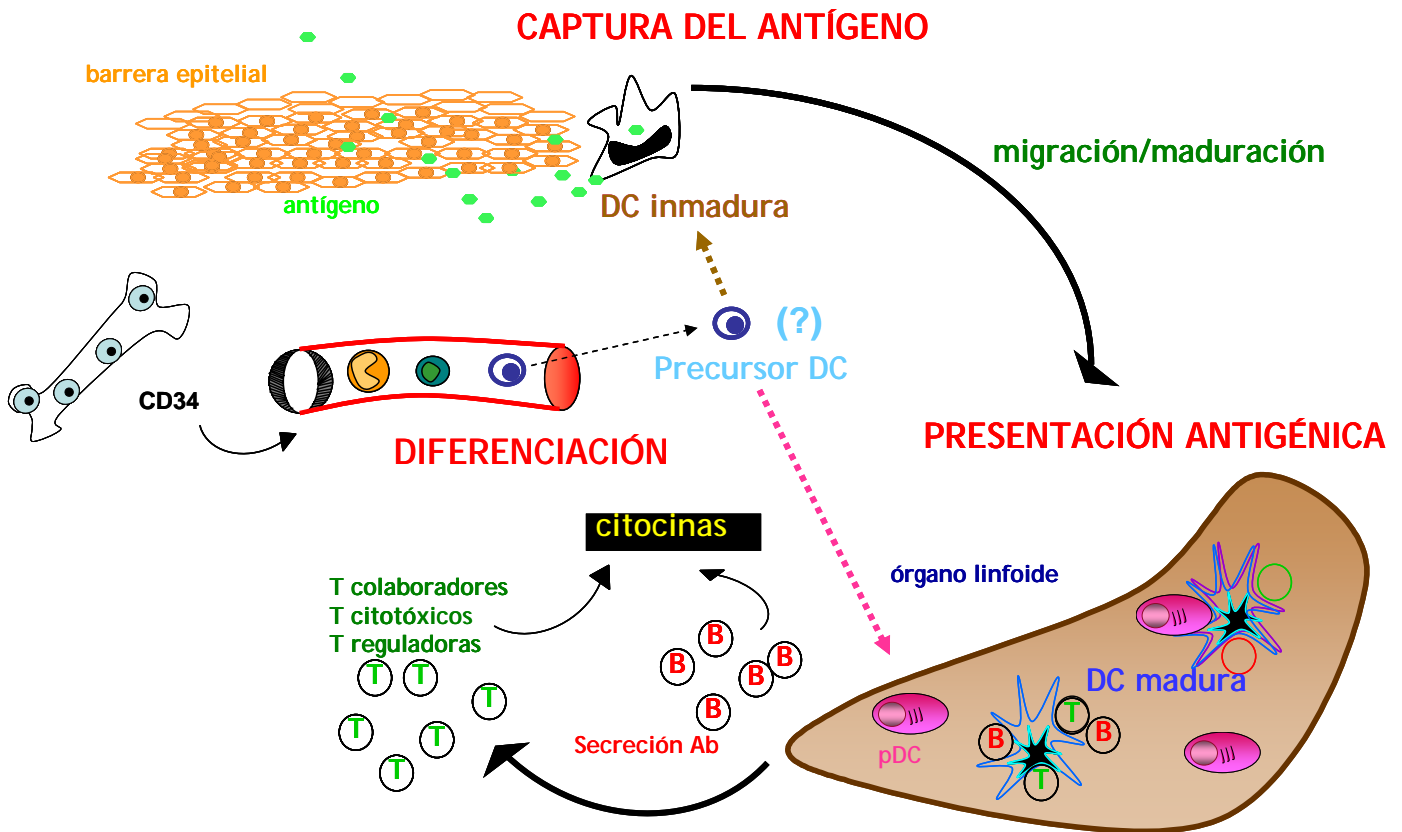


Figura 2. Ciclo vital de cDCs y pDCs. Las etapas del desarrollo de las DCs comprenden la diferenciación celular, la captura del antígeno en superficie (cDCs), la migración y la presentación antigénica. Las cDCs que se encuentran en la periferia se dirigen a los órganos linfoides secundarios donde se llevará a cabo la presentación antigénica gracias a la acción cooperativa de ambos subtipos de DCs (donde previamente las pDCs han migrado directamente). (adaptación de *Journal of Clinical Immunology*, 2005)

### 2.2.1.2 Fenotipo

Las cDCs de sangre periférica expresan marcadores mieloides como son CD13, CD33 y la integrina  $\beta 2$  (CD11c), el transcrito del receptor inhibitor tipo-Tg 1 (ILT-1) y bajos niveles de CD123 [70]. Además expresan CD45RO así como receptores para los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas (CD32, CD64 y Fc $\epsilon$ RI) (Figura 1).

Referente a los BDCAs, se han descrito dos marcadores que distinguen dos subpoblaciones de cDCs: el BDCA1+ que se expresa en una subpoblación mayoritaria de cDCs caracterizadas por la elevada expresión de CD11c y un nivel medio de CD123 (mDC1); y el BDCA3+ que representa una pequeña subpoblación de células mieloides CD11c+ CD123- (mDC2). Pero además, se incluye un tercer subtipo de células dendríticas mieloides que se distingue por su expresión de CD16 [66, 71, 72]. Este último subtipo sólo se encuentra en sangre periférica [73] y espontáneamente se convierten en células dendríticas maduras cuando se cultivan *in vitro* incluso en ausencia de la adición de factores exógenos.

#### 2.2.1.3 Función

Como se ha indicado anteriormente, la capacidad de las DCs para estimular células T depende en gran medida de los niveles de las moléculas coestimuladoras (como son el CD80 o B7.1 y el CD86 o B7.2) así como de la secreción de una gran variedad de citocinas [74-76]. Las cDCs aisladas de sangre periférica presentan elevados niveles de MHC, una expresión moderada de moléculas coestimuladoras y son potentes aloestimuladoras [27] (**Figura 1**). Durante su maduración, en respuesta a un estímulo patogénico, estas células producen grandes cantidades de IL-12 (**Figura 1**), promoviendo básicamente una respuesta del tipo Th1 y el desarrollo de linfocitos T citotóxicos. La IL-12 media la activación de linfocitos T a través de efectos directos sobre su proliferación y por la inducción de citocinas como el IFN- $\gamma$ . Sin embargo, otros factores (prostaglandina E2, PGE2; IL-10) podrían favorecer la diferenciación de cDC a células maduras inductoras de una respuesta Th2 [77].

#### 2.2.2 DC plasmacitoides (pDC)

**L**as células dendríticas plasmacitoides representan del 0.09%-0.37% del total de leucocitos en sangre periférica de humanos. Originalmente, fueron descritas por los patólogos como células T plasmacitoides o como monocitos plasmacitoides.

Las pDCs expresan selectivamente los receptores de reconocimiento de patrones del tipo Toll (Toll-like receptor)-7 y 9, y están especializadas en una secreción masiva y rápida de interferones de tipo I (interferón  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ) en respuesta a un amplio abanico de patógenos [78-81] (Tabla 1 y Figura 1). Las células productoras de interferones de tipo I (*Interferon Producing Cells*, IPC) pueden promover la función de otras células del sistema inmune como son las NK [82, 83], los linfocitos B [84, 85] y T [86], y las cDCs [87] a través, entre otros, de estos interferones. Tras una infección viral, las pDCs se diferencian en un único tipo maduro de DCs, el cual puede regular la función de los linfocitos T y de esta forma se establece un nexo de unión entre las respuestas inmunes innatas y las adaptativas [88].

Es importante destacar que una propiedad de las pDCs tanto de ratón como las humanas es su extremada sensibilidad al cultivo *in vitro*. Las pDCs entran rápidamente en apoptosis en tan sólo 4 horas de cultivo así como también disminuyen su capacidad para producir IFN- $\alpha$ . La supervivencia de la pDCs humanas en cultivo se ve incrementada por la presencia de IL-3, el IFN- $\alpha$  en sí mismo, así como los ligandos para TLR7 (imiquimod) y secuencias ricas en motivos CpG [78, 89, 90]. También hay que destacar el papel autocrino del TNF implicado en la maduración de las pDCs a células presentadoras de antígenos y a la regulación negativa en la secreción de IFNs tipo I [91].

### 2.2.2.1 Morfología y localización

Las pDCs purificadas de sangre periférica son ligeramente más pequeñas que los monocitos pero más grandes que los linfocitos en reposo. Tras una tinción con Giemsa puede observarse una morfología redondeada con un núcleo oval o en forma de riñón (ver Figura 3, panel A). Tienen un citoplasma basófilo que contiene una destacada zona perinuclear clara. En una micrografía electrónica de barrido, podemos observar una morfología redondeada, de apariencia linfoide con un contorno liso. A nivel de microscopía electrónica de transmisión se observa que las pDCs poseen numerosas mitocondrias y un importante retículo endoplasmático (ver

Figura 3, panel B). En conjunto, muestran una morfología que se asemeja a la de células plasmáticas.

En condiciones basales tras abandonar la médula ósea, las pDCs migran a las zonas ricas en linfocitos T de los ganglios linfáticos a través de las vénulas de endotelio alto (*High Endothelial Venule*, HEV) y también se encuentran en las zonas marginales del bazo. La migración constitutiva hacia los ganglios linfáticos va asociada a la expresión de la L-selectina (CD62L) en las pDCs la cual interacciona con su ligando expresado en las HEV además de la quimioatracción de ELC/CCL19 y SLC/CCL21 expresadas por las HEV y las células estromales dentro de las zonas ricas en células T [40, 79, 92, 93]. En la actualidad, se cree que los ganglios linfáticos no inflamados promueven la adhesión pero no la trans migración de las pDCs [94], mientras que la emigración de las pDCs hacia los ganglios tendría lugar en un estado de inflamación. En humanos, el receptor tipo quimiocina 1 (Chemokine-like receptor 1, CMKLR1), también denominado ChemR23, se expresa en la superficie de las pDCs y aparece como mediador del reclutamiento a través de las HEVs [95].

#### 2.2.2.2 Fenotipo

Las pDCs humanas se definen por la expresión de los marcadores CD4+CD45RA+IL3R $\alpha$ (CD123)+ILT3+ITL1-CD11c-linaje-. Al contrario que las cDCs, las pDCs no expresan la mayoría de antígenos mieloides como el CD11b, CD13 o el CD33 en condiciones basales (Figura 1). También se ha observado que expresan el RNA mensajero para la subunidad  $\alpha$  del pre-TCR (pre-TCR $\alpha$ ) y el CD3 $\epsilon$ , transcritos asociados a linaje de células T, así como el factor de transcripción linfocito-específico, SpiB. Además, se ha identificado en timo humano una población similar a la CD11c- pre-TCR $\alpha$  que puede madurar tras cultivo *in vitro* con IL-3 y CD40L [96]. Por estas evidencias, se ha asociado a estas células un linaje linfoide, aunque el origen de dichas células no está esclarecido [97].

Figura 3. Morfología de DCs humanas aisladas de sangre periférica.

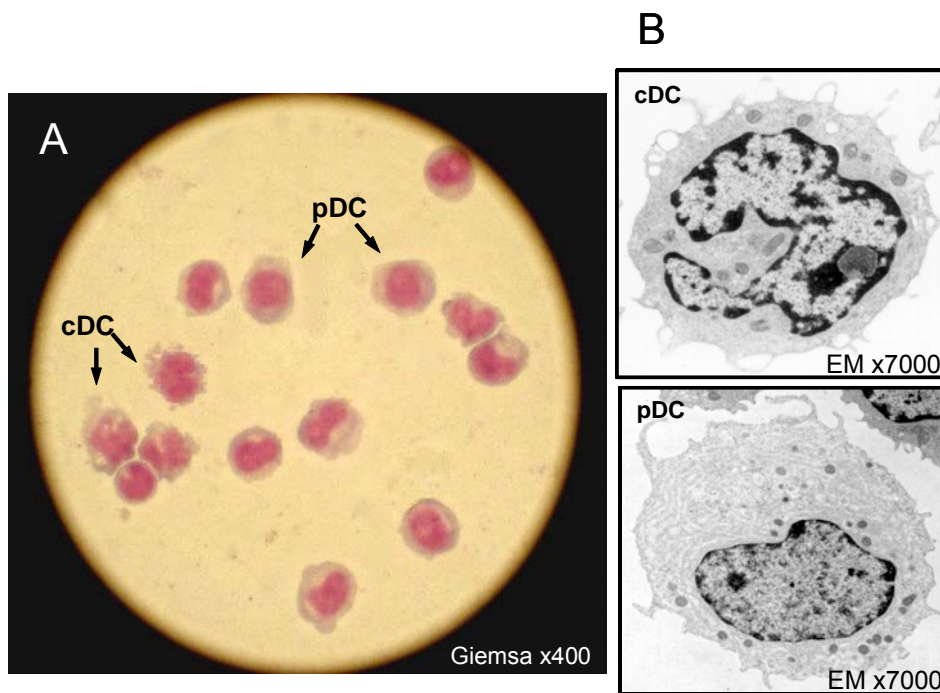


Figura3. cDCs y pDCs: A.Giemsa stain x400 y B. Microscopía electrónica x7000 (Gómez y col. *Tissue Antigens* 2004; 63(2):149-57).

En el año 2000, fueron descritos algunos marcadores específicos para las pDCs humanas de sangre periférica y médula ósea: el BDCA-2 y el BDCA-4 [47]. El BDCA-2 es una lectina tipo C, una glicoproteína transmembrana que puede internalizar el antígeno (aún desconocido) para ser presentado a linfocitos T. Los anticuerpos anti-BDCA-2 inhiben la producción de interferones de tipo I por parte de las pDCs [98]. Por otro lado, se conoce que el BDCA-4 es idéntico a la neurofilina-1, la cual es un receptor neuronal perteneciente a la subfamilia semaforina. Los anticuerpos anti-BDCA-4 no afectan sustancialmente a la función de las pDCs y, desde este punto de vista, resultan de gran utilidad para la purificación por selección positiva de dichas células. Mientras que BDCA-2 es exclusivo de pDCs, el BDCA-4 también está presente

en cDCs que han sido cultivadas *in vitro* y que han sufrido un proceso de maduración [99], así como en linfocitos T [47].

### 2.2.2.3 Función

Las pDCs tanto murinas como humanas son pobres inductoras de la proliferación de linfocitos T. Sus procesos de captura, procesamiento y presentación antigénica son mucho menos eficaces si se comparan con los de las cDCs [100].

Aunque al principio se considerara que las pDCs tenían poca importancia en la captura del antígeno; se ha demostrado que las pDCs humanas de sangre periférica internalizan antígenos solubles [98], pueden internalizar anticuerpos unidos a receptores de superficie (por ejemplo, BDCA-2) y anticuerpos unidos a antígenos restringidos por MHC II [101, 102]; por su parte las pDCs esplénicas murinas fagocitan bolas de látex [103].

Además expresan niveles mínimos de moléculas coestimuladoras y poseen baja expresión de MHC II [104, 105]. A diferencia de las células inmaduras, las pDCs activadas aumentan la expresión en superficie tanto sus moléculas de MHCII como sus moléculas coestimuladoras, incrementando su habilidad para estimular linfocitos T [100].

Las pDCs, al igual que las cDCs, son muy flexibles en cuanto a dirigir respuestas de linfocitos T se refiere. Así, dependen de su estado de maduración y de la naturaleza y concentración de antígeno [80, 106]. Se ha demostrado que las pDCs son capaces de inducir tanto una respuesta del tipo Th1 como Th2 dependiendo del estímulo recibido [76, 107]. También, en algunas circunstancias, son capaces de promover la diferenciación de células T reguladoras [108].

Los estímulos mejor caracterizados de las pDCs son los virus. Una estimulación viral induce a las pDCs a producir grandes cantidades de IFN- $\alpha$ , así como otras citocinas.

Sin embargo, la capacidad para producir IFN- $\alpha$  es relativamente transitoria (horas). El IFN- $\alpha$  es una citocina pleiotrópica de potente actividad antiviral que también funciona como factor inhibidor del crecimiento, factor anti-apoptótico y modula una gran variedad de respuestas inmunitarias. Aunque existe cierta controversia al respecto, se cree que en humanos el IFN- $\alpha$  es un inductor efectivo de respuestas Th1 [109]. Así que el interferón producido tras una estimulación viral induce a las pDCs a diferenciarse en DCs maduras que estimularán T naive a producir principalmente IFN- $\gamma$  e IL-10 [110, 111].

Por otra parte, se ha descrito que las pDCs en presencia de IL-3 y el CD40 ligando (CD40L) inducen un patrón de respuesta T del tipo Th2. Así las células T estimuladas por estas pDCs condicionadas secretan interleucinas típicas de Th2, como son IL-4, IL-5 y IL-10 [76, 100].

Como ya se ha apuntado, las pDCs pueden mostrar un papel regulador [103, 112]. Los estudios de Gilliet y Liu muestran que si se co-cultivan linfocitos CD8+ alogénicos con pDCs activadas vía CD40L, las células T muestran tanto una pobre respuesta proliferativa como también una baja actividad citolítica [108]. Otro estudio ha demostrado también que, las pDCs estimuladas vía CD40 inducen linfocitos T CD4+ reguladores, productores de IL-10 [113]. Existen otras evidencias del papel regulador de las pDCs. Kuwana y colaboradores demostraron que las pDCs aisladas de sangre periférica tienen capacidad para inducir anergia en líneas celulares CD4+ específicas para la toxina tetánica. Los linfocitos T no son capaces de producir ni IL-2 ni IFN- $\gamma$ , mientras que la producción de IL-10 se ve incrementada [114]. Además, otro estudio ha sugerido que las pDCs humanas pueden inducir células T CD4+CD25+ reguladoras [115].

Las pDCs humanas presentan péptidos asociados a MHC I con una eficacia similar a las cDCs [116, 117]. También se ha demostrado, *in vivo*, esta elevada eficiencia de presentación en pDCs murinas [118]. Así pues, las pDCs llevan a cabo la mayoría de funciones necesarias para la presentación cruzada (*cross-presentation*):

endocitosis, procesamiento y presentación de antígenos virales. Además de mostrar una plena capacidad de inducir activación cruzada (cross-priming) [119].

### 3. FUNCIONES DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS: CAPTACIÓN, PROCESAMIENTO DE LOS ANTÍGENOS, MIGRACIÓN, ACTIVACIÓN Y/O MADURACIÓN

**A** partir de su generación en médula ósea, la DC sufre un proceso de desarrollo que puede dividirse en dos fases:

- 1) la diferenciación
- 2) la maduración

En la fase de diferenciación [120] los progenitores derivados de médula ósea se diferencian en precursores circulantes que llegarán a generar distintos subtipos de DCs. Entre las distintas subpoblaciones de DCs, unas actúan como centinelas en tejidos periféricos, mientras que en otros casos, las DCs residen en tejidos linfoides (reflejado en **Figura 2**). En este estado, las DCs son consideradas como células inmaduras.

El proceso de maduración [121] se caracteriza por la transformación de las DCs en potentes estimuladoras de linfocitos T. Básicamente consiste en un programa de regulación transcripcional en el que están implicados una gran variedad de genes [122, 123] que controlan distintos aspectos funcionales. Primeramente, la maduración induce una dramática reorganización estructural que determina un cambio sustancial en la función de la DC, inhibiendo su capacidad de captación de antígenos e iniciando los procesos de presentación (**Figura 4**). Otros aspectos en la biología de las DCs que se ven influenciados son la migración, la coestimulación y la



producción de citocinas que determinan la polarización de los linfocitos T. Este proceso está asociado a numerosos eventos coordinados que se resumen en el siguiente esquema (Figura 4):

Figura 4. Esquema de maduración de las DCs

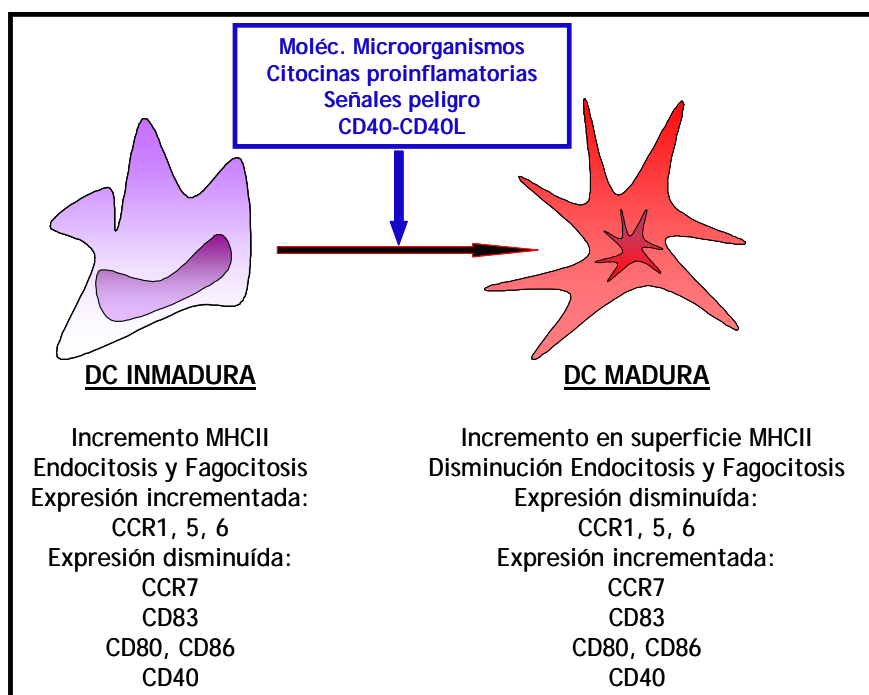


Figura 4. Después de la maduración, las DCs sufren grandes cambios morfológicos, fenotípicos y funcionales. Desde el punto de vista morfológico, las DCs sufren una reorganización de su citoesqueleto, perdiendo su capacidad de adherencia y adquiriendo largas prolongaciones citoplasmáticas que le confieren una fuerte capacidad de movimiento. Por lo que al fenotipo se refiere, consiste en un incremento de la expresión de moléculas de coestimulación CD40, CD80, CD86, y moléculas de adhesión tales como el CD54 y el CD58. Además, existe un cambio en el perfil de receptores para la quimiocinas. También se incrementa fuertemente la expresión de moléculas de MHC I y II en la superficie de las DC maduras. Finalmente, desde un punto de vista funcional, las DC adquieren una gran capacidad de presentación del antígeno, perdiendo su potencial de captar y procesar el antígeno.

### 3.1 CAPTACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LOS ANTÍGENOS

#### 3.1.1 Captación del antígeno

La capacidad por parte de las DCs de captar y procesar el antígeno depende fuertemente del estado de maduración de estas células. Dependiendo de su localización, de las señales que provienen del ambiente exterior y según el método de cultivo celular *in vitro* utilizado para su diferenciación, las DCs pueden variar de forma significativa desde un punto de vista funcional. Las DCs de órganos no linfoides, que se encuentran inmaduras en la periferia se caracterizan por una baja expresión de moléculas MHC I y II, y de moléculas coestimuladoras, desempeñando un papel de centinela del sistema inmune. Ellas son capaces de captar y procesar el antígeno, después migrar, gracias a la acción de señales inflamatorias, alcanzando los órganos linfoides a través de la sangre y la linfa. Después de la migración, las DCs maduran y adquieren nuevas capacidades que les permiten iniciar las respuestas inmunitarias.

Los principales mecanismos de captura del antígeno ejercidos por las DCs son pinocitosis, endocitosis mediada por un receptor especializado y fagocitosis.

La pinocitosis, caracterizada por la invaginación de la membrana y la formación de vesículas de gran tamaño, permite la internalización de partículas solubles provenientes de los fluidos extracelulares [124].

La endocitosis que es mediada por receptores presentes en la superficie de las DCs, tales como los receptores de los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas (FcγRI, CD64 y FcγRII, CD32) para la captura de inmunocomplejos [124] o los receptores de tipo lectina [125] y receptores de manosa pudiendo fijar el antígeno [126]. Además, también tienen la posibilidad de internalizar proteínas de choque térmico, hsp 70 o gp96, a través de múltiples receptores como son LOX-1 [127] y TLR2/4 [128].

Mediante la fagocitosis, las DCs son capaces de internalizar cuerpos apoptóticos y necróticos [129-132]; virus y bacterias (incluyendo mycobacteria) [132]; así como parásitos intracelulares.

Clásicamente, se ha descrito que estos mecanismos de captura de antígenos son especializadas las DCs inmaduras y que tras recibir un estímulo de maduración, las DCs disminuyen su capacidad de endocitosis [123, 133, 134]. Sin embargo, la formación de vesículas de clatrina (esenciales en la pinocitosis) tiene lugar de forma continuada en las células. Por ello y por publicaciones recientes del propio grupo [135], no debería considerarse que las DCs maduras no son capaces de llevar a cabo procesos de internalización de antígenos.

### 3.1.2 Procesamiento y presentación del antígeno

**L**os antígenos capturados son procesados por las DCs en distintos compartimentos intracelulares y son cargados en moléculas presentadoras de antígeno [136]. Los antígenos proteicos son presentados a través de la vía clásica (MHC) mientras que los antígenos lipídicos son presentados a través de una vía no clásica (CD1) [25].

Existen dos vías distintas para la presentación de péptidos antigénicos en moléculas MHC [25, 136, 137]. Los antígenos de origen exógeno son internalizados por procesos de fagocitosis o endocitosis y, normalmente, son procesados y cargados en moléculas MHC II en un compartimento post-Golgi. Mientras que, los antígenos endógenos son parcialmente digeridos por el proteasoma, asociados al transportador TAP (*Transporter Associated with antigen Presentation*) y transferidos al retículo endoplasmático (ER) donde finalmente son cargados en moléculas MHC I.

Como ya he apuntado anteriormente, los linfocitos T CD8+ y CD4+ expresan receptores clonalmente distribuidos que reconocen fragmentos antigénicos (péptidos) asociados a moléculas MHC I y II, respectivamente. La degradación antigénica y la carga peptídica en moléculas MHC ocurre intracelularmente.

### 3.1.2.1 Presentación a través de la vía clásica

**L**as DCs procesan los antígenos exógenos permitiendo su asociación a moléculas de MHC II. Los antígenos endógenos, sin embargo, son procesados para ser presentados en moléculas de MHC I. Un tercer mecanismo, denominado “presentación cruzada” (*cross-presentation*), permite el procesamiento y el cargamento de antígenos exógenos en moléculas MHC I.

Los antígenos capturados y presentados en moléculas MHC II son transportados desde el compartimento lisosomal a la membrana celular tras el proceso de maduración que sufren las DCs [138, 139]. Estos complejos péptido-MHC (p-MHC) son muy estables en la superficie de las DCs maduras, facilitando el reconocimiento por el TCR. Además, las DCs, a diferencia de los macrófagos, muestran bajos niveles de proteasas lisosomales lo cual representa una degradación lenta del antígeno. En este sentido, el antígeno queda retenido por más tiempo en los órganos linfoides favoreciéndose la presentación antigénica [140]. Ambas características, la prolongada disponibilidad del antígeno y de presentación antigénica, podrían explicar la eficiencia de las DCs en promover la diferenciación de los linfocitos T naive.

Las moléculas de MHC I representan otra vía de presentación antigénica que es explotada por las DCs [136]. A través de este mecanismo, como se ha mencionado anteriormente, se presentan péptidos “endógenos”, originados a partir de proteínas celulares o virales, así como la presentación de antígenos exógenos por presentación cruzada. De hecho, el *cross-priming* podría ser el principal camino por el cual tiene lugar la inmunidad antitumoral y la inmunidad frente a microorganismos que no infectan directamente a las DCs [141, 142]. A pesar de que esta vía de presentación

se esté utilizando en terapia celular para el diseño de vacunas terapéuticas, todavía quedan algunos aspectos del mecanismo de presentación por acabar de determinar.

### 3.1.2.2 Presentación a través de la vía no clásica (familia del CD1)

**L**a familia CD1 presenta antígenos lipídicos a los linfocitos T [143]. En humanos, la familia CD1 está formada por 5 miembros CD1a-c (grupo 1); CD1d (grupo 2) y CD1e (grupo 3), mientras que en ratón sólo se ha descrito CD1d.

Distintas moléculas de CD1 muestran distintos patrones de tráfico intracelular probablemente como resultado del reparto del antígeno en distintos compartimentos celulares. Cabe destacar las similitudes entre el sistema MHC II y CD1 pero también diferencias que los hacen sistemas con autonomía propia. Así por ejemplo, la maduración de las DCs no afecta significativamente al sistema CD1 [144, 145].

En este campo de estudio, el próximo reto será comprender qué mecanismos de presentación antigénica son utilizados preferentemente por cada subtipo de DC, y las consecuencias de esta presentación diferencial en las respuestas inmunes inducidas.

## 3.2 MIGRACIÓN

**L**a captación del antígeno asociada a signos de maduración promueven la migración de las DCs a las zonas T de los órganos linfoides a través de la sangre y la linfa. Los signos de maduración inducen un cambio en el repertorio de receptores de quimiocinas expresado por parte de las células DCs (disminución de la expresión de CCR1, CCR2 y CCR5) [146, 147]. Las DCs pierden su capacidad de responder a ciertas quimiocinas habitualmente expresadas a nivel de los lugares de inflamación [148-150]. Por el contrario, la expresión de CCR7 se incrementa a las 24 horas después de la estimulación, adquiriendo la célula dendrítica la capacidad de responder a las quimiocinas como CCL19 y CCL21 (o MIP-3 $\beta$  y SLC) (Figura 4). Bajo la influencia de estas dos quimiocinas, las DCs abandonan los tejidos periféricos. La

migración de las DCs hacia los órganos linfoides necesita atravesar la barrera endotelial de los vasos linfáticos desde un sentido basal hacia el apical. Este proceso es denominado transmigración reversa. Los vasos linfáticos expresan CCL21 en su cara/superficie luminal, lo cual va a permitir la transmigración reversa de las DCs hacia los vasos linfáticos. Las DCs entran en los ganglios linfáticos por el área paracortical, alcanzando las zonas ricas en linfocitos T [148, 151]. Las DCs maduras pueden, ellas mismas, secretar CCL19 y CCL21, permitiendo una amplificación de la señal, y así reclutar más DCs a esos ganglios, además del reclutamiento de linfocitos T naive, que expresan CCR7. Este modelo describe un perfil clásico de migración en el que se asocian estados funcionales de las DCs (inmaduras *versus* maduras) con su potencial capacidad para migrar.

Los primeros estudios realizados sugirieron que la migración de DCs inmaduras (por ejemplo, células de Langerhans) desde la periferia a las áreas de células T en los ganglios linfáticos sólo ocurría en respuesta a un estímulo microbiano o a la inflamación. Sin embargo, trabajos posteriores han apuntado la existencia de un tipo de migración basal que ocurre constitutivamente, en aparente ausencia de estimulación microbiana [152].

Finalmente, como ya se ha mencionado anteriormente, es importante recordar que la ruta de entrada a los órganos linfoides difiere entre los subtipos de DCs (pDCs y cDCs) [94]. Mientras que las pDCs migran directamente a los tejidos linfoides secundarios a través de HEV [92], las cDCs primero migran al lugar de inflamación y posteriormente viajan a los tejidos linfoides secundarios a través del circuito aferente de la linfa [88] (ver **Figura 5**).

### 3.3 ACTIVACIÓN Y MADURACIÓN

**P** ara poder activarse y diferenciarse en células presentadoras de antígeno activadoras de linfocitos T, las DCs deben sufrir un proceso de maduración inducido por una señal de estrés o peligro.

Los procesos de maduración y de migración están íntimamente ligados y la completa maduración finaliza después de la migración.

Figura 5. Esquema de migración de los subtipos de DCs (cDCs y pDCs)

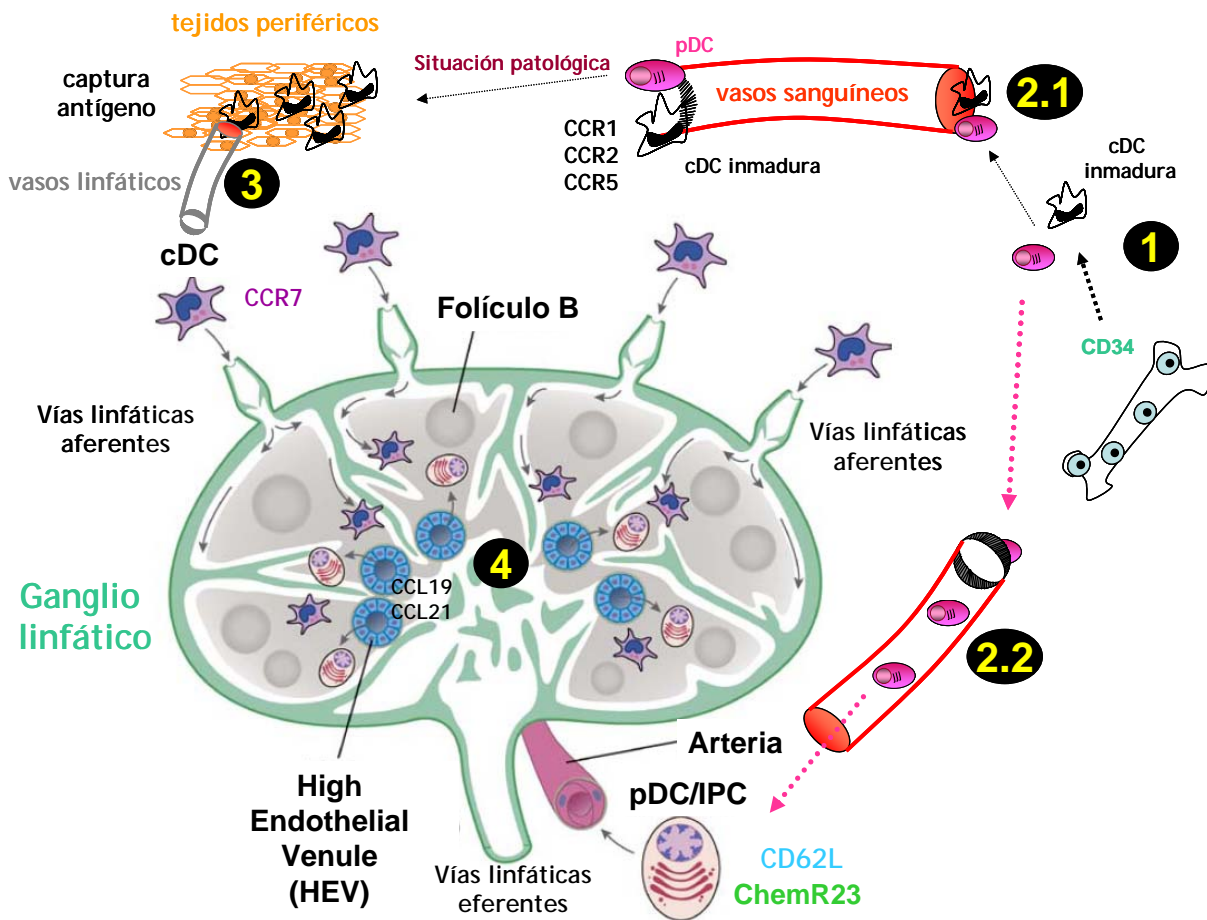


Figura 5. Perfil de migración de cDCs y pDCs. La primera etapa del desarrollo de las DCs comprende la diferenciación celular (1). En este punto, las cDCs inmaduras primero migran a tejidos periféricos gracias a la expresión de receptores de quimiocinas presentes en su superficie (CCR1, 2, 5) (2.1). En el tejido inflamado tiene lugar la captura del antígeno desde donde posteriormente viajan al ganglio a través del sistema linfático aferente y gracias a la expresión de CCR7 (3). Esta expresión permitirá un movimiento dirigido a órganos linfáticos secundarios gracias a gradientes de CCL19 y CCL21 (ligandos de CCR7) presentes en las HEVs y células estromales. Por el contrario, las pDCs migran directamente a los tejidos linfoides secundarios (ganglio) a través de HEV, gracias a su expresión en superficie de CD62L y ChemR23 (2.2). Sin embargo, en una situación patológica también puede tener lugar una migración de las pDCs al lugar de inflamación (2.1). Finalmente, ambas subpoblaciones se encuentran en los órganos linfoides secundarios alcanzando las zonas ricas en linfocitos T donde se llevará a cabo la presentación antigénica (4).

Como ya se ha comentado anteriormente, la maduración de las DCs puede ser inducida por varios tipos de estímulos (**Figura 6**), entre los cuales se pueden incluir:

- 1) moléculas derivadas de microorganismos bacterianos (ligandos de los receptores de tipo Toll-like, TLR) [153], tales como el LPS [132] y el DNA bacteriano [154], o viral (RNA de doble cadena) [155];
- 2) citocinas inflamatorias como el  $TFN\alpha$  o  $IL-1\beta$ ;
- 3) señales de peligro (proteínas de choque térmico -"heat shock proteins" (hsp)-, células necróticas)
- 4) y la interacción con linfocitos T activados a través de la señalización CD40/CD40L, entre otros.

La regulación de la maduración de las DCs tiene lugar a distintos niveles. No sólo influye la naturaleza del estímulo sino que también intervienen otros factores como son la combinación de distintos estímulos; y el momento y duración en que tiene lugar la activación [156]. Es importante tener en cuenta estos aspectos porque los distintos modos de activación de las DCs influyen el tipo de respuesta T inducida.

### **3.3.1 Tipo de estímulos madurativos**

#### **3.3.1.1 Moléculas derivadas de microorganismos**

**D**espués de años de trabajo y estudio, hoy se conoce que el sistema inmunitario innato reconoce componentes microbianos a través de varios receptores que reconocen patrones específicos (PRRs) [2]. Existen, al menos, tres familias de PRRs: los receptores tipo Toll (TLRs), receptores lectina tipo C (CLRs) y los receptores tipo Nod (NLRs).

La expresión y función de los receptores innatos en DCs varían de forma significativa entre el ratón y el hombre y en los distintos tipos de DCs. Por ejemplo, el TLR9 se expresa en todas las poblaciones de DCs murinas pero en humano, sólo en



las pDCs. Además, la producción de IFN tipo I inducido por el RNA viral de doble cadena depende de RIG-I en las DCs convencionales y del sistema TLR en las DCs plasmacitoides [157].

Figura 6. Las DCs como sensores inmunológicos de la vida, la muerte y el peligro.

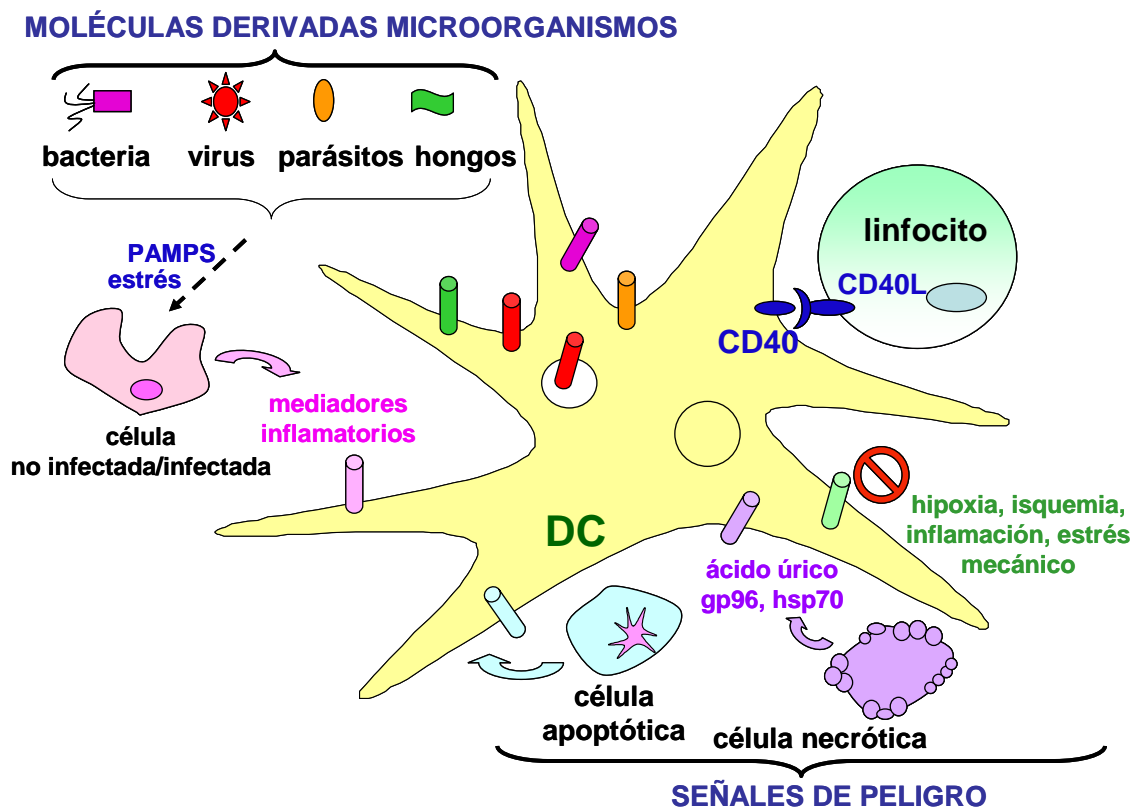


Figura 6. Las DCs expresan distintos receptores que le avisan del peligro (bacterias, virus, parásitos y hongos) para salvaguardar la integridad celular; así como receptores para la detección de la muerte celular (cristales de ácido úrico, gp96 y hsp70 de células necróticas, cuerpos apoptóticos, etc). Rápidamente, las DCs se activan en respuesta a esta amplia variedad de estímulos promoviendo la respuesta inmune y dando lugar a una situación de inflamación. (*Current Biology*, 2004)

Los microorganismos pueden activar directamente a las DCs a través de los PRRs o indirectamente, por ejemplo, a través de la captura de productos apoptóticos y/o necróticos de células muertas como consecuencia de la exposición microbiana.

Los microorganismos también inducen a un amplio repertorio celular (células epiteliales, fibroblastos y células del sistema innato) a secretar citocinas capaces de activar a las DCs.

#### 3.3.1.1.1 Receptores tipo Toll (TLRs)

**L**os receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLRs) constituyen uno de los ejemplos más característicos de receptores que tienen una extensa especificidad para estructuras moleculares conservadas de patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs) (ver Tabla 3). Los TLRs se expresan en un amplio abanico de células incluyendo las DCs. Los distintos subtipos celulares que constituyen el sistema DCs expresan distintos TLRs que activan diferentes vías de señalización en respuesta a un amplio repertorio de PAMPs [158, 159]. Representan una familia constituida por 10 miembros en el caso de los humanos y 13 en ratón [160] y pueden expresarse como homodímeros o como heterodímeros.

Las DCs están equipadas con distintas plataformas moleculares para detectar productos microbianos y factores endógenos no-microbianos. Algunos TLRs se encuentran presentes en la membrana plasmática (por ejemplo, TLR4 y TLR2) mientras que otros se localizan en compartimentos endosomales (TLR 3, 7, 8 y 9; los cuales reconocen ácidos nucleicos). Esta localización restringida podría explicar un posible mecanismo por el cual las DCs evitarían una activación espontánea a ácidos nucleicos propios [161, 162].

Tabla 3. Los receptores tipo *Toll* (TLRs) y sus ligandos

Familia de TLR	Ligandos (origen)
TLR 1	Tri-acil lipopéptidos (bacteria, mycobacteria) Factores solubles ( <i>Neisseria meningitides</i> )
TLR 2	Lipoproteínas/lipopéptidos (varios patógenos), Peptidoglicano (bacterias Gram-positivas) Ácido lipoteicoico (bacterias Gram-positivas) Lipoarabinomanano (mycobacteria) Glicoinositolfosfolípidos, Glicolípidos, Zymosan (hongos), LPS atípico, Hsp70 (huésped)
TLR 3	Doble cadena RNA (virus)
TLR 4	LPS (bacterias Gram-negativas), Hsp60 (microorganismos), Hsp60 y Hsp70 (huésped), Oligosacáridos de ác. Hialurónico (huésped), Heparán sulfato (huésped), Fibronectina (huésped), Fibrinógeno (huésped)
TLR 5	Flagelina
TLR 6	Di-acil lipopéptidos (mycoplasma)
TLR 7	RNA cadena simple (virus)
TLR 8	RNA cadena simple (virus)
TLR 9	DNA cadena simple (motivos CpG no-metilados) (virus)
TLR 10	?

Todos los TLRs se encuentran unidos a la molécula que funciona de adaptador, MyD88 (*Myeloid Differentiation factor 88*), y la cascada de señalización puede acabar activando al factor nuclear NF- $\kappa$ B. MyD88 no es el único adaptador asociado a TLRs; existen otros, por ejemplo TRIF: adaptador inductor de IFN $\beta$  que contiene dominio TIR (*TIR domain-containing adapter-inducing IFN $\beta$* ; TRIF). Un adaptador que media la producción de interferones de tipo I en los TLR3 y 4.

Como se ha mencionado anteriormente, los subtipos de DCs tienen un perfil diferencial en la expresión de los TLR [41, 163] (ver **Tabla 1**). Este patrón segregado de TLRs podría aportar evidencias sobre una cierta especialización funcional entre las subpoblaciones de DCs. Por ejemplo, la expresión del TLR9 (receptor para DNA

dimetilado) en los endosomas de las pDCs, pero no presente en cDCs, podría facilitar la generación de la respuesta antiviral de los interferones de tipo I frente a patógenos intracelulares como son los virus. Por el contrario, el TLR4 no aparece en pDCs pero sí se encuentra en la superficie de las cDCs acorde con la inducción de IL-12 como respuesta al LPS pudiendo ser importante en la generación de respuesta Th1 durante infecciones bacterianas. Aunque la hipótesis sobre la especialización de las DCs puede resultar interesante; es importante destacar que sólo se basa en el patrón de expresión de los TLRs en DCs en un estado no-activado y que además no coincide plenamente con los resultados obtenidos en los subtipos de DCs murinas equivalentes. Por último, la señalización a través de los TLRs activa fuertemente a las DCs provocándoles un incremento en superficie de las moléculas de coestimulación (CD80 y CD86) y una producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IFN  $\alpha/\beta$ , en función del subtipo de DC al que nos refiramos).

#### 3.3.1.1.2 Receptores lectina tipo C

**L**as lectinas tipo C (*C-type Lectin Receptors*, CLRs) unen carbohidratos procedentes tanto de patógenos como de glicoproteínas propias [125, 164]. Actúan anclando un gran número de microbios (bacterias, virus, hongos y parásitos) permitiendo así su internalización. Sin embargo, no sólo son importantes como sensores de organismos invasores, sino también se encuentran implicados en la adhesión celular, la migración, la activación de linfocitos T a través de DCs y en el mantenimiento de la propia tolerancia. Así pues, se ha demostrado que algunos de los receptores lectina tipo II, como DC-SIGN (*DC-Specific Intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin*), pueden funcionar como receptores en la adhesión y como receptores de patrones de reconocimiento.

Las DCs expresan una inmensa colección de CLRs [165, 166]. Mientras que las células dendríticas derivadas de monocitos (MDDCs) y las DCs intersticiales expresan la mayoría de las lectinas de tipo C, las DCs de sangre periférica y las células de Langerhans sólo expresan unos pocos receptores tipo lectina.

Al igual que para los TLRs, los distintos subtipos de DCs presentan diferentes CLR. Por ejemplo, las pDCs expresan el antígeno de DC de sangre periférica 2 (BDCA2) [98]. La langerina/CD207 es específico de células de Langerhans [167], mientras que DC-SIGN/CD209 es específico de DCs intersticiales [168]. Otros receptores de tipo lectina, como DEC205/CD205 o el receptor asialoglicoproteína en DC (DC-ASGPR) son más ampliamente expresados. Otros receptores que pertenecen a esta familia son el dectin-1, un CLR específico para beta-glucanos que media la fagocitosis de levadura; el inmunorreceptor de DC (*Dendritic Cell Immunoreceptor*, DCIR); y el receptor lectina inhibidor mieloide (*Myeloid Inhibitory C-type Lectin Receptor*, MICTL).

Del mismo modo que ocurre con los TLRs, la expresión de CLR difiere entre el hombre y el ratón. Múltiples DCIRs (DCIR1-4) han sido identificados en ratón, mientras que un único DCIR se ha encontrado en humanos. Estas diferencias complican la extrapolación del conocimiento obtenido en estudios de ratón al hombre.

#### 3.3.1.1.3 Familia de receptores tipo Nod (NLRs): Proteínas con dominios de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD):

**L**os NLRs son una familia de proteínas citosólicas que se han implicado recientemente en el reconocimiento innato de bacterias intracelulares, en la inducción de la vía de señalización del NF- $\kappa$ B y en respuestas inflamatorias [169, 170]. La familia de NLRs incluye 22 miembros, la mayoría de los cuales se subdividen en dos subfamilias: NODs (NOD1-5) y NALPs (NALPs, NACHT-LRR-PYR: containing proteins *leucin-repeat, and pyrin-domain-containing proteins* 1-14). Algunos NLRs forman parte del denominado inflamasoma [171], un complejo multiproteico que juega un papel importante en la activación de caspasas proinflamatorias [172] (ejemplo, activación de la caspasa-1 la cual lidera el proceso de activación de las formas proactivas de IL-1 $\beta$  y IL-18).

Algunos ejemplos de esta familia de receptores son NOD1, NOD2 y NALP3. Los componentes de NLRs son activados por muropéptidos, pequeños fragmentos del peptidoglicano que deriva de la pared de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Además, NALP3 también puede activarse por RNA viral y señales de peligro endógenas (ácido úrico) liberadas por las células muertas [173].

Algunos polimorfismos o mutaciones en genes que codifican NLRs han sido asociados con la susceptibilidad a alteraciones inflamatorias e inmunodeficiencias [174, 175].

La expresión de la mayoría de los miembros que pertenecen a NLR es poco conocida en DCs humanas: NOD1/2 se expresan en el citosol de macrófagos y DCs y las células de Langerhans presentan un nivel elevado de expresión de NALP1. Recientemente, se ha identificado una isoforma específica de NALP3 en DCs [176].

#### 3.3.1.1.4 Otros receptores

**E**xisten otros receptores que también reconocen ácidos nucleicos virales y que se denominan RLRs, de receptores que inducen genes por el ácido retinoico intracelular tipo I (*RIG-I-like receptors*). Esta familia de receptores median la inducción de interferones tipo I a través de la activación del factor regulador del interferón (IRF) [177].

#### 3.3.1.2 Citocinas inflamatorias

**O**tro grupo de efectores mediadores de la maduración en DCs son las citocinas. Las DCs producen citocinas y son susceptibles a la activación mediada por estos factores solubles [178, 179].

Así pues, las citocinas proinflamatorias representan otro tipo de estímulos para las DCs. En esta categoría podemos incluir, entre otras, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 y PGE2 [180] o combinaciones con un mayor potencial estimulador como son IL-1 $\beta$  y TNF con interferones de tipo I (IFN- $\alpha$ ) y tipo II (IFN- $\gamma$ ). Estas citocinas, las cuales se producen en estadios tempranos de infección, pueden actuar de forma autocrina (por ejemplo, el TNF en las pDCs) o paracrina (los IFNs tipo I para las cDCs) en la maduración de las DCs.

En el proceso de maduración, la mayoría de los genes que se regulan (ya sean inducidos o reprimidos) lo hacen de un modo estable. Sin embargo, las citocinas presentan distintas cinéticas entre ellas y se expresan de forma transitoria [181]. Por ejemplo, tras una estimulación apropiada, el TNF se libera rápidamente (el máximo tiene lugar a las 3 horas), mientras que la IL-6, IL-10, IL-12 y IL-23 se producen entre las 6 y 18 horas después de la estimulación. A tiempos más tardíos, la producción de citocinas cesa (un fenómeno denominado "agotamiento", *exhaustion*) aunque las células todavía presenten los antígenos y estimulen a los linfocitos T naive.

A través del control de la activación de las DCs, las citocinas regulan la homeostasis inmune y el balance entre tolerancia e inmunidad. El incremento en la producción y/o la biodisponibilidad de citocinas asociadas a alteraciones en la homeostasis de las DCs se han visto implicadas en varias enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

### IL-1 y la familia de la IL-1

La familia de IL-1 juega un papel importante en la inflamación y defensa del huésped. Esta familia está compuesta por 11 miembros; de los cuales sólo se han estudiado 5: IL1- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1RA y recientemente se ha descrito a IL-33 como perteneciente a esta familia [182, 183].

IL-1 es un activador de DCs, aunque no está claro si DCs activadas por IL-1 muestran funciones biológicas únicas. IL-1 está implicada en la patogenia de numerosas enfermedades con componente inflamatorio [184], demostrándose beneficios terapéuticos con antagonistas de IL-1 (IL-1-RA) [185, 186].

La IL-18 es una citocina esencial tanto en las respuestas inmunes innatas como adaptativas. Originalmente se identificó como un factor inductor de IFN- $\gamma$  y se expresa en los sitios de inflamación crónica y en una gran variedad de enfermedades autoinmunes.

Se han descrito numerosas células productoras de IL-18, de las cuales se incluyen macrófagos y DCs [187-189]. Es una citocina que se libera de forma inactiva (pro-IL-18) y necesita de una maquinaria enzimática (caspasa 1 y proteinasa 3) para la conversión a una citocina biológicamente activa. El estímulo que promueve la secreción de IL-18 no está claramente definido pero pueden considerarse el LPS y FasL [6].

Por lo que al receptor para esta citocina (IL-18R) se refiere, se ha identificado en pDCs mientras que en cDCs se encuentra ausente. Así pues, a través de su receptor, la IL-18 es un potente factor quimiotáctico que presumiblemente incrementa la capacidad aloestimuladora de células dendríticas plasmacitoides [190].

## IL-2

En numerosos estudios se ha descrito a la IL-2 como un factor implicado en la diferenciación de las DCs a partir de progenitores CD34+ [191] o de monocitos de sangre periférica [192].

Sin embargo, basándose en sus propios resultados Civallero y sus colaboradores [192] hipotetizaron que la IL-2 podría actuar como un factor de maduración más que un factor de crecimiento en la diferenciación de las DCs.



A pesar de que existen estudios iniciales en los cuales no se atribuye un papel directo a la IL-2 en la potenciación de la función de las DCs, trabajos posteriores han demostrado que la IL-2 está implicada en la regulación de ciertos aspectos funcionales de las DCs (expresión de marcadores, movilidad y presentación antigénica) [193, 194].

También ha publicado el grupo de Granucci, que las DCs podrían producir IL-2 durante su activación [195]. De hecho, en esas células, la transición del estado de reposo a un estado activo están involucrados dos hechos relevantes: por un lado, la temprana y transitoria producción de mRNA de IL-2; y por otro, dos oleadas de producción de IL-2 a nivel proteico coincidiendo con la expresión de moléculas de MHC unidas a péptido. Así pues, proponen que la capacidad exclusiva de las DCs por estimular linfocitos T naive e iniciar así respuestas inmunes podría estar relacionada con su producción temprana de IL-2 tras la captura del antígeno.

### IL-3

La IL-3 fue propuesta por Caux y su equipo colaborador como un factor implicado en la expansión de DCs [196]. Posteriormente, Blom confirmó que la IL-3 contribuye (en este caso, junto a CD40L) a la diferenciación de progenitores CD34+ a células progenitoras de pDCs [53].

También se ha encontrado que la IL-3 es capaz de influir en la función de las DCs diferenciadas; por ejemplo, en conjunción con citocinas Th1 o Th2 [197]. Además puede contribuir (junto a GM-CSF) a la generación de grandes cantidades de DCs con una gran capacidad para generar potentes linfocitos citotóxicos reactivos frente a un tumor [198].

### IL-6 y la familia de la IL-6

La familia IL-6 la forman entre otros miembros, la propia IL-6 y la IL-11. Los miembros de esta familia tienen efectos pro pero también antiinflamatorios y juegan un papel central en la hematopoyesis así como en las respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas.

La IL-6 es secretada por un gran número de células. Entre sus funciones destacamos la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas así como la proliferación de linfocitos T, la diferenciación de linfocitos T citotóxicos y la producción de IL-2. Además, recientemente se ha descrito que la IL-6 participa en la diferenciación de un nuevo subtipo de linfocito T, Th17, el cual tiene funciones proinflamatorias [8].

A diferencia de lo que ocurre con la IL-23, que es responsable de la expansión de Th17 previamente diferenciados, la IL-6 y el TGF- $\beta$  son los encargados de la diferenciación de los Th17 desde sus precursores naive. El TGF- $\beta$  induce Foxp3 el cual conlleva a la formación de Tregs, mientras que la IL-6 inhibe la expresión de este factor de transcripción favoreciendo la formación de Th17 [199].

También se ha descrito una asociación entre la IL-6 y la patogenia de enfermedades inflamatorias y autoinmunes [200].

### IL-10

Se ha descrito que las DCs también tienen la capacidad de responder a IL-10. De acuerdo con este hecho, De Smedt y sus colaboradores demostraron que la IL-10 induce la maduración de las DCs a un fenotipo caracterizado por la afectación en la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$  (es decir, con un perfil inductor de respuestas Th2) [201].

Sin embargo, a la IL-10 se le atribuye un papel autocrino sobre la función de las DCs considerándola un inhibidor de la maduración de las mismas [202, 203]. De hecho, la IL-10 no sólo inhibe el desarrollo de linfocitos Th1 sino también ejerce un papel regulador negativo sobre una amplia variedad de células del sistema inmune [204, 205]. Además es una citocina inmunomoduladora importante en la inducción de linfocitos Tr1 [206].

#### IL-12 y familia de la IL-12

La IL-12, una citocina heterodimérica (subunidades p30 y p40; subunidad con importancia biológica p70) producida principalmente por cDCs activadas, juega un papel primordial en la diferenciación y expansión de linfocitos Th1 [207]. Está implicada directamente en la activación funcional de las DCs a través de la subunidad beta 1 del receptor para IL-12 [208]. Además, comparte la subunidad p40 con la IL-23.

La IL-23 es una citocina de importancia en diversas enfermedades autoinmunes como son la psoriasis [209, 210] y la enfermedad inflamatoria intestinal [211]. Las DCs humanas expuestas a bacterias Gram-negativas secretan IL-23 [212]. Esta citocina promueve el desarrollo y la expansión de linfocitos T CD4+ que producen IL-17, IL-17F, IL-6 y TNF (Th17). Este proceso de diferenciación es inhibido por IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-2. También se han asociado altos niveles de IL-23 (subunidad p19) e IL-17 en enfermedades como la esclerosis múltiple [213, 214] y la enfermedad de Crohn [215].

Otra citocina que pertenece a la familia es la IL-27. Ésta citocina, activa a linfocitos T naive modulando actividades proinflamatorias [216].

#### Interferones (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ )

Se ha descrito que los interferones tienen la capacidad de inducir la generación [217] y la maduración de las DCs. La habilidad por inducir la maduración

de las DCs por parte de los interferones ha sido ampliamente documentada; traduciéndose en un incremento por parte de las DCs en estimular a los linfocitos T a través de la expresión de moléculas coestimuladoras específicas, particularmente el CD86, y en la producción de varias citocinas inmunomoduladoras [89, 218].

Sin embargo, la situación de los interferones no es tan simple como la del resto de citocinas; ya que sus efectos dependen del subtipo de DC y del tipo de interferón [89].

Los interferones tipo I (I IFNs; IFN- $\alpha/\beta$ ), son los principales controladores de las infecciones virales y son secretados principalmente por las pDCs (IPCs, *Interferon Producing Cells*).

Pueden contribuir a alterar la tolerancia inmunológica a través de diversos mecanismos afectando directamente a las APCs, los linfocitos T y a los linfocitos B. Y juegan un papel importante en diversas enfermedades autoinmunes [219-221], principalmente en el lupus (SLE) [222-224].

### TNF- $\alpha$

El TNF- $\alpha$  es una citocina pleiotrópica que juega un papel primordial en la regulación de procesos inflamatorios [225] y es un factor clave en la red que conforman las citocinas.

La presencia de patógenos bacterianos así como de estímulos nocivos, inducen la producción de TNF a través de los TLRs y de la señalización por NF- $\kappa$ B [158, 226, 227]. Se considera que las cDCs mayoritariamente reconocen componentes bacterianos y producen citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12. En cambio, las pDCs principalmente reconocen productos víricos y liberan grandes cantidades de IFNs tipo I [228]. Sin embargo, se ha demostrado que las pDCs responden a los ligandos de TLR7 (imidazoquinolinas [90] y cadena simple de RNA viral [229, 230]) y TLR9 (DNA no-metilado con motivos CpG de origen bacteriano o

vírico [41, 231]) produciendo elevados niveles de IFN- $\alpha$  pero también cantidades importantes de IL-6 y TNF- $\alpha$  [88].

Una de las funciones principales del TNF- $\alpha$  es la maduración de las DCs, como han demostrado resultados observados en modelos murinos así como también en DCs humanas obtenidas *in vitro* [25]. Asimismo, el TNF- $\alpha$  puede actuar de forma autocrina en la maduración de pDCs.

El TNF, uno de los principales factores en respuesta a infecciones bacterianas, también contribuye a la patogenia de varias alteraciones autoinmunes, como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn y la psoriasis [91].

### 3.3.1.3 Señales de peligro

**E**l sistema inmune no sólo reconoce la presencia de patógenos, sino también el daño tisular y algunas formas de estrés celular, incluyendo todos los componentes descritos en el modelo de señales de peligro acuñado por Matzinger P. (“danger model”) [232]. Existen componentes que provienen de las células muertas que pueden inducir la activación de DCs [233]. Esta capacidad, la presentan las células muertas necróticas o apoptóticas en fase tardía, pero no se ha descrito para células en fase temprana de muerte celular.

Estas moléculas endógenas se denominan en su conjunto moléculas asociadas a patrones moleculares de daño celular (*Damage-Associated Molecular Pattern molecules*, DAMPs). Los DAMPs incluyen proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, hsp), HMGB1 (*High-Mobility Group Box 1 protein*), beta-defensinas, ácido úrico y nucleótidos intracelulares (ATP y UTP). Estos componentes incrementan la presentación antigénica de las DCs, mediando la inmunidad de los linfocitos T [234].

Existen distintas hps (hsp70, gp96 y hsp90) que inducen la maduración de DCs a través del receptor de LPS (TLR4/MD2/CD14) [235]. Pero este no es el único

receptor descrito para las hsp. CD40 y LOX-1 (*Lectin-like Oxidized low-density lipoprotein receptor-1*) también se han identificado como receptores [236].

Otras moléculas endógenas como la fibronectina, el fibrinógeno y el ácido hialurónico también activan a DCs a través de TLR4.

HMGB1 es un factor tipo citocina liberado por las células muertas [237] que induce la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF) en macrófagos [238]. HMGB1 tiene la capacidad de unirse a múltiples receptores: TLR2, TLR4 y RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End products*).

Las beta-defensinas son pequeños péptidos antimicrobianos secretados por neutrófilos y células epiteliales [239]. También activan DCs inmaduras a través del TLR4 [240].

El ácido úrico, un producto de la degradación de las purinas, juega un papel importante en numerosos procesos bioquímicos; por ejemplo, en la síntesis de DNA y RNA, y en la transferencia de energía. La forma soluble del ácido úrico no induce maduración en las DCs. Sin embargo, cristales de urato monosódico son potentes activadores, TLR4-independientes, de DCs promoviendo la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ ) a través de NALP3 (un receptor tipo NLR). Esta estrategia podría explicar un mecanismo de regulación por el cual en condiciones fisiológicas la concentración del ácido úrico estaría cerca de condiciones saturantes y ocurriría la cristalización tan sólo con pequeños excesos de este producto liberado durante una situación de daño celular ocasionada por una infección o por situaciones de estrés.

Otras moléculas que aparecen como señal de peligro para el sistema inmune son los nucleótidos intracelulares como el ATP y UTP los cuales están implicados en el metabolismo energético y normalmente se encuentran en el citosol de las células. Sin embargo, se liberan en condiciones de hipoxia, isquemia, inflamación e incluso de estrés mecánico pudiendo activar a las DCs [232].

#### 3.3.1.4 Vía de señalización CD40-CD40L

**E** l desarrollo de la inmunidad adquirida depende de la señalización de CD40 por su ligando, CD154. Estas moléculas gobiernan la magnitud y calidad tanto de respuestas inmunitarias humorales como celulares.

El CD40 es una glicoproteína transmembrana que se expresa en la superficie de DCs, macrófagos, células epiteliales, progenitores hematopoyéticos y linfocitos T activados [241]. En cambio, su ligando, CD154 es una proteína integral de membrana que se encuentra en linfocitos B activados, plaquetas activas y linfocitos T, también activados [242]. Además, en respuestas inflamatorias otras células como los monocitos de sangre periférica, las células endoteliales vasculares humanas, células musculares y fagocitos mononucleares también expresan CD154.

Además de los activadores solubles mencionados anteriormente, las DCs también reciben señales madurativas a través de contactos celulares. Una de las vías de señalización más estudiada ha sido el CD40-CD40L [243]. Desde los años 80-90, se conoce que las DCs que presentan el antígeno a linfocitos T, los activan de forma específica y que a su vez, las DCs, reciben una potente señal estimuladora mediante la interacción CD40-CD40L [74, 244]. Esta vía de activación acentúa en las DCs su destreza en la presentación antigénica [138, 245]; la producción de citocinas [246] y quimioquinas; y muestran una prolongada supervivencia.

La activación vía CD40 resulta, a través de las cascadas de señalización de MAPK y NF- $\kappa$ B, en la transcripción de genes diana para efectos fisiológicos como la producción de mediadores inflamatorios así como factores antiapoptóticos [247] fundamentales en la maduración de las APCs [248].

Tan potente es la vía de señalización que se ha descrito que la simple unión a CD40 es óptima para inducir maduración en DCs; aunque la presencia de coactivadores como los agonistas para los TLRs mejoran/potencian su actividad [249].

La maduración en DCs induce la regulación positiva de un gran número de moléculas coestimuladoras (CD54/ICAM-1, CD58/LFA-3, CD80/B7-1, y CD86/B7-2) que pueden, a su vez, expandir y diferenciar a linfocitos T. Así pues, indirectamente, la señalización de CD40 en APCs ejerce un profundo impacto en el desarrollo de la inmunidad de células T.

Del mismo modo, la interrupción de las interacciones CD40/CD40L puede resultar en una inadecuada presentación antigénica, resultando en algunos casos tolerancia inmunológica. Por eso, el bloqueo de CD40/CD40L se ha utilizado para el tratamiento de algunas enfermedades autoinmunitarias [250] y para la inducción de tolerancia en una situación de trasplante [251].

### 3.3.2 Combinación de estímulos

**E**n un contexto fisiológico, las DCs se exponen secuencial y estocásticamente a distintos estímulos: inicialmente, en la periferia, con productos microbianos y citocinas proinflamatorias; y tras la migración a órganos linfoides secundarios, con la interacción celular (y sus consecuencias) proporcionada por linfocitos T. Así pues, algunas DCs se verán expuestas sólo a citocinas inflamatorias, mientras que otras células estarán condicionadas tanto por citocinas como por productos bacterianos.

Existen numerosos estudios que documentan como distintos estímulos pueden cooperar o sinergir en la inducción de aspectos particulares en la maduración de las DCs. Estos estímulos pueden actuar como condicionadores (ejemplo: IFN- $\gamma$ ) [252], como inductores específicos (distintos TLRs) [253, 254] o como amplificadores (CD40-CD40L) [249] en la producción de citocinas. Pero también, existen casos en que la actuación de dos receptores innatos puede resultar en una regulación negativa [255]. Estos mecanismos de regulación permiten la presentación de antígenos microbianos a linfocitos T CD4+, evitando la presentación simultánea de antígenos propios fagocitados produciéndose así, grandes cantidades de una citocina determinada en el contexto de presentación de antígenos relevantes.



### 3.3.3 Tiempo de activación

**S**e ha descrito la importancia de un estímulo sostenido para la activación del sistema inmune. En este sentido, existen evidencias claras sobre el papel crucial de la duración del estímulo para la activación de las DCs. A modo de ejemplo; se ha observado que la estimulación temprana y corta es suficiente para la sobreexpresión de moléculas MHC, coestimuladoras y el CCR7. Sin embargo, para la producción de citocinas, la señalización a través de TLR4 debe ser sostenida hasta coincidir con la transcripción de los genes para las citocinas (IL-6, IL-10 e IL-12p70). También se ha propuesto el papel que juega la señalización a través de CD40 en la regulación de la migración y en la producción de citocinas de DCs humanas [256]. En el estudio anteriormente mencionado, se muestra que la señal débil y transitoria a través de CD40 es suficiente para inducir la expresión de CCR7; mientras que una señalización fuerte y persistente induce secreción de citocinas, aunque en este caso la estimulación prolongada se asoció con un bloqueo de la migración.

La producción de citocinas en DCs no sólo viene determinada por la combinación de distintos estímulos sino también por el orden en que estos estímulos tienen lugar. Citando algunos ejemplos, podríamos apuntar que IFN- $\gamma$  incrementa la producción de IL-12p70 sólo si tiene lugar antes la presencia de los agonistas por los TLRs y que también se consigue este efecto cuando primero existe la señalización por TLR3 o TLR4 antes que por TLR8 [253]. Finalmente, señalar también que la máxima estimulación vía CD40 es efectiva cuando tiene lugar después del estímulo a través de TLR [249]. Este orden temporal parece resultar adecuado y lógico pensando en los eventos que tienen lugar durante la maduración de DCs en condiciones fisiológicas.

La activación viene definida por la suma temporal de señales discretas recibidas a distintos tiempos, alcanzando el umbral de activación sólo por encima de cierta concentración de estímulos que persisten en un cierto tiempo. Existe una ventana temporal en la cual varias señales pueden acumularse e integrarse. Esta integración es óptima mientras los genes de las citocinas se están expresando. En

tiempos posteriores a la estimulación, las DCs se “agotan”, deteniendo la producción de citocinas y convirtiéndose en refractarias a estimulaciones ulteriores [181, 257].

Dependiendo del estímulo o estímulos que han desencadenado la maduración de las DCs se han observado numerosas variaciones funcionales y fenotípicas tanto cualitativas como cuantitativas [195, 258, 259]. Ello implica que no todos los tipos de DCs que aparecen fenotípicamente maduras son funcionalmente equivalentes. En este sentido cabe destacar que mientras una DC plenamente madura puede presentar un estado de “agotamiento” en cuanto a la producción de citocinas, existen DCs semimaduras por el TNF que pueden ser activadas posteriormente y secretar citocinas tras la inicial exposición a TNF aunque esta respuesta secundaria sea menos acentuada [260].

Se cree que la naturaleza de dicho estímulo condiciona el proceso de maduración, y que conduce a las células a seguir con el tipo de respuesta inmunológica más adecuada para combatir el microorganismo invasor [259, 261]. Además, se han descrito múltiples estadios de maduración que condicionan el modo de estimulación de los linfocitos T, promoviendo distintos tipos de respuestas efectoras [262].

## 4. INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA Y LA TOLERANCIA INMUNOLÓGICA MEDIADA POR DCs

### 4.1 COORDINACIÓN ENTRE COMPONENTES DEL SISTEMA INNATO Y DEL SISTEMA ADQUIRIDO



Las DCs atraen los efectores inmunes a través de quimiocinas [40] y regulan su

maduración y función a través del contacto célula-célula y/o factores solubles [263]. Esta regulación de la respuesta inmunitaria se realiza a través de un programa coordinado de secreción de quimiocinas atrayendo a los principales efectores celulares en cada una de las etapas que componen una respuesta inmune frente a un microorganismo [264] (Figura 7).

Figura 7. La coordinación por parte de las DCs del sistema inmune

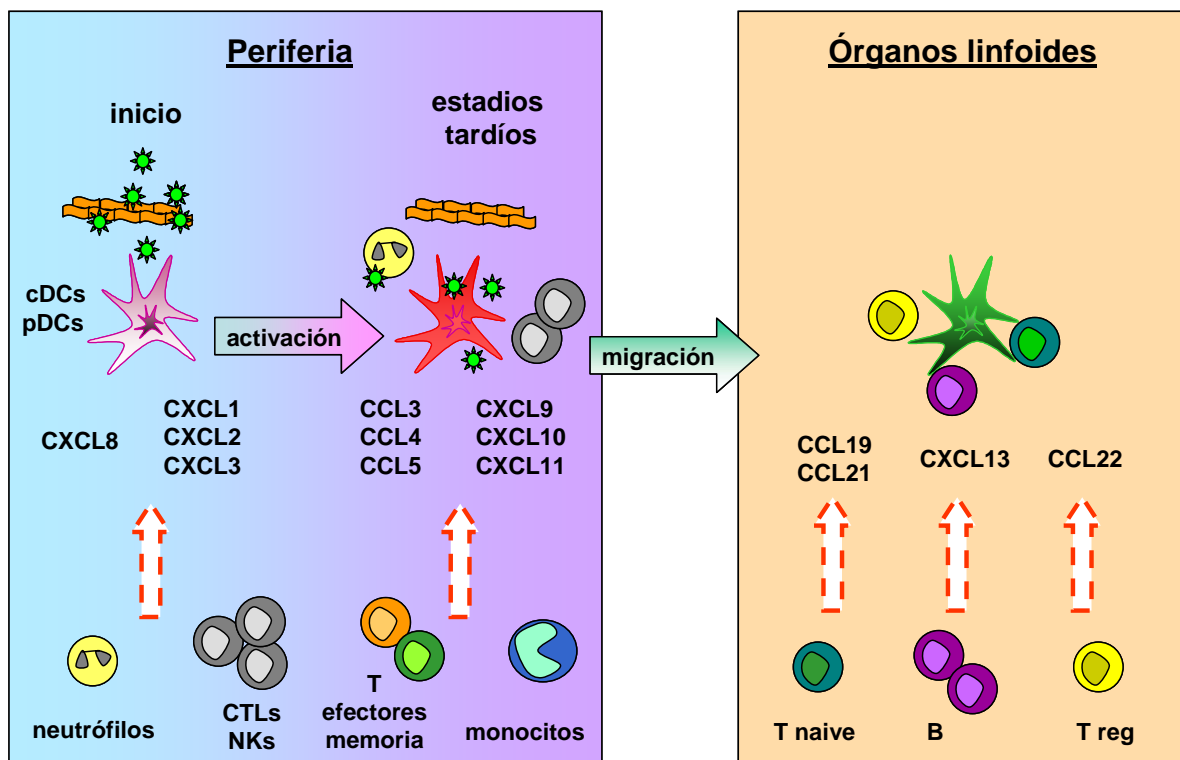


Figura 7. Estudios *in vitro* han demostrado que las primeras quimiocinas liberadas (2-4 horas) atraen efectores innatos: CXCL1, 2, 3 para células NKs y CXCL8 para neutrófilos. La segunda oleada de producción de quimiocinas (CXCL9-11 y CCL3-5) se produce entre las 4 y 8 horas atrayendo a linfocitos T memoria activados y a los macrófagos. Finalmente, en estadios posteriores (más de 12 horas) cuando las DCs maduras alcanzan los órganos linfoides secundarios, secretan CXCL13 para promover la actuación de linfocitos B y T especializados en respuesta humoral; CCL19 y CCL21 para linfocitos T naives; y CCL22 para T reguladoras permitiendo finalmente el cese de la respuesta inmune. (*Immunological Reviews*, 2007)

## 4.2 INTERACCIÓN DE LAS DCs CON LAS CÉLULAS DEL SISTEMA

### ADAPTATIVO

Una respuesta inmune efectiva, y a la vez no perjudicial, resulta de la interacción entre la respuesta inmune innata (antígeno-no-específica) y la adaptativa (antígeno-específica); el vínculo entre las dos respuestas lo proporcionan las DCs. Como principales directores de orquesta, las DCs, organizan y transfieren la información que proviene del mundo exterior a las células del sistema adaptativo. Las principales dianas de las DCs, en general, incluyen los principales efectores de la respuesta inmunitaria: los linfocitos T y los B. En particular, las pDCs inducen la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas (Igs) gracias a su producción de IFN- $\alpha$  y de IL-6 [84]. Sin embargo, el objeto de estudio de esta tesis ha sido la respuesta que las pDCs generan sobre los linfocitos T.

Las DCs pueden inducir tanto una respuesta inmune activa como la generación de tolerancia inmunológica, cumpliendo así su principal función de dirigir respuestas inmunes adecuadas para cada situación.

#### 4.2.1 Activación de los linfocitos T

Una vez las DCs se han cargado con antígenos y han sido activadas por los microorganismos y por las células del sistema innato, migran hacia los órganos linfoides. En este punto, las DCs pueden interactuar, además de la interacción MHC-TCR, con los linfocitos a través de, al menos, cuatro familias de moléculas:

- citocinas
  - miembros de la familia B7: CD80 (B7-1); CD86 (B7-2); ICOSL (*Inducible Costimulator Ligand*); PD-L1 (Programmed Death Ligand 1, B7-H1); PD-L2 (B7-DC); B7-H3 y B7-H4. Todos ellos expresados en DCs y macrófagos [265]
  - miembros de la familia TNF: TNF y su receptor; CD40/CD40L; CD70; 4-1BBL y OX40L [266]
- moléculas de adhesión

Las respuestas de los linfocitos T frente a la presentación antigénica dependen de tres señales:

- señal 1 (complejo péptido-MHC)
- señal 2 (interacción moléculas coestimuladoras y sus ligandos)
- señal 3 (señal polarizadora: factores solubles o unidos a membrana)

El modelo de las tres señales integra los sistemas de señalización involucrados en el reconocimiento y activación recíproca T-DC.

La interacción del complejo péptido-MHC II con el TCR de los linfocitos T constituye la primera señal, denominada "señal 1". La interacción péptido-MHC/TCR es de baja afinidad y necesita la presencia de moléculas de adhesión como LFA-1, CD11b, CD2, CD54/ICAM-1, CD58/LFA-3, DC-SIGN (ligando de ICAM-3) que actúan estabilizando la etapa inicial de contacto entre DCs y los linfocitos T, permitiendo la formación de una sinapsis inmunológica [168]. La primera señal induce la expresión del CD40L en la superficie de los linfocitos T.

Una segunda señal es igualmente necesaria para la activación de los linfocitos. Ésta proviene de las moléculas de coestimulación CD80, CD86, CD40 expresadas en la membrana de las DCs maduras. Sin esta segunda señal, la activación de los linfocitos T no ocurre, y tiene lugar el fenómeno de anergia. Las moléculas coestimuladoras, especialmente CD40, son determinantes en la decisión entre tolerancia e inmunidad [267]. La interacción CD40/CD40L induce la maduración definitiva de la DC, traduciéndose en el incremento de la expresión de CD80 y CD86 en la superficie de la

DC y en la secreción de citocinas como IL-1, TNF y IL-12. Otras moléculas tales como OX40-Ligand y el 4-1BB-Ligand pueden igualmente coestimular a los linfocitos T CD4+ y CD8+, respectivamente. Otros receptores que pertenecen a la familia del TNF pueden participar en este diálogo entre los linfocitos y las DCs, por ejemplo la interacción de la molécula TRANCE expresada en la superficie de las DCs y RANK por parte de los linfocitos T permite la secreción de citocinas y un incremento en la supervivencia por parte de las DCs [25].

Además de iniciar la respuesta de los linfocitos T, las DCs pueden influir en el tipo de respuesta inducida, es decir en la polarización Th1/Th2 o bien la generación de linfocitos T reguladores [268] gracias a la tercera señal.

A este respecto, se han propuesto diferentes teorías. La primera se basa en el linaje de las DCs. En el hombre se ha descrito que las DCs derivadas de monocitos activadas gracias al CD40L secretan IL-12 y en consecuencia pueden inducir una polarización de los linfocitos T naive hacia un tipo Th1, mientras que las pDCs no producen IL-12, y se asocia con una inducción de una respuesta preferentemente de fenotipo Th2 [76]. En el ratón, Pulendran y col. demostraron que las DCs de bazo CD8+ inducen una respuesta de fenotipo Th1, mientras que las CD8- inducen una polarización de los linfocitos con fenotipo Th2 [269]. Sin embargo, diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* apuestan por la teoría de la plasticidad. En efecto, varios grupos de trabajo han demostrado que las cDC pueden inducir no solamente una respuesta del tipo Th1 sino también Th2 [270, 271]. Esta polarización podría ser regulada por señales microambientales captadas por las DCs. A esta señal microambiental se la ha denominado tercera señal o "señal 3" [77].

Dos grupos de señales pueden inducir una diferenciación de la respuesta a Th1:

- 1) los estímulos bacterianos y virales (por ejemplo: LPS, secuencias CpG, RNA de doble cadena)
- 2) señales provenientes de los linfocitos (por ejemplo: CD40L, IFN- $\gamma$ ).

En cambio, la diferenciación *in vitro* hacia Th2 puede inducirse por parte de la IL-10, el TGF- $\beta$ , PGE2, los esteroides y el OX40-Ligand [80], entre otros.

Según el tipo de patógeno, la tercera señal proporcionada puede ser diferente y no tiene porqué producir el mismo tipo de respuesta: en el ratón, el LPS derivado de *Escherichia coli* (*E. Coli*) engendra un tipo de respuesta Th1, mientras que el LPS de *Porphyromonas gingivalis* induce una respuesta del tipo Th2 [272]. Además, la localización de las DCs y el microambiente que las condiciona pueden influir en el tipo de respuesta que se genera. Se ha descrito que las DCs murinas obtenidas a partir de bazo inducen preferencialmente una respuesta del tipo Th1, mientras que las aisladas a partir de placas de Peyer, de hígado, y del tracto respiratorio inducen un perfil Th2.

Según A. Lanzavecchia, una DC modula la respuesta inmune en función del tiempo en que dispone de capacidad para iniciar una respuesta Th1 o Th2, en función también de su estado de maduración y de su diferenciación final; pasando de un estado activo (Th1) a un estado celular de "agotamiento" (Th2) [181].

Las DCs maduras, llegan a las zonas T de los órganos linfoides secundarios, interactúan con los linfocitos T naive los cuales recirculan permanentemente. Una característica exclusiva de las DCs es que son las únicas APC capaces de estimular linfocitos T naive tanto *in vitro* como *in vivo* [12]. Esta característica particular va ligada al hecho de que las DCs expresan en superficie determinadas moléculas que las otras APCs no pueden sintetizar, o bien presentan una elevada densidad de moléculas implicadas en la interacción DC-T. Según Inaba y col., las DCs expresan de 10 a 100 veces más complejos MHC-péptidos que las otras APCs, y esta propiedad podría explicar su competencia para activar a los linfocitos. Sin embargo, existe controversia al respecto. Otra teoría propuesta por Turley, sugería que solamente la presencia de grupos de moléculas de MHC II y de moléculas de costimulación CD86 serían las responsables de su superioridad para presentar el antígeno. Estas agrupaciones provendrían de vesículas de transporte denominadas CIIV, las cuales están presentes en las DCs inmaduras.

Tras la maduración, estas vesículas desaparecerían y las moléculas como MHC II y CD86 serían expresadas en la superficie de las DCs, permitiendo así la presentación del antígeno [139].

Finalmente, las DCs sensibilizan a los linfocitos T naive a un estado de inmunidad [273-275] o tolerancia [276, 277], dependiendo de la modulación de las tres señales proporcionadas y de la naturaleza de las DCs [278, 279].

#### 4.2.1.1 Respuesta inducida en linfocitos T alogénicos

**E** l alo-reconocimiento ocurre cuando el sistema inmune del huésped reconoce como extraños antígenos del donante y en consecuencia se produce una reacción inmunológica. Existen tres mecanismos distintos, pero no mutuamente excluyentes, por los que las DCs pueden sensibilizar a linfocitos T alo-reactivos: la vía directa, la vía indirecta y la vía semidirecta [280-282] (ver **Figura 8**).

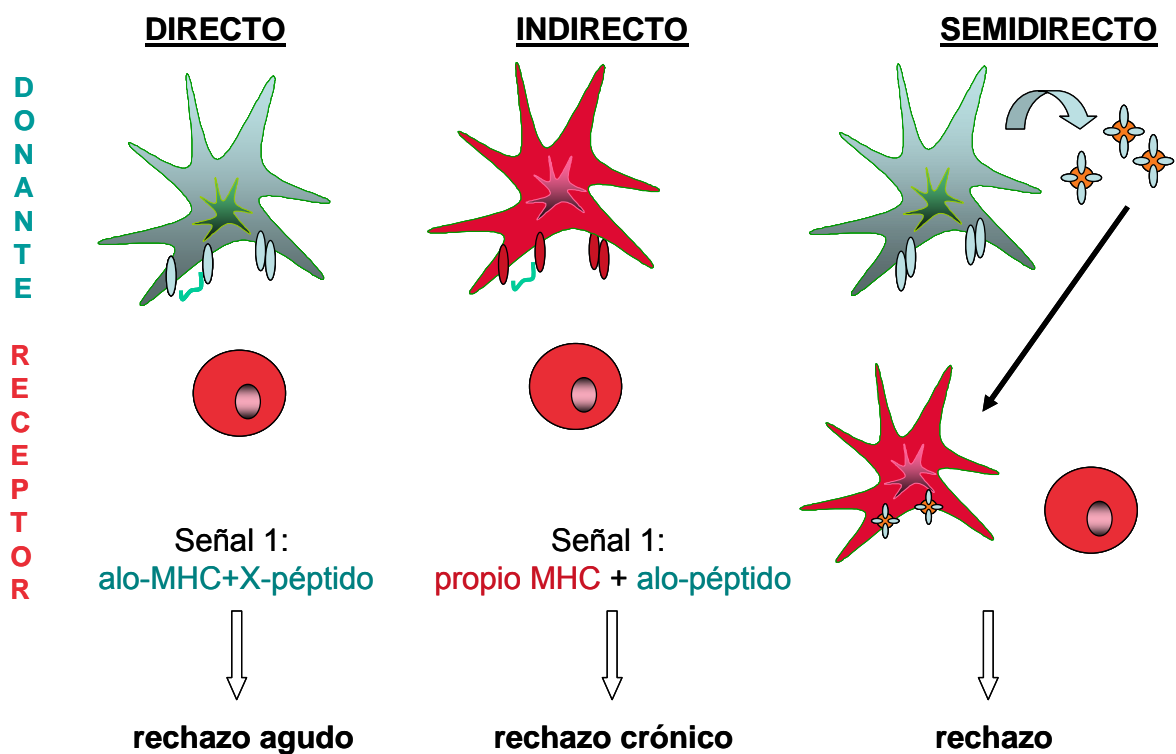
La vía directa resulta del reconocimiento de moléculas extrañas de MHC en la superficie del donante por los linfocitos T del receptor. Es decir, esta vía es iniciada por las DCs del donante que presentan moléculas MHC intactas del propio donador. Por el contrario, la vía indirecta ocurre cuando las moléculas del MHC del donante son internalizadas, procesadas y presentadas como si se tratara de antígenos propios por las APC del huésped. Así pues, las DCs del huésped procesan y presentan moléculas MHC del donante como péptidos. El alo-reconocimiento por vía directa se encuentra más relacionado con el rechazo agudo [283] y el mecanismo indirecto con el rechazo crónico [284].

La importancia de la vía de presentación indirecta se va dilucidando con el tiempo. La presentación cruzada, originariamente, fue contemplada como un fenómeno oscuro asociado a la inmunidad del trasplante. Sin embargo, ahora se aprecia como un mecanismo principal por el cual el sistema inmune rastrea tejidos para la detección de la presencia de antígenos no propios [285, 286].



Por otro lado, la vía semidirecta es otro mecanismo por el cual los linfocitos T autorreactivos son activados a través del reconocimiento de moléculas MHC alogénicas. Se produce gracias a la transferencia intacta de moléculas MHC desde la superficie de células del donador a la superficie de DCs y estas moléculas adquiridas son las que pueden activar a los linfocitos T. Existen estudios que demuestran que las DCs son capaces de liberar moléculas MHC solubles y vesículas (denominadas exosomas) que expresan MHC I y II además de moléculas coestimuladoras que pueden ser capturadas por otras DCs [287-289]. El resultado de la vía semidirecta es que una APC puede estimular, a la vez, de un modo directo a linfocitos T CD8 y de forma indirecta a linfocitos T CD4.

Figura 8. Mecanismos de alo-reactividad



De hecho, el papel inmunogénico por parte de las DCs se puso de manifiesto inicialmente en una situación de trasplante. Para ello se utilizaba un modelo de cultivo celular, denominado reacción mixta leucocitaria (*mixed leukocyte reaction*, mlr), que simula el rechazo del injerto [10]. Los mlr detectan incompatibilidades génicas entre los MHC de los donadores y receptores de órganos trasplantados. Estas incompatibilidades que se dan con alta frecuencia debido al enorme polimorfismo del MHC y que permite una respuesta por parte de los linfocitos T, típica en un rechazo contra el injerto.

Así pues en este trabajo para determinar el papel que los dos subtipos de DCs (cDCs y pDCs) juegan en la respuesta inmune, hemos utilizado un modelo de presentación antigénica directo (cDCs y pDCs de un mismo individuo frente a linfocitos T naive de otro individuo).

#### 4.2.1.2 Inhibición farmacológica de la respuesta inmune. Los inmunosupresores (IS)

**L**a desregulación inmunológica tiene un importante papel patológico en un amplio abanico de enfermedades inflamatorias, incluyendo las respuestas de hipersensibilidad a antígenos medioambientales (afectaciones alérgicas), el reconocimiento erróneo a antígenos propios (enfermedades autoinmunes). Por otra parte, el ataque inmune a antígenos extraños en una situación de trasplante (rechazo y *GvHD*) aún siendo la respuesta no patológica, sí es “no adecuada” al contexto. Para tratar y paliar estas alteraciones se han utilizado agentes terapéuticos, denominados comúnmente inmunosupresores.

Los linfocitos T actúan como los principales efectores inmunes pudiendo causar daño tisular en numerosas enfermedades inmunológicas. Por ello, se los ha considerado como las dianas celulares más relevantes para los inmunosupresores [290-294].

Todos los fármacos utilizados en clínica como inmunosupresores inhiben la activación de los linfocitos T ya sea a través de un efecto citotóxico directo (ciclofosfamida); de la inhibición en la síntesis *de novo* de purinas y pirimidinas (azatioprina, AZA; mofetil micofenólico, MM); por la inhibición de su respuesta (rapamicina o sirolimus) [295] o por la disminución en la producción de linfo-citocinas (ciclosporina, CsA; o tacrolimus, FK506) [296]. Así pues y como ya he mencionado anteriormente, la aplicación de este tipo de drogas ha tenido una importancia primordial en el ámbito clínico ya sea para evitar el rechazo en una situación de trasplante como también para el tratamiento de ciertas enfermedades autoinmunitarias. En una situación de trasplante, el uso exclusivo o combinado de estos fármacos ha permitido incrementar significativamente la supervivencia del injerto [297].

Sin embargo, estos productos farmacológicos tienen un vasto efecto inmunosupresor pudiendo causar severos estados inmuno-comprometidos en los pacientes [298, 299]. Se ha descrito que influyen sobre todas las subpoblaciones de linfocitos T, afectando a la memoria inmunológica en respuesta a una infección vírica; facilitando su diseminación y promoviendo así alteraciones linfo-proliferativas en pacientes tratados a largo plazo [300, 301].

Por eso, un tratamiento ideal de inmunosupresión sería aquel que prevendría la respuesta inmune contra los aloantígenos presentes en el injerto sin impedir la actuación de la memoria inmunológica pre-existente. Por lo tanto, se está considerando una estrategia inmunosupresora alternativa: la modulación de la función de las APCs [302]. Estas drogas prevendrían la plena activación de las APCs pudiendo ser mejores candidatos que los agentes inmunosupresores convencionales que inhiben de forma generalizada la activación de los linfocitos T.

Por ello, deben ser consideradas las DCs como potenciales dianas terapéuticas [303-308] ya que son las responsables de iniciar las respuestas T antígeno-específicas [12]. Numerosas evidencias han puesto de manifiesto que los inmunosupresores afectan la diferenciación y función de las DCs, tanto *in vitro* como *in vivo* [309, 310].

Como acabo de mencionar, se han caracterizado ampliamente en ensayos *in vitro* los efectos de los agentes inmunosupresores en funciones específicas de las DCs (captación de antígeno, maduración, migración y estimulación de linfocitos T) [309]. Sin embargo, se han llevado a cabo pocos estudios para evaluar la acción de estos agentes farmacológicos sobre el número y función de DCs en receptores de un órgano trasplantado [311-313].

Por lo que a la maduración de DCs se refiere, se han descrito diversos inmunosupresores y otros agentes terapéuticos que alteran esta función como son los glucocorticoides (GC) [305, 314], la vitamina D [315-318] o el MM [318]. Además de la rapamicina, el FK506 y la ciclosporina A [319]. Estos agentes tienen distinto mecanismo molecular de acción y muestran diferentes perfiles de inmuno-regulación [320] (Tabla 4: resumen de la acción de distintos inmunosupresores en la biología de las DCs).

Numerosos estudios sugieren que el mantenimiento de las DCs en condiciones inmaduras o en un estado de semi-maduración puede ser efectivo para la prevención del rechazo y a favor de la tolerancia al injerto [321].

#### Agentes anticalcineurínicos (FK506 y CsA)

A pesar de no estar relacionados químicamente, la ciclosporina y el tacrolimus se unen e inhiben la misma proteína, la calcineurina, a través de una vía de señalización dependiente de calcio [322]. La CsA se une a la ciclofilina A, mientras que el FK506 se une a la proteína de unión a FK (FKBPs) [323], resultado de lo cual se inhibe la transcripción de IL-2 y otras linfo-citocinas.

El FK506, es un producto de *Streptomyces tsukubaensis* que muestra similitudes estructurales con la rapamicina y que es capaz de inhibir respuestas inmunes de 10 a 100 más potente que la CsA [324, 325].

La presencia de CsA o tacrolimus, durante un largo periodo de tiempo, inhibe algunos de los parámetros biológicos de las DCs [309]. Y no sólo los de las DCs, sino que se atribuye un nuevo concepto a los inhibidores de la calcineurina y es que bloquean tanto la activación de la DC hacia los linfocitos T (DC-T) como las señales madurativas de los linfocitos hacia las DCs (T-DC). Esta inhibición bidireccional que se produce en la comunicación DC-T durante la presentación del antígeno es una característica exclusiva de los inhibidores de la calcineurina ya que no se produce en la inmunosupresión con rapamicina [320].

La rapamicina difiere claramente de los inhibidores de la calcineurina (CsA o tacrolimus) en su perfil immuno-regulador *in vivo*. Esta diferencia se ha observado en modelos animales de enfermedades inmunológicas [326, 327]. Inhibe varios aspectos funcionales de las DCs como son la captación del antígeno [328, 329], la secreción de citocinas y la capacidad de aloestimar linfocitos T tanto *in vitro* como *in vivo* a niveles clínicamente relevantes [330, 331]. A pesar de la similitud estructural con el FK506; incluso formando complejo con FKBP (proteína de unión a FK), la rapamicina interactúa con una proteína distinta a la calcineurina, el mTOR [332].

A diferencia de otros inmunosupresores utilizados comúnmente, la rapamicina no interfiere en la inducción de tolerancia [333], permite la expansión tanto *in vitro* como *in vivo* y preserva la función supresiva de los linfocitos T reguladores (Treg). Estos linfocitos incluyen tanto CD4+CD25+Foxp3+ como Treg de tipo 1 (Tr1) en ratón y humanos.

Tabla 4. Resumen de la acción de distintos inmunosupresores en la biología de las DCs

IS o agentes antinfl.	Captura del antígeno	Presentación antigénica		Fenotipo de DCs		Citocinas liberadas				Quimiocinas y receptores	Muerte celular
		Alost.	Pép-sp	CS	MHC	IL-10	L-12	TNF	IFN- $\alpha$		
<b>RAPA</b>	INHIBICIÓN	INHIBICIÓN		-/0	-/0	-	-/0			CCR5= CCR7 $\uparrow$	+/-
<b>CsA</b>	NO EFECTO	INHIBICIÓN		0/-	0	0/+	0/-	-	-	CCR5= CCR7 =	NO EFECTO
<b>FK506</b>	NO EFECTO	INHIBICIÓN		0	0	0	0/-	-		CCR5= CCR7 =	NO EFECTO
<b>Cortico-esteroides</b>	INCREMENTO	INHIBICIÓN		-	-/0	+	-	-	-	CCR5= CCR7 $\downarrow$	INCREMENTO
<b>Vit D y análogos</b>	INCREMENTO	INHIBICIÓN		-	-	+	-		0	CCR7 $\downarrow$	INCREMENTO

IS: inmunosupresores; RAPA: Rapamicina; CsA: Ciclosporina; FK506: Tacrolimus; Vit D: vitamina D. Símbolos: - supresión; + incremento; 0 no efecto

### 4.3 TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

**E** l sistema inmune no sólo tiene la capacidad de reconocer y eliminar lo ajeno o extraño, sino también está programado para ignorar componentes propios a través de mecanismos de tolerancia que permiten no dañar al propio organismo [334].

#### 4.3.1 MANTENIMIENTO DE LA TOLERANCIA POR DCS

Las DCs aparecen como un elemento esencial en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica tanto a nivel tímico como a nivel periférico [281, 285, 334, 335]. Por eso, en la etiopatogenia de numerosas enfermedades autoinmunitarias, se ha observado una alteración tanto cuantitativa como cualitativa de las DCs.

##### 4.3.1.1 Tolerancia central

La tolerancia central, que tiene lugar en el timo o en la médula ósea, juega un papel crucial en la prevención del indeseado ataque a lo propio. Este tipo de respuestas se previenen a través de una variedad de mecanismos que ocurren a distintos niveles del desarrollo del sistema inmune [334, 336]. Muchos de los auto-antígenos periféricos son expresados por las células epiteliales presentes en la médula tímica (proceso controlado por el regulador autoinmune AIRE) que son responsables de lo que se conoce como selección negativa [337]. Además, citocinas como TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*, TSLP) producida por células epiteliales presentes en los corpúsculos de Hassall tímicos, promueven la conversión de timocitos CD4+CD25- a linfocitos T reguladores CD4+CD25+Foxp3+ [338]. También las DCs presentes en el timo están implicadas en el proceso de tolerancia central [339].

Sin embargo, se ha descrito que las DCs de origen extratímico también juegan un papel importante en el desarrollo de los linfocitos T [340]. En este trabajo, se identificó la vía de reclutamiento (en el que varias moléculas de adhesión están implicadas) que permite a las DCs residentes en tejidos periféricos capturar el antígeno y acceder al timo. Así pues, esta vía permitiría incrementar el repertorio de antígenos presentados a los timocitos en desarrollo permitiendo que las DCs periféricas participen en la tolerancia central.

#### 4.3.1.2 Tolerancia periférica

El proceso de eliminación de linfocitos T autorreactivos no es perfecto, encontrándose algunos de estos linfocitos en periferia. Por eso es importante la existencia de mecanismos que contribuyan a la tolerancia periférica.

Entre ellos, las DCs maduras residentes en los corpúsculos de Hassall seleccionan linfocitos T reguladores en el timo para el mantenimiento de la propia tolerancia periférica, estableciendo un nexo entre tolerancia central y tolerancia periférica [338].

Sin embargo, las DCs de sangre periférica también están implicadas en el mantenimiento de este tipo de tolerancia (**Figura 9**). Se cree que, las DCs inmaduras no activadas presentan antígenos propios a linfocitos T autorreactivos de forma continua y, que en ausencia de coestimulación, inducen su anergia o deleción [341, 342]. Se ha descrito, que las DCs capturan cuerpos apoptóticos y/o restos celulares (*debris*) que provienen del recambio celular habitual (*turnover* celular); migran hacia los ganglios linfáticos y silencian a los linfocitos T que reaccionan a estos antígenos [13]. Se ha propuesto al subtipo convencional (cDC) como la célula más potente en la captación de cuerpos apoptóticos propios [343]. Este fenómeno necesita una regulación muy precisa, ya que la captura anormal de cuerpos apoptóticos podría inducir enfermedades autoinmunes sistémicas [344].

Además de la deleción de linfocitos T, las DCs tolerogénicas inducen la diferenciación y proliferación de linfocitos T con funciones reguladoras/supresoras. En este sentido ya ha sido bien establecido que la expansión por parte de DCs maduras de estos linfocitos T reguladores (Foxp3+, *Forkhead Box Protein 3*) antígeno-específicos tanto *in vitro* como *in vivo* [345].

La asociación de conceptos en el que se define a la DC inmadura como tolerogénica y a la DC madura como inmunogénica han sido modificados por la publicación de algunos estudios que concluyen que las DCs plenamente maduras



pueden inducir tolerancia y diferenciación de linfocitos T reguladores. Así pues, la existencia de varios estadios de maduración en DCs podría explicar el papel activo que juega este tipo celular (DCs tolerogénicas) en el mantenimiento de la tolerancia periférica [274]. Es la integración de diferentes señales que afectan a las DCs: la dosis de antígeno, el repertorio de citocinas en los lugares de inflamación, el encuentro con patógenos; lo que determinará si una DC se convertirá en tolerogénica o en inmunogénica.

Entre los mecanismos moleculares implicados en la función tolerogénica de las DCs periféricas cabe destacar:

- a) la falta y/o inapropiada coestimulación
- b) inducción de muerte celular mediante:
  - b.1) la expresión deIDO (Indoleamine 2,3-dioxygenase) la cual induce el catabolismo del triptófano
  - b.2) la interacción Fas/Fas-L
- c) secreción de citocinas como IL-10 y/o TGF- $\beta$
- d) receptores inhibidores

Figura 9. Papel de las DCs en la tolerancia periférica

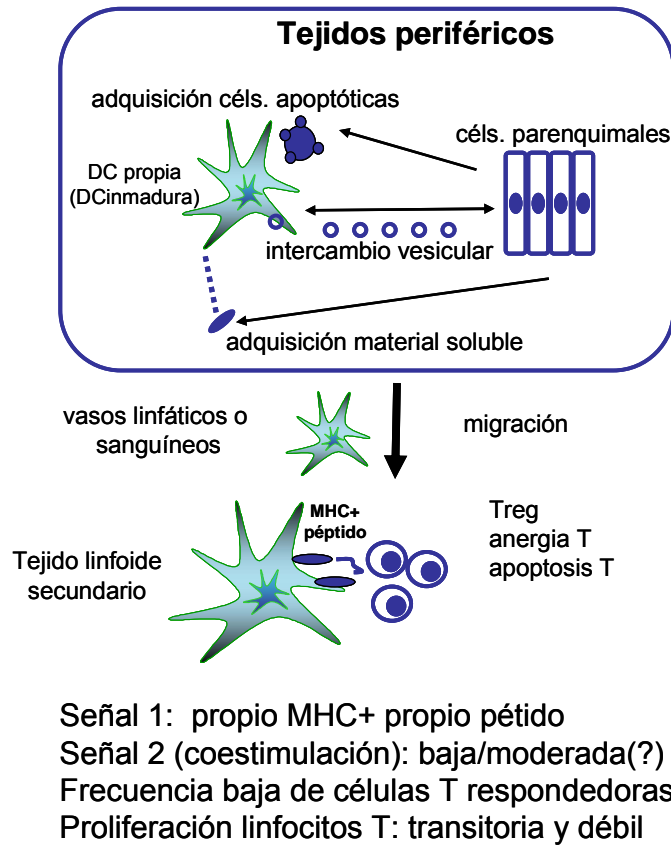


Figura 9. En ausencia de señales proinflamatorias o de peligro, las DCs residentes en tejidos periféricos capturan antígenos de sus propias células parenquimales a través de la endocitosis de moléculas solubles, del intercambio de vesículas y de la captación de células apoptóticas. Seguidamente, desde la periferia migran por vías endovenosas y linfáticas a los órganos linfoides secundarios. Una vez allí, las DCs presentan los propios antígenos a linfocitos T autorreactivos que han escapado de la selección tímica. Bajo condiciones fisiológicas, las DCs presentan bajos niveles de moléculas coestimuladoras e inducen una proliferación débil y transitoria de los T autorreactivos seguido de una delección o anergia y, probablemente de la generación de linfocitos T reguladores. (*Immunological Reviews*, 2003)

Aunque no existen marcadores específicos para las DCs tolerogénicas, la expresión de receptores ILT (*Inhibitory Immunoglobulin-Like Transcript*) podría ser una característica fenotípica [346, 347] asociada a la funcionalidad de este tipo de células dendríticas.

Por otra parte, el CD80, CD86 y CD83 son marcadores utilizados, normalmente, para determinar el estado de maduración de las DCs [12]. Sin embargo, su regulación positiva no es necesariamente indicativo de la capacidad de las DCs para inducir inmunidad.

Otras moléculas coestimuladoras, como ICOSL están presentes en las distintas APCs (incluyendo linfocitos B, monocitos, DCs y macrófagos) y sólo la elevada expresión de esta molécula (ICOSL) se encuentra restringida a los subtipos de DCs (cDCs [348] y pDCs [113]) especializados en la inducción de T reguladoras.

También PD-L1 y PD-L2 (pertenecen a la familia B7) están especialmente involucradas en la inducción y el mantenimiento de la tolerancia [265] ya que se engloban dentro del subtipo de coestimuladores negativos. Ambas moléculas unen PD-1 induciendo potentes señales inhibitorias [349].

Como ya se ha mencionado en el apartado “subtipos de DCs”, existen trabajos que demuestran que las pDCs también están implicadas en la inducción de tolerancia. Se ha observado, que son capaces de generar linfocitos productores de IL-10, tanto para los CD4 [113] como para los CD8 [108]. Además, se ha demostrado *in vivo* que la depleción de pDCs contribuyen al aumento de la hipersensibilidad respiratoria en modelos murinos [350].



# 2

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## HIPÓTESIS

**E**xisten dos subtipos mayoritarios de DCs (cDCs y pDCs) que pueden interaccionar entre sí en el contexto de la respuesta inmunitaria. Ambos subtipos celulares están implicados en el inicio de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa.

Nuestra hipótesis inicial de trabajo considera que ambos subtipos de DCs participan en la generación de una respuesta inmune fisiológica, en la que la cDC lleva a cabo preferentemente la captura y presentación de antígenos y la pDC puede colaborar en la modulación de la respuesta inmune. El papel modulador de la pDC depende en gran medida de múltiples factores derivados de la dinámica de la propia respuesta.

### Consideraciones previas

Estudios previos han permitido establecer que ambos subtipos de DCs -tanto las cDCs como las pDCs como poblaciones aisladas- pueden inducir respuestas del tipo Th1, Th2, incluso T reguladoras, cuando han sido previamente estimuladas. Nuestro interés se centra en averiguar cómo se modifica la respuesta inmunitaria, tomando como ejemplo la respuesta alogénica, cuando ambos subtipos están presentes.

## OBJETIVOS

**E**ste estudio tiene como objetivo principal la determinación del papel que juegan los distintos subtipos de DCs en la respuesta inmune, en un modelo de presentación alogénica, y evaluar si la combinación de ambos subtipos de DCs puede contribuir al tipo de respuesta inducida en linfocitos T naive.

Como objetivos concretos se contemplan:

1-. El aislamiento de las dos subpoblaciones de DCs a partir de sangre periférica de individuos adultos sanos, con el fin de valorar la capacidad aloestimuladora de las pDCs, cDCs y la combinación de ambos subtipos.

2-. El estudio de la aloproliferación inducida en linfocitos T naive y la evaluación de su fenotipo funcional, determinando la expresión de marcadores de superficie y el perfil de citocinas inducido.

3-. La determinación de los factores y/o mecanismos que contribuyen a la maduración de las pDCs durante la respuesta alógena, la definición de marcadores de activación celular a nivel fenotípico y funcional, y su posible modulación farmacológica.



3

RESULTADOS



Los resultados obtenidos se muestran mediante un compendio de tres artículos publicados que forman parte del proyecto que se ha desarrollado sobre la caracterización de la biología celular de los dos subtipos mayoritarios de células dendríticas (DCs). El conjunto de estos trabajos, aportan nuevos aspectos sobre la interacción entre las subpoblaciones de DCs permitiendo la elaboración de la presente tesis doctoral que lleva por título "Respuesta alogénica inducida por células dendríticas plasmacitoides. Factores implicados en su activación".

A continuación, se detallan con un breve resumen cada una de las publicaciones:

---

#### Resultados I

Primary Alloproliferative TH1 Response Induced by Immature Plasmacytoid Dendritic Cells in Collaboration with Myeloid DCs.

M. Naranjo-Gómez, M.A. Fernández, M. Bofill, R. Singh, C.V. Navarrete, R. Pujol-Borrell and F.E. Borràs. *American Journal of Transplantation* 2005; 5: 2838-2848

1.- El primer trabajo, describe la interacción y el sinergismo por parte de los subtipos de DCs (convencionales y plasmacitoides) en la respuesta inmune utilizando un modelo de presentación alogénica. Los resultados obtenidos, apuntan a las DCs convencionales como las principales células con capacidad aloestimuladora; mientras que, las DCs plasmacitoides sólo adquirirían esta propiedad si están previamente activadas. Este trabajo pone de manifiesto la interacción de cDCs y pDCs en la potenciación de la respuesta alogénica, traduciéndose en una mayor producción de IFN gamma por parte de los linfocitos T, una de las principales citocinas de perfil Th1. Posteriormente, se han publicado otros estudios que corroboran los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo (Lou Y. et al., 2007).

Expression and function of the IL-2 receptor in activated human plasmacytoid dendritic cells.

Mar Naranjo-Gómez, Harold Oliva, Nuria Climent, Marco A. Fernández, Marta Ruiz-Riol, Margarita Bofill, José M. Gatell, Teresa Gallart, Ricardo Pujol-Borrell and Francesc E. Borràs. *Eur. J. Immunol.* 2007. 37: 1764-1772

2.- La segunda publicación es un estudio ciertamente novedoso en el que se describe, por primera vez, la expresión del receptor para la interleuquina 2 (CD25) y los efectos de la unión de la citocina por su receptor en diversos aspectos celulares (supervivencia, fenotipo y secreción de citocinas) de la biología de las pDCs. Se propone al CD25 como un nuevo marcador de activación/maduración en la estimulación de pDCs.

Tacrolimus treatment of plasmacytoid dendritic cells inhibits dinucleotide (CpG)-induced tumour necrosis factor-alpha secretion

Mar Naranjo-Gómez, Nuria Climent, Joan Cos, Harold Oliva, Margarita Bofill, José M. Gatell, Teresa Gallart, Ricardo Pujol-Borrell and Francesc E. Borràs. *Immunology*, 2006. 119, 488-498

3.- El tercer trabajo describe con detalle el papel que juega el tacrolimus (FK506), un inmunosupresor de amplio espectro clínico, en la biología de las pDCs, las principales productoras de interferones de tipo I. Se presenta por primera vez, el efecto del FK506 en la inmunomodulación fenotípica y en la secreción de citocinas por parte de las pDCs y sus consecuencias en la inducción de la respuesta alogénica. Una aportación de conocimiento básico que podría trasladarse a estudios clínicos de diversas situaciones patológicas (transplante y tratamiento de enfermedades autoinmunes).

Como resumen global de los trabajos presentados, podemos apuntar que en el contexto de la respuesta inmune alogénica (y probablemente también en la respuesta inmune fisiológica o convencional) la cooperación entre los distintos subtipos de DCs contribuye a la inducción de una respuesta eficaz y dirigida específicamente a superar la situación de peligro planteada. La pDC, en este caso la subpoblación con menos estudios reportados en este contexto, recibiría estímulos tanto de los linfocitos T estimulados como de la propia cDC, y respondería a esta estimulación contribuyendo a la acción coordinada y conjunta de las tres poblaciones celulares para hacer frente a una respuesta inmune adaptativa adecuada.



3

RESULTADOS |





## Primary Alloproliferative TH1 Response Induced by Immature Plasmacytoid Dendritic Cells in Collaboration with Myeloid DCs

M. Naranjo-Gómez, M.A. Fernández, M. Bofill, R. Singh, C.V. Navarrete, R. Pujol-Borrell and F.E. Borràs

American Journal of Transplantation 2005; 5: 2838-2848

### RESUMEN

#### Antecedentes:

En sangre periférica, se han descrito dos subtipos mayoritarios de DCs (cDCs y pDCs). Normalmente, el papel que cada subtipo de DCs desempeña en la respuesta inmune se ha abordado de forma independiente. Para ello se han utilizado los dos subtipos de DCs como poblaciones aisladas. Sin embargo, poco se conoce sobre la interacción entre cDCs y pDCs y qué efecto podría tener en la inducción de la respuesta inmune.

#### Objetivos:

La finalidad de nuestro estudio es establecer cómo la interacción entre ambas subpoblaciones de DCs puede influir en la respuesta T generada, utilizando como modelo la respuesta alógena. Por otra parte, definir cómo la combinación entre pDCs, cDCs y linfocitos T (estimulación combinada) influye en la biología de las pDCs, identificando los mecanismos por los cuáles este tipo celular se activa durante la respuesta alógena

#### Resultados y Conclusiones:

Los resultados obtenidos indican que la presencia de ambos subtipos de DCs en los cultivos mixtos linfocitarios tienen un efecto sinérgico en la inducción de una potente respuesta Th1. En el contexto de la presentación antigénica, la presencia de factores solubles (IL-3) así como contactos celulares (CD40-CD40L), que son fundamentales para las pDCs, pueden contribuir a su maduración-activación que se

## ■ □ RESULTADOS I □ \_\_\_\_\_

refleja en el aumento de su capacidad estimuladora. Este hecho puede ser relevante no sólo *in vitro* sino también *in vivo* en el contexto de una respuesta antígeno-específica.

# Primary Alloproliferative TH1 Response Induced by Immature Plasmacytoid Dendritic Cells in Collaboration with Myeloid DCs

M. Naranjo-Gómez<sup>a</sup>, M.A. Fernández<sup>b</sup>, M. Bofill<sup>c</sup>, R. Singh<sup>d</sup>, C.V. Navarrete<sup>d,e</sup>, R. Pujol-Borrell<sup>a</sup> and F.E. Borràs<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Immunobiology for Research and Diagnosis (LIRAD). Blood and Tissue Bank (BTB). Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Institut Investigació Germans Trias i Pujol, Badalona (Barcelona), Spain

<sup>b</sup>Cytometry Unit, Institut Investigació Germans Trias i Pujol, Badalona (Barcelona), Spain

<sup>c</sup>Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), IrsiCaixa Foundation, Badalona (Barcelona), Spain

<sup>d</sup>Histocompatibility & Immunogenetics Research Group, Colindale Centre National Blood Service, London, UK

<sup>e</sup>Department of Immunology & Molecular Pathology, Royal Free & University College Medical School, London, UK

\*Corresponding author: Francesc E. Borràs, feborras@ns.hugtip.scs.es

**Key words:** Alloresponse, dendritic cells, graft versus host disease, plasmacytoid DCs, stem cell transplantation

**Received 11 April 2005, revised 26 July 2005 and accepted for publication 11 August 2005**

## Introduction

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from an allogeneic donor is the only available therapy for some diseases (1). A major complication of HSCT is the development of graft versus host disease (GVHD), in which T cells recognize alloantigens presented by antigen presenting cells (APCs) either by the direct or the indirect pathways. While donor T cells directly react against recipient major histocompatibility complex (MHC)-alloantigens on host cells, the indirect mechanism involves the presentation of host-derived peptides on donor APCs in the context of the MHC molecules. Dendritic cells (DCs) are a heterogeneous group of APCs endowed with the special characteristic to prime naive T lymphocytes (2). In adult peripheral blood and newborn cord blood, two main subsets of DCs, known as myeloid (MDC) and plasmacytoid (PDC) have been described (3–6). MDCs colonize peripheral tissues where they capture antigens, whereas PDCs are the main DC population found in tonsils (7), and are also found in inflamed tissues. MDC and PDC subsets may be identified by the differential expression of cytokine and chemokine receptors, and other surface markers (8).

The role played by the different DC subsets in the immune response to alloantigens after HSCT is not well established. Host DCs are known to stimulate donor T cells to initiate acute GVHD reactions (9). Also, graft DCs (donor DCs) may capture host antigens and present them to donor T cells, thus inducing a delayed GVHD via the indirect mechanism. *In vitro* experiments have shown that only freshly isolated MDCs may induce a strong T lymphocyte proliferation. PDCs require CD40 ligation, a signal provided by activated T cells (10) among others, to stimulate T-cell responses. Despite this inability of immature PDCs to induce alloresponse *in vitro*, some evidence suggests that this cell type may influence the outcome of the graft. For

**The role played by dendritic cell (DC) subsets in the immune response to alloantigens is not well defined. *In vitro* experiments have extensively shown that freshly isolated myeloid (M)DCs induce a strong T lymphocyte proliferation whereas plasmacytoid (P)DCs do not, unless activated by CD40 ligation. The aim of these studies was to explore whether the interplay among PDCs, MDCs and T cells modulates alloresponse. Freshly isolated MDCs and PDCs were merged in different proportions and used as antigen presenting cells (APCs) in mixed lymphocyte cultures (MLC). As described, isolated PDCs only induced a mild alloresponse, while MDCs were potent inducers of alloproliferation. Unexpectedly, when PDCs were merged with even low numbers of MDCs (down to 100 cells) and used as APCs, a potent Th1 cell proliferation was detected. Survival and maturation of PDCs was increased in these MLC conditions, which could partially explain the magnitude of the T-cell response. Interestingly, the proportion of IFN $\gamma$ -producing cells generated in such cultures was higher compared to MDC-stimulated cultures. These data suggest that the interaction between both DC subsets is determinant to generate a potent Th1 response, at least in an allogeneic situation, and may be relevant to the outcome of allogeneic stem cell transplantation.**

instance, PDCs have been associated with a lower incidence of chronic GVHD after bone marrow transplantation using HLA-identical donors (11). However, in HSCT using G-CSF mobilized peripheral blood stem cells (G-PBSC), chronic GVHD has been associated to the number of PDCs in the graft (12,13). G-PBSC is a common source of hematopoietic precursors that contain high numbers of PDCs (14,15). Apparently, the mechanism underlying this effect would be the development of a Th2 phenotype on the responder T cells induced by PDCs, which fits well with the described role of PDCs as a Th2-inducing cell type (16). However, both DC subtypes may induce naive T lymphocytes to differentiate toward a Th1 or Th2 functional phenotype following an appropriate stimulation, (8) and may also induce peripheral T-cell tolerance via different mechanisms (17–21). A recent report has shown that mice interferon-producing cells (such as PDCs) promote the expansion and Th1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells (22) in the lymph node, suggesting that both DC subsets may be important to drive the immune response.

The aim of this study was to explore whether the different subtypes of DCs may contribute to the nature and outcome of an allogeneic naive T-cell response, using *in vitro* mixed lymphocyte cultures (MLC). Adult blood DCs from each subset were isolated and then merged in different proportions before the MLC setup. Response of allogeneic T cells (in terms of proliferation, phenotype and cytokine expression) was measured using cord blood T lymphocytes as a source of naive cells. The results indicate that the presence of both DC subsets in the MLC have a synergistic effect on the induction of a potent Th1 cell response.

## Material and Methods

### Culture media and reagents

RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Scotland) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated foetal calf serum (FCS)(Gibco), 2 mM L-glutamine (Sigma, Saint Louis, MO), 100 U/mL penicillin (Cepa S.L, Madrid, Spain), 100 µg/mL streptomycin (Laboratorios Normon S.A, Madrid, Spain), and 250 ng/mL Fungizone® (Sigma). Recombinant human IL3 (Peprotech, London, UK) was used at 25 ng/mL. Other reagents were Bovine Serum Albumin (BSA), Phorbol Myristate Acetate (PMA) and Ionomycin (Sigma).

### Monoclonal antibodies

The following murine monoclonal antibodies (mAbs) were used: Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP)-labeled CD3 and HLA-DR; Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled CD4 and CD45RA; Phycoerythrin (PE)-labeled CD11c, CD123, IL2R $\alpha$ , CD154, CD45RO, IL12R $\beta$ 1, IL12R $\beta$ 2, IL18R $\alpha$  (BD Biosciences Oxford, UK); TRI-Color® (TC)-labeled CD3, PE-labeled IL4, Allophycocyanin (APC)-labeled IFN $\gamma$  (Caltag Laboratories, Hamburg, Germany); FITC-labeled anti-BDCA2 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany); RPE-Cy5-labeled CD14, CD19 (Serotec Ltd, Kidlington, Oxford, UK). Blocking mAbs to human IL3 (2.5 µg/mL)(BVD8-3G11, BD Biosciences) and to human IL18 (5 µg/mL)(125-2H, MBL, Nagoya, Japan) were used following manufacturer's instructions. Isotype matched antibodies were used as controls.

### Immunostaining and flow cytometry

Cells were washed, resuspended in 50 µL of buffer (PBS+0.1%BSA) and incubated with mAbs for 20 min at 4°C. Then, cells were washed, resuspended in PBS and analyzed in a FACSCalibur flow cytometer using the Standard CellQuest™ acquisition software (BD Biosciences). Samples were gated using forward (FSC) and side (SSC) scatter to exclude dead cells and debris. IFN $\gamma$  and IL4 production by alloantigen-stimulated T cells was assessed by intra-cellular cytokine staining. Briefly, after allogeneic culture, aliquots of  $5 \times 10^5$  T cells were washed and stimulated for 5 h with PMA (50 ng/mL) and Ionomycin (500 ng/mL) in the presence of monensin (2.5 µg/mL). Then, cells were washed and stained with anti-CD8 PerCP before fixation and permeabilization using the IntraStain kit (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). Finally, cells were labeled with anti-IFN $\gamma$  APC and anti-IL4 PE mAbs or the corresponding isotype controls.

### Oligodeoxynucleotides

Endotoxin-free phosphorothioate-modified CpG ODNs were obtained from Invitrogen (Invitrogen Corporation, Paisley, Scotland). CpG-A ODN (2216) : ggGGGACGATCGTCgggggG; CpG-B ODN (2006) : tcgtcgtttgtcgtttgtcgtT; (sequences are shown, 5' to 3'; lower case letters, phosphorothioate linkage; capital letters, phosphodiester linkage three of the base; underlined, CpG dinucleotides). CpG ODN were resuspended in TE buffer, diluted in PBS, and used at a final concentration of 50 µg/mL.

### IFN $\alpha$ production

IFN $\alpha$  was determined on supernatants from combined MLCs or CpG-stimulated PDC as controls. IFN $\alpha$  was measured using an ELISA kit (Bender Medisystems, Vienna, Austria) following manufacturer's instructions.

### Adult DCs isolation

Buffy coats, provided by the BTB, were obtained from blood donations, following a protocol approved by the Ethical Committee of the Centre. PBMCs were separated by a standard density gradient centrifugation (400 g, 25 min)(Lymphoprep, Axis Shield, Oslo, Norway). Cells were washed twice in PBS and counted in a hemocytometer. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion. Isolation of both MDC and PDCs from the same donor was based on the Blood DC isolation kit (MACS, Miltenyi Biotec) with some modifications. First, PBMC were depleted of T cells, NK cells and monocytic cells by magnetic separation (MACS, Miltenyi Biotec) as indicated by the manufacturer. The remaining population was incubated with mAbs to FITC-CD4, PE-CD11c and RPE-Cy5 -CD14 and -CD19, and sorted in a FACSVerse cell sorter (BD Biosciences). PE-Cy5 positive cells were discarded. Double-positive cells for CD4 and CD11c were sorted as MDC whereas single-positive CD4 cells were sorted as PDC. The purity of each subset was further confirmed by additional antibody staining. PDC samples showing <98% purity or CD11c+ contamination >1% were discarded. In some experiments, cell viability was determined by staining with PE-conjugated Annexin V and 7-Amino Actinomycin D (BD Biosciences) following manufacturer's recommendations.

### L-cells

Mouse CD40L-transfected and control L-cells (kindly donated by Prof. John Gordon) were maintained in RPMI+10%FCS. L-cells were irradiated (90Gy, CLINAC 2100C Varian, Milpitas, CA) before used in coculture experiments with DCs as a source of CD40L.

### CbT cell isolation and allostimulatory assays

CbT were obtained from umbilical cord blood samples supplied by the Cord Bank of Barcelona, following a protocol approved by the Ethical Committee and with donor consent. Cord blood mononuclear cells were obtained as in PBMCs, and cryopreserved until used. CD3+ T lymphocytes were purified from cryopreserved cells by negative selection (MACS, Miltenyi

Biotech) with a purity >90% in all experiments. For CFSE labeling,  $5 \times 10^6$  isolated CbT cells were resuspended in 1 mL PBS+0.1%BSA and incubated (room temperature, dark) with an equal volume of 1.25  $\mu$ M CFSE (Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands). After 10 min, unbound dye was quenched with an equal volume of RPMI+10%FCS at 37°C. Labeled cells were washed twice in RPMI+10%FCS and  $5 \times 10^4$  cells/well were cultured in 96-well round-bottom plates (Nunc, Roskilde, Denmark) in the indicated allostimulatory conditions. In some experiments, 96-trans-well plates with a 0.45  $\mu$ m diameter pore size (Millipore, Bedford, MA) were used. CbT cell proliferation was determined as the sequential loss of CFSE fluorescence detected by flow cytometry, as previously reported (5). CFSE-high (nonproliferating) and CFSE-low (proliferating) cells contained in the living gate (R1) were detected by flow cytometry. Cell proliferation was indicated as the percentage of CFSE-low cells contained in R1. In some experiments, the viability of the proliferating T cells was evaluated by Annexin V and 7 Actinomycin D staining. Thymidine incorporation was also determined in some experiments. After 4 days of incubation, 1  $\mu$ Ci of 3H-thymidine (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) was added to each well and the cells were further incubated for at least 12 h. T-cell proliferation was measured in a beta counter (1450 Microbeta LSC, Wallac Oy, Turku, Finland).

**Reverse transcription-PCR**

Total T lymphocytes were harvested at different time points after allogeneic stimulation. RNA was extracted using Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen Life Technologies, Spain) as recommended. Following DNase treatment (DNA-free kit, Ambion, Houston, TX), a reverse transcription-polymerase chain reaction (rt-PCR) (Promega RT kit, Promega, Southampton, UK) was performed using a Perkin-Elmer Cetus 480 thermocycler (Perkin-Elmer, Emerville, CA). Oligonucleotides (Sigma) and PCR conditions are summarized in Table 1. The number of cycles 'n' was determined by the nonsaturating PCR conditions previously established for each reaction. Amplified cDNA was electrophoresed in a 2% agarose gel.

**Statistical analysis**

Results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Comparison between groups was conducted using the Mann-Whitney test for nonparametric data and the Tukey test or paired T test for parametric data – after confirming normal distribution by the Kolmogorov-Smirnov test -, as indicated. Analyses were performed using the SigmaStat v3.0 software (SPSS, Ekrath, Germany). A value of  $p < 0.05$  was considered significant.

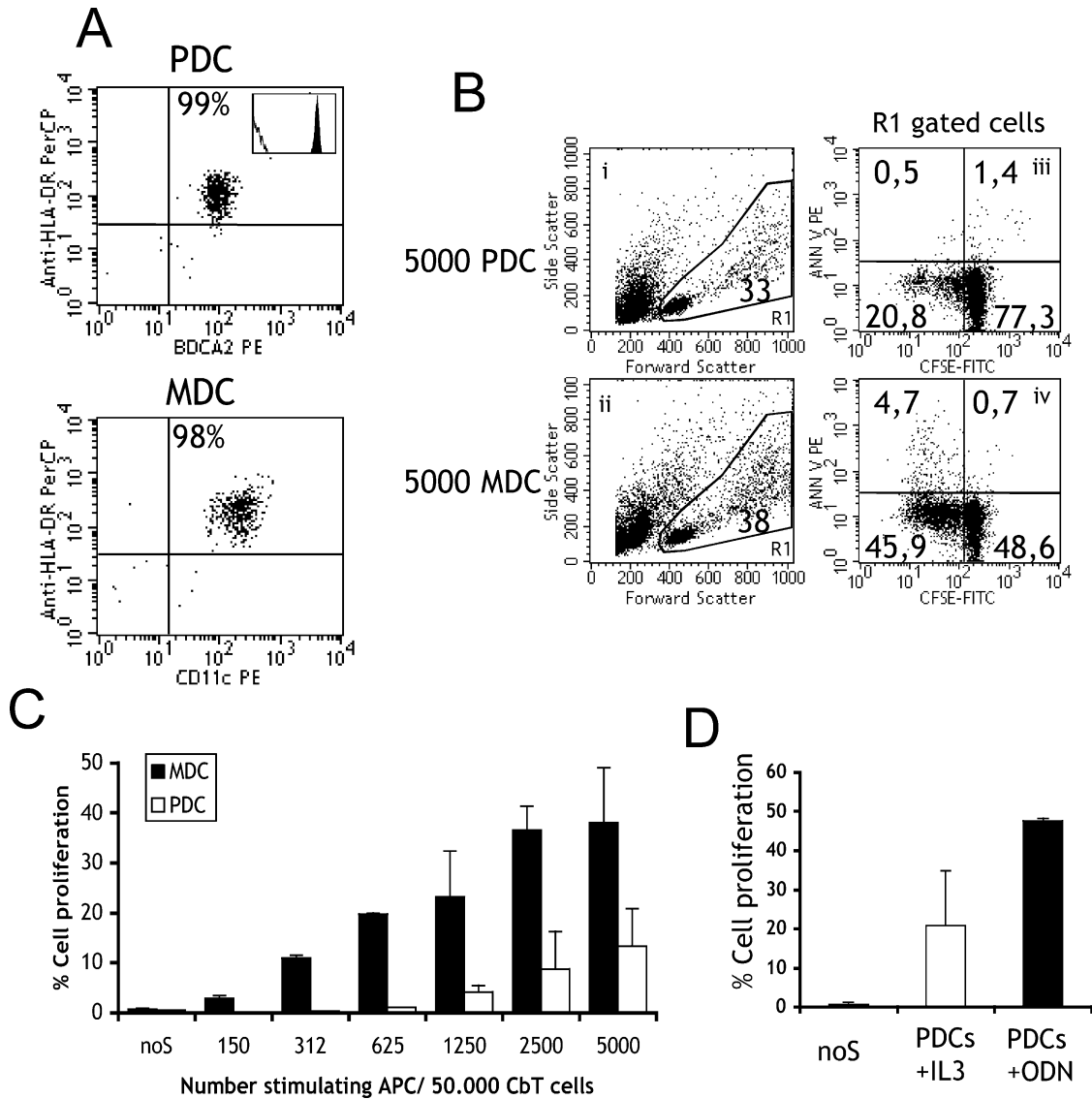
**Results**

**MDCs play an important role in the induction of strong alloproliferative responses in naive T cells**

Freshly isolated PDCs were defined as CD4+HLADR+CD14-CD19-CD11c- and confirmed by the expression of BDCA-2 and CD123 (Figure 1A). MDCs were defined as CD4+HLADR+CD14-CD19-CD11c+ (Figure 1A). As reported, MDCs showed a higher level of mean fluorescence intensity (MFI) for HLA-DR compared to PDCs (median values 161.9 vs. 94.9,  $n = 22$ ,  $p = 0.001$ , Mann-Whitney test). The low expression of costimulatory molecules and absence of CD83 expression confirmed the immaturity of the cells. The viability was consistently >95% for both DC subsets (supplemental Figures 1A and 1B). Freshly isolated and highly purified PDCs and MDCs were used as single stimulator subsets in the alloproliferation assay (Figure 1B and supplemental

**Table 1:** Oligonucleotide sequences and PCR conditions for each gene

Gene	Sense	Antisense	Amplimer size (bp)	Annealing temp (°C)	References
IL2	ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT T	GTC AGT GTT GAG ATG ATG CTT TGA C	457	60	23 designed using the Oligo 4.0 software (MedProbe, Oslo, Norway)
IL4	ACT GCT TCC CCC TCT GTT CT	CTC TGG TTG GCT TCC TTC AC	375	60	
IL 10	AAG CTG AGA ACC AAG ACC CAG ACA TCA AGG CG	AGC TAT CCC AGA GCC CCA GAT CCG ATT TTG G	328	61	24
IFN $\gamma$	TGG GTT CTC TTG GCT GTT AC	CAG GCA GGA CAA CCA TTA CT	470	60	
GAPDH	TCT TCT TTT GCG TCG CCA G	AGC CCC-AGC CTT CTC CA	372	62	



**Figure 1: Isolation and alloproliferative induction by DC subsets.** Panel A. Isolated PDCs (BDCA2+ DR+, the small inner histogram shows the expression of CD123) and MDCs (CD11c+ DR+) showed as single populations from the same donor after the isolation protocol. Panel B: 50 000 CFSE-labeled naive Cb T cells were stimulated by the indicated DC subset. After 5 days, CFSE expression was analyzed in the cells contained in the living gate (R1)(plots i and ii). The numbers inside R1 indicate the percentage of cells contained in the region. The proportion of proliferative cells is determined as the CFSE-low population contained in the lower left quadrant of the dot plots (iii and iv). A single representative experiment is shown. Panel C: Cell dose-dependent induction of alloresponse was determined using isolated MDCs (black bars) or PDC (white bars) as indicated. The mean  $\pm$  SD of three replicates from a single representative experiment out of four is shown (noS, nonstimulated). Panel D: The allostimulatory capacity of CpG-stimulated PDCs is shown in this representative experiment (mean  $\pm$  SD of three replicates). PDCs were incubated in the presence of IL3 or CpG for 24 h before T cells were added to the assay.

Figure II). Overall, MDCs induced an important, dose dependent, alloproliferative response in naive T cells (up to  $57.8\% \pm 11.7$ ,  $n = 11$ , 5000 MDCs per 50 000 T cells, ratio 1 : 10) (Figure 1C). In contrast, purified PDCs only induced a mild alloproliferation of naive T lymphocytes at high ratios ( $20.6\% \pm 13.9$ ,  $n = 11$ , 5000 PDCs per 50 000 T cells, ratio 1 : 10) or upon CpG-ODN activation

(as positive control, Figure 1D), but not at lower ratios (Figure 1C). Different proportions of cells from both DC subsets were then combined and used as APCs in the MLC, to test whether a higher proportion of PDCs (as in G-PBSC harvest) may influence allogeneic response. These experiments showed that the presence of MDCs had a dominant effect, as the alloproliferative response

of T cells ( $58.6\% \pm 2.3$ ,  $n = 2$ ) remained similar to that elicited by MDCs alone even when the proportion of MDCs versus PDCs was 1 : 3 (1250 MDCs + 3750 PDCs per 50 000 T cells (ratio 1 : 10)) (data not shown).

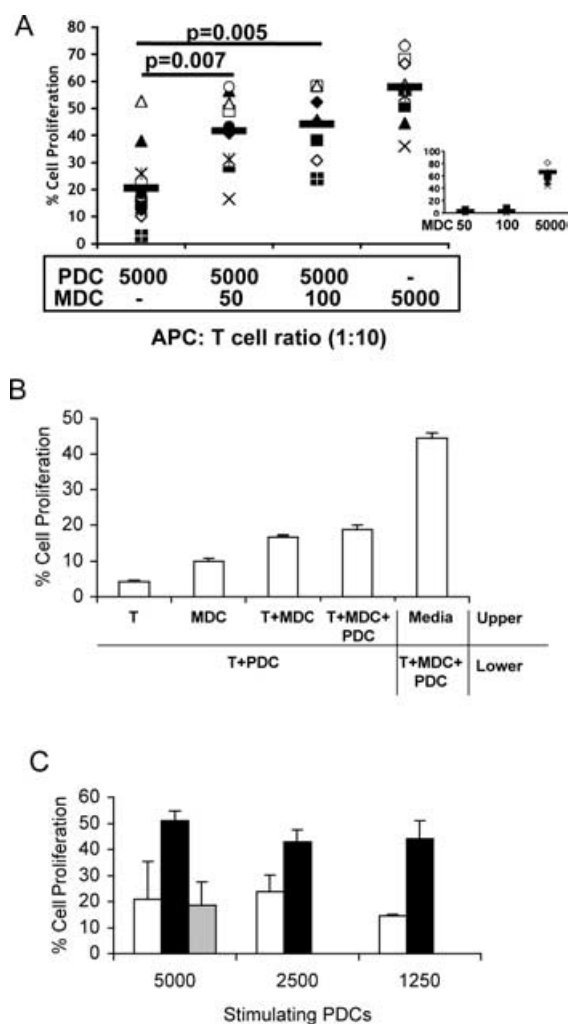
### **MDCs and PDCs act synergistically to induce a potent T-cell response**

To further study the dominant role of the MDC subset, suboptimal numbers of these cells were merged with a constant number (5000 cells) of PDCs to set up the MLC. As above, the APC : T-cell ratio (1 : 10) was not substantially modified—the number of MDCs added to PDCs only ranged between 0.2% and 2% of the total APCs, and between 0.02% and 0.2% of the responder T cells (unable to induce any T-cell proliferation). The addition of just 50 MDCs to PDCs was sufficient to induce a higher level of T-cell proliferation compared to PDCs alone ( $41.7\% \pm 14.0$  vs.  $20.6\% \pm 13.9$ ,  $n = 9$ ,  $p = 0.007$ , Tukey test) (Figure 2A). When the APC mixture consisted of 5000 PDC + 100 MDC (referred as PDC+100MDC onwards), the level of alloresponse was not significantly different to that obtained using MDCs alone as single APC subset ( $44.1\% \pm 13.5$  vs.  $57.8\% \pm 11.7$ ,  $n = 7$ ,  $p = 0.148$ , Tukey test) (Figure 2A). By contrast, T-cell alloproliferation induced by PDC + 100 T cell-depleted PBMCs (as control) only reached PDCs levels ( $20.0\% \pm 5.2$ ,  $n = 3$ ). Thus, a suboptimal number (approximately one order of magnitude below optimal) of MDCs merged with PDCs may dramatically modify outcome of alloproliferative response. To investigate whether cell contact may be involved in this effect, trans-well experiments were performed. The results showed that cell contact among the three cell subsets may be necessary, as the alloresponse was reduced when MDCs and PDCs were separated by a  $0.45 \mu\text{m}$  pore size filter (Figure 2B). However, soluble factors, possibly derived from activated T cells, may also be involved.

To further investigate whether MDCs could directly modify the PDCs' induced response, sorted MDCs were cocultured with control or CD40L-transfected L-cells for 24 h, while PDCs from the same donor were CFSE-labeled and maintained in IL3. Then PDCs and MDCs were mixed (3 : 1) and cultured for additional 12–16 h. Finally, CFSE-PDCs were sorted again (99% pure) and used as the stimulatory population. PDCs 'conditioned' by CD40L-stimulated MDCs induced a potent alloresponse by T lymphocytes (Figure 2C), indicating that activation of MDCs may be important for the conditioning of PDCs, and therefore influence PDCs' function.

### **PDC+MDC allostimulation induces IL3 secretion and promotes PDC survival**

Using PDC+100MDC was enough to modify the magnitude of alloresponse *in vitro*. As IL3 and CD40 ligation are important factors in the biology of PDCs, we examined the possible contribution of the production of IL3 and the expression of CD154 by the T cells used in the assay.



**Figure 2: A potent T-cell alloproliferation is induced by PDCs when suboptimal numbers of MDCs are present.**

Panel A: Isolated PDCs were used as the stimulating population alone or combined with low numbers of MDCs (50 and 100 cells are shown) from the same donor. The total number of cells from each population is indicated in the X-axis. APC : T-cell ratio was maintained at 1 : 10. The proliferation of the responding T cells was assessed as before. Each symbol represents the mean of at least two replicates from a single experiment. A minimum of seven experiments was performed in each condition. Black bars indicate the mean value of all experiments. Statistical differences were assessed by Tukey test. The small plot shows control proliferation values using 50 or 100 MDCs alone as APC. Panel B: Trans-well experiments. The upper row shows the cells placed in the upper side of the filter, and lower row the cells placed on the lower side. T-cell proliferation (values relative to positive control) were measured on T cells from the lower side. Panel C: isolated CFSE-PDCs were 'conditioned' by MDC during 12–16 h and then sorted. Allogeneic MLC experiments were performed using the 'conditioned' PDCs as stimulators. Alloproliferation induced by PDCs 'conditioned' by control MDCs (white bars) or by CD40L-induced MDCs (black bars) are shown. Grey bar show the alloproliferation induced by IL3-cultured PDCs. Values represent the mean and three replicates from a single experiment of two.

Addition of IL3-blocking antibodies to MLCs stimulated by PDC+100MDCs resulted in a 40% reduction of T-cell proliferation ( $73.3\% \pm 2.5$  to  $45.8\% \pm 0.5$ ,  $n = 2$ ) (Figure 3A), whereas in MLCs stimulated with MDCs, the reduction was only 16% ( $84.0\% \pm 4.3$  to  $70.7\% \pm 0.5$ ,  $n = 2$ ) (Figure 3A). This reduced T-cell proliferation may reflect the role played by IL3 in the survival and maturation of PDCs. To address these points, CFSE-PDCs were cultured for 24 h in the presence of MDC+T cells (as in previous MLCs) or in the presence of IL3 alone (Figure 3B). After incubation, CFSE-labeled PDCs were detected by flow cytometry, and survival was determined as a function of Annexin V and 7-Amino-Actinomycin D staining. Relative survival of CFSE-PDCs in the MLC was similar to that obtained in the presence of IL3 (relative survival 97.9–100%) (Figure 3B). The addition of IL3 blocking antibodies reduced survival of CFSE-PDCs to only 25% in the IL3 control experiment (75% reduction) and to 55% in the MLC experiment (45% reduction) ( $n = 2$  in each situation). Moreover, CFSE-PDCs survival was impaired when cocultured with MDCs but without allogeneic T cells. These results confirmed that IL3 (probably secreted by stimulated T cells) may be at least partially involved in the survival of PDCs during the MLC setup. *In vitro* maturation of PDCs was also determined. After 72 h, CFSE-PDCs cultured in the PDC+100MDC MLC showed a higher proportion of cells expressing CD83, CD80 and CD40, and a higher MFI for CD86 and HLA-DR compared to controls (Figures 3C and 3D). In addition, the levels of interferon alpha, as determined by ELISA in the culture supernatants, were below 20 pg/mL in all conditions tested (Figure 3E). Thus, the combination of PDC+MDC+T favors both PDCs' maturation and survival *in vitro*, but do not significantly induce the production of interferon alpha by PDCs.

#### **PDC+MDC allostimulation confers a Th1 skewed phenotype to responder T cells**

We then analyzed the phenotype of the responder T-cell population. After 5 days of incubation, the majority of CFSE-low responding T cells were found to express CD154, IL2R $\alpha$ , IL12R $\beta$ 1 and IL18R $\alpha$  (Figures 4A and 4B,  $n = 4$ ) in either PDC+100MDC or MDC stimulated cultures. Furthermore, the  $\beta$ 2 chain of IL12R was transiently detected in all conditions (Figure 4C,  $n = 3$ ).

Cytokine production by allostimulated T cells was also studied. In MDC stimulated cultures, mRNA for IL2, IL10 and interferon gamma (IFN $\gamma$ ) were detected 12 h after the MLC setup and the levels increased for at least 24 h (Figure 5A). Similarly, PDC+100MDC allostimulated T cells also expressed IL2, IL10 and IFN $\gamma$  mRNA, although response was slightly delayed (Figure 5A). After 5 days of allogeneic culture, intra-cellular IFN $\gamma$  was detected in proliferating CFSE-low T cells following restimulation (Figure 5B). A higher proportion of IFN $\gamma$  producing cells was obtained when merged PDC+100MDC were used as stimulators, compared to MDCs alone ( $24.0\% \pm 8.9$ , vs.

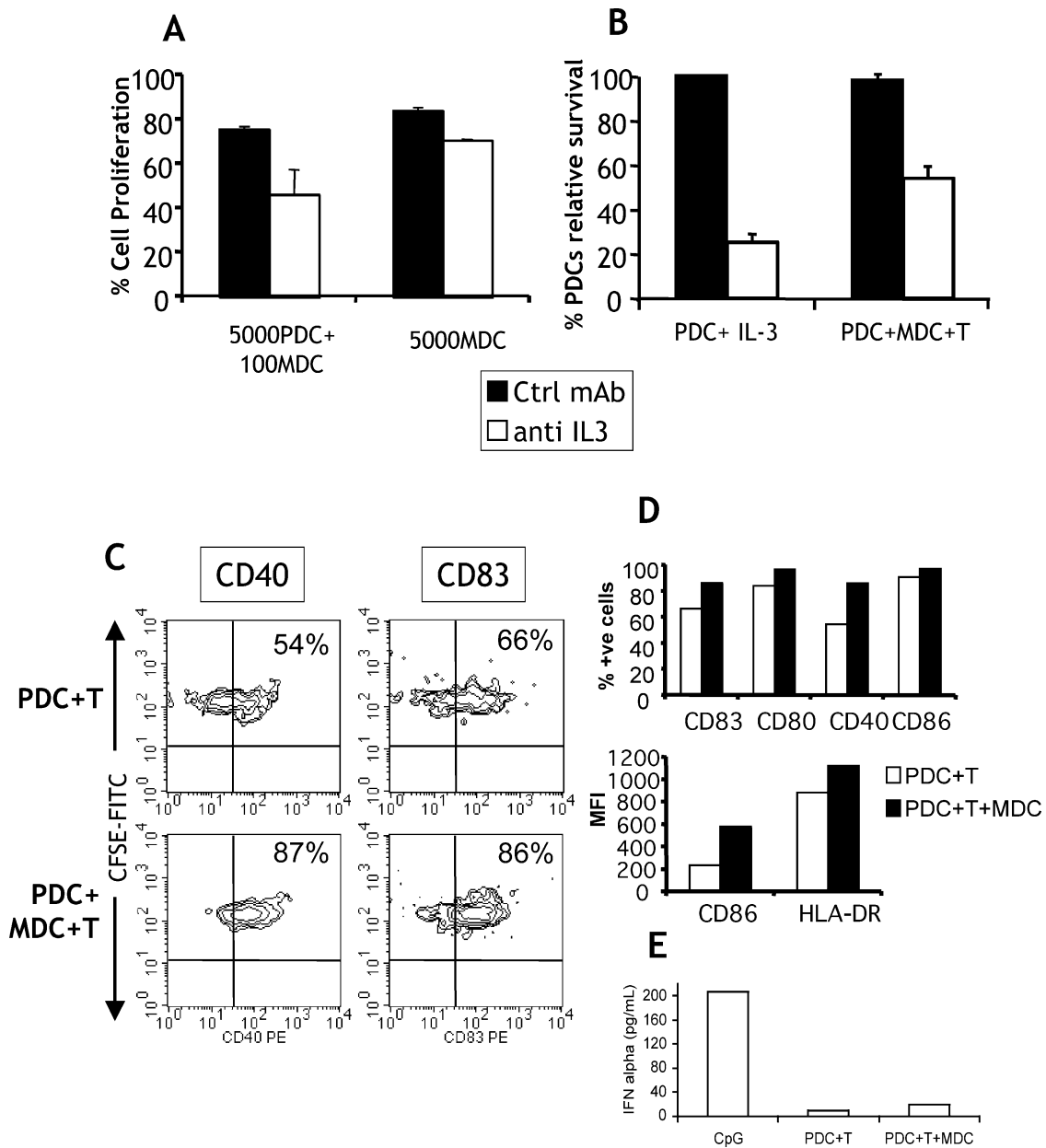
$13.1\% \pm 5.2$ ,  $p = 0.004$ ,  $n = 8$ , paired T test) (Figures 5B and 5C). Both CD4+ and CD8+ T lymphocytes were found in the IFN $\gamma$ -positive population (data not shown). No intra-cellular IL4 was detected in any experiments, and no mRNA expression for this cytokine was detected by rt-PCR after short stimulation with APCs (Figure 5A).

## **Discussion**

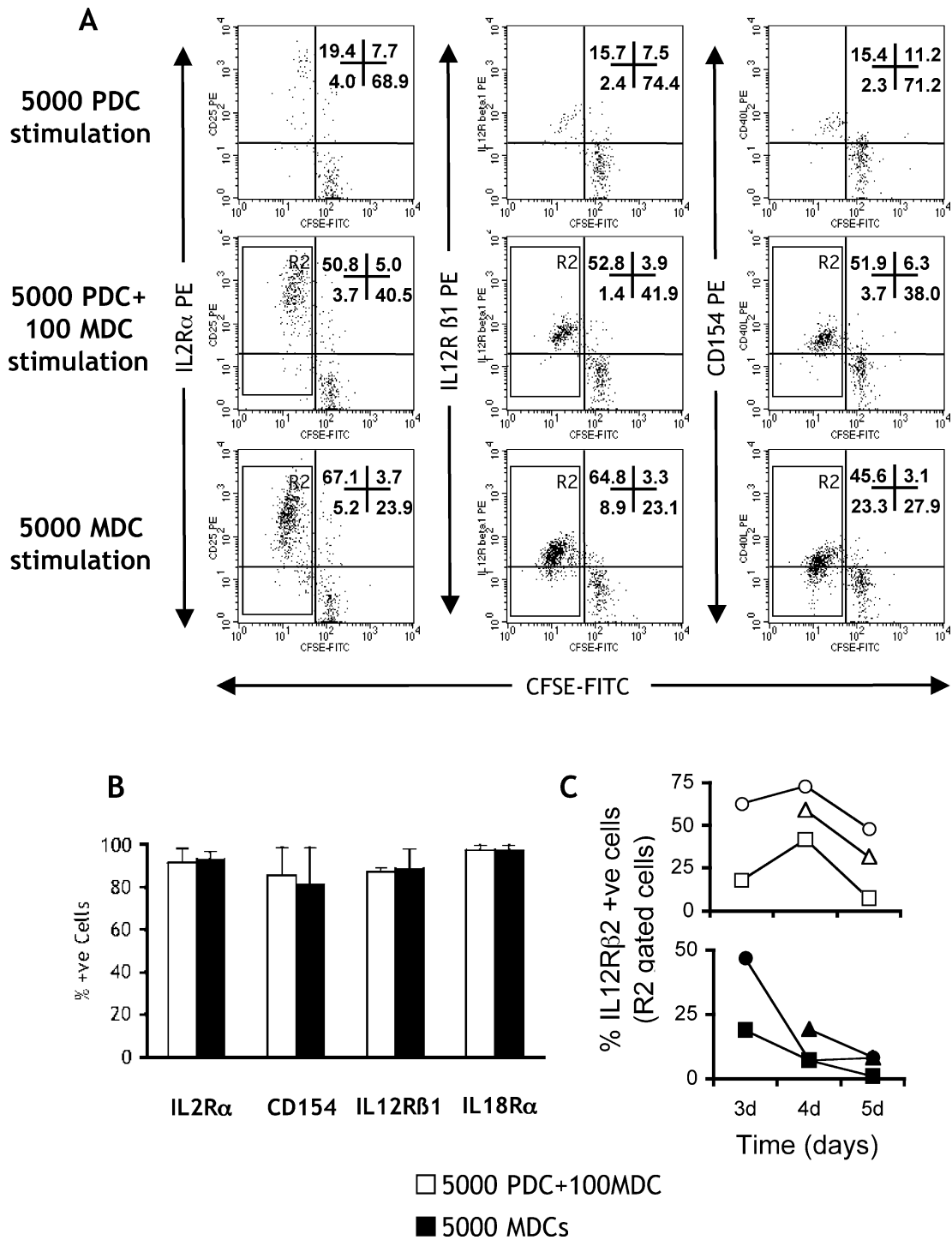
DCs play a crucial role in antigen recognition, presentation and modulation of the immune response. Several reports have demonstrated that DCs are involved in the development of GVHD, a serious complication of HSCT. In fact, depletion of host MDCs by antibody treatment has been shown to significantly reduce aGVHD (25). Similarly, host skin Langerhans cells may trigger GVHD despite complete blood chimerism (9). In HSCT, it is thought that donor DCs may induce GVHD by taking up and presenting host antigens to donor T cells. This 'indirect' mechanism only stimulates a small number of responder T cells compared to the 'direct' mechanism, as this number is similar to the percentage of T cells responding to a nominal antigen (26). The main sources of stem cell progenitors for HSCT are bone marrow (BM), cord blood and G-PBSC harvests. G-PBSC harvests have been associated with a lower incidence of aGVHD (27,28) and with a preference for inducing a Th2 cytokine response. The particular features of each source may influence the outcome of the graft. For example, G-CSF treatment may affect the function of other cell types, such as MDCs or T cells (29,30). Moreover, the presence of marrow stromal cells in BM preparations may facilitate engraftment (31). Concerning DCs, G-PBSC harvests contain approximately five times more PDCs than BM preparations (14,15), and two to three times more PDCs than MDCs. PDCs were thought to preferentially induce Th2 responses (16), to promote tolerance (19,21), and be poor inducers of allogeneic T-cell proliferation. Hence, PDCs may be important for the induction of graft tolerance. However, recent clinical studies have provided inconclusive results. The infusion of more than  $0.9 \times 10^6$  donor PDCs per kg has been associated with a lower incidence of cGVHD in BMT patients (11). Besides, studies using G-PBSC from HLA-matched donors have shown that cGVHD correlated with higher numbers of infused PDCs ( $3.3 \times 10^6$ /kg) (12). In these studies, the number of other cell types present in the graft did not correlate with the incidence of GVHD. These results justify the conduct of *in vitro* studies in order to clarify the role of DC subsets in the allogeneic response.

To determine how the interaction of both DC subsets may influence outcome of the alloreactive T-cell response, MLC experiments were performed, in which the APC population was composed by different proportions of merged MDCs and PDCs. As expected, isolated PDCs were poor allogeneic response inducers, whereas MDCs alone induced a potent naive T-cell proliferation. Surprisingly, the

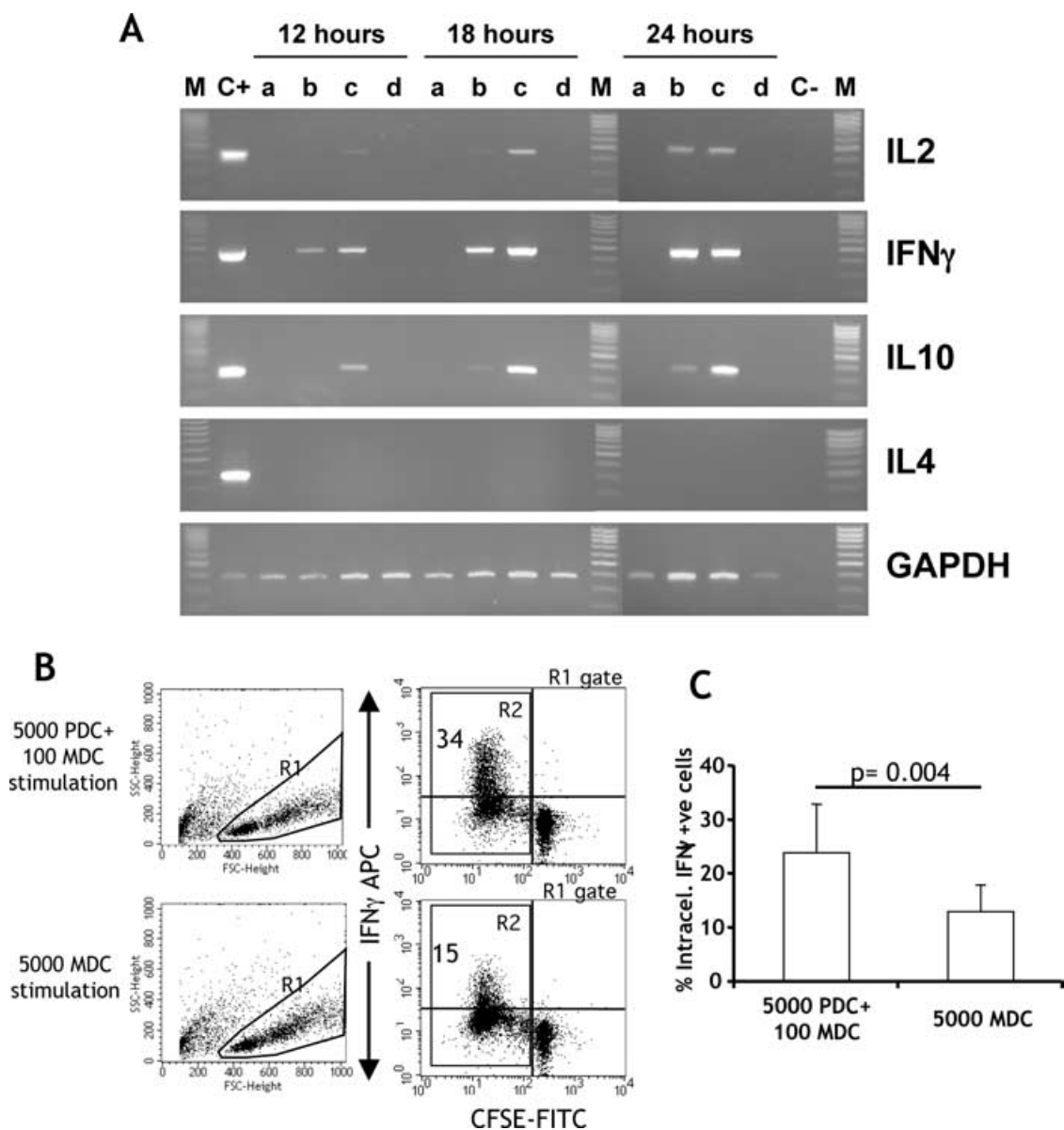




**Figure 3: Survival and maturation of PDCs in the MLC conditions tested: role of endogenous IL3.** Allostimulation was set up as before, and IL3-blocking antibodies were added at the beginning of the culture period. Panel A: The addition of IL3-blocking antibodies (white bars) compared to control antibodies (black bars) on T-cell proliferation is shown (mean  $\pm$  SD of three replicates from a representative experiment out of two). Panel B: IL3 produced in the combined MLC favors survival of PDCs. Plasmacytoid DCs were labeled with CFSE (as in T cells) and cultured for 24 h in the presence of MDC+T cells (as in the MLC) or in the presence of IL3 as a control. After incubation, PDC survival was determined by staining the cells with Annexin V and 7-Amino-Actinomycin D and gating the CFSE-positive population (PDCs). The addition of IL3-blocking antibodies (white bars) compared to control antibodies (black bars) is shown. The results are indicated as the relative proportion of living PDCs versus the control condition (PDC+IL3) (n = 3). Panels C and D: CFSE-labeled PDCs were cultured as before up to 72 h. The cells were then recovered and the expression of maturation markers was analyzed on surviving CFSE-labeled PDCs by flow cytometry. The numbers in the plots indicate the percentage of positive (+ve) cells expressing the indicated marker (values of one experiment out of three are shown). Panel E: Interferon alpha produced by PDCs cultured in the presence of T cells alone or T cells plus MDCs was measured by ELISA on 72 h cell culture supernatants. CpG-stimulated PDCs were used as positive control. Values from one of two independent experiments are shown.



**Figure 4: The phenotype of the responder T-cell population is similar in MDC and 5000PDC+100MDC allostimulatory conditions.** After 5 days of culture, the alloproliferating CFSE-low T cells were stained with different mAbs to the indicated markers. (A) The expression of IL2R $\alpha$ , IL12R $\beta$ 1 and CD154 on proliferating T cells (gated on R1) is shown. The numbers indicate the percentage of cells in each quadrant. (B) Summary of the markers analyzed and detected (+ve) on responding CFSE-low T cells stimulated by 5000MDC (black bars) or 5000PDC+100MDC (white bars) (mean  $\pm$  SD, n = 4). As most cells expressing the markers are CFSE low, the proportion is calculated based on the proliferating cells (contained in the R2 regions). (C) The time-dependent expression of IL12R $\beta$ 2 on CFSE-low T cells was analyzed in three different culture experiments stimulated by (5000PDC+100MDC) (white symbols) or 5000MDCs alone (black symbols) for the indicated time period.



**Figure 5: Cytokine production by allostimulated Cb T cells.** Cells were stimulated with allogeneic PDCs (a), PDC+100MDCs (b), MDCs (c) or nonstimulated (d). (A) At the indicated time points and conditions, total RNA was extracted and the induction of mRNA for IL2, IFN $\gamma$ , IL10 and IL4 in Cb T cells was analyzed by rt-PCR. Positive (C+) and negative (C-) controls and molecular weight markers (M) are shown. (B) Intra-cellular IFN $\gamma$  production was analyzed after 5 days of culture and upon re-stimulation in the presence of monensin. Left panels show the FSC-SSC characteristics of the responding population, whereas right panels show the cells containing the cytokine. The numbers in the upper left quadrant indicate the proportion of IFN(+ve) cells compared to total proliferating (CFSE low, R2 region) lymphocytes in this particular assay. (C) The proportion of cells contained in the R1+R2 gates (CFSE-low cells) that have the ability to produce IFN $\gamma$  is indicated (mean  $\pm$  SD, n = 8 independent experiments, p = 0,004, paired T test).

addition of only 100 MDCs (one order of magnitude below the optimal number) to PDCs (PDC+100MDC) increased the alloproliferative T-cell response, thus suggesting a possible role of PDCs in sustaining alloresponse *in vitro*. This may be due to the higher survival and maturation state shown by PDCs cultured in these MLC conditions, in which IL3 and CD154 are involved. IL3 plus CD40 ligation have been shown to promote a PDC-induced Th2

response (16). However, the T-cell response in the MLC stimulated by merged PDC+100MDC does not correlate with a Th2 profile, but rather with a Th1 profile. Several previous reports have suggested that PDCs may be involved in Th1 induction. PDCs are the main cell source of interferon alpha in response to viral or CpG stimulation (32), and secrete pro-inflammatory chemokines such as CCL3 in response to T cell derived stimuli (33). Moreover,

in mice, Interferon Producing Cells (similar to PDCs) fail to induce proliferation of naive T cells, but promote the expansion and Th1 differentiation of antigen-experienced T cells (22). In this model, the expression of several markers, including IL12R $\beta$ 2 (34,35), the expression of IL2 mRNA and synthesis of IFN $\gamma$  by proliferating CbT cells (36) indicated a Th1 phenotype. This Th1 response induced by PDC+100MDC is most probably due to the presence of MDCs or MDC-secreted factors. In fact, CD40L-activated MDCs were sufficient to increase the capacity of PDCs to induce a potent T-cell alloproliferation. Interestingly, the combination of PDC+100MDC as APCs is more efficient than MDCs alone in the induction of IFN $\gamma$  expressing T cells. This finding emphasizes the importance of the two types of DCs in this kind of alloresponse, although the mechanism is not clear. Cytokines like interferon alpha could play a role, but were detected at low levels in cell culture supernatants in the PDC+100MDC condition. Other myeloid derived cytokines, like IL18, may support Th1 responses induced by CD40L-activated PDCs (37,38). In preliminary experiments, and as previously reported in mice (22), the addition of IL18-blocking antibodies to MDC-stimulated and PDC+100MDC-stimulated cultures does not alter the level of T-cell proliferation and does not reduce the production of intracellular IFN $\gamma$  by T lymphocytes. Although not addressed here, it is also possible that other factors secreted by MDCs or PDCs, such as IL23 produced by PDCs (22) or trace levels of IL12p70 (37), may also contribute to response outcome. Current experiments are underway to clarify these points.

The data presented here show that when both PDCs and a suboptimal number of MDCs are merged and used as APCs, may promote an allogeneic Th1 response in CbT cells *in vitro*. A recent model of T-cell activation and polarization has suggested that both DC subsets are important to induce a potent Th1 response (22). In an allogeneic situation, it is possible that MDCs capture host antigens from peripheral tissues and migrate to the lymph nodes, where PDCs are continuously recruited both under normal and inflammatory conditions (39–41). MDCs may induce a rapid expansion and activation of naive T cells through antigen presentation and cytokine secretion that may also influence PDCs. Activated T cells would then support PDC survival and maturation via IL3 plus CD40 ligation, and in turn PDCs may promote final differentiation of T cells. Further investigation is required to determine whether this final differentiation is antigen specific, is mediated by cytokines acting on PDCs, or both. In the allogeneic situation analyzed here, several results suggest that both soluble factors and also cell-cell contacts, either between DC subsets or with T cells, are involved. In fact, cell-cell contact between DC subsets has already been described (42,43) and cannot be completely ruled out. Overall, these data suggest that both DC subsets may be important in the induction of a potent T-cell response from a rather low number of activated APCs. Besides, in an allogeneic response,

it is possible that both DC populations play a role in the development of a GVH reaction by controlling Th commitment through cytokine and cellular interactions. Additional studies are needed to establish whether the elimination of MDCs present in the graft may help reduce GVHD, without altering the beneficial effects of the GVL response following HSCT. Finally, these results support the usefulness of *in vitro* assays with purified populations to complement clinical studies.

## Supplementary Material

The following supplemental material is available for this article online:

**Figure S1:** Evaluation of PDCs survival and phenotype after the isolation process. **1B** Evaluation of MDCs survival after the isolation process

**Figure S2:** T-cell proliferation was also measured by thymidine incorporation in some experiments.

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Prof. Dr. John Gordon for kindly providing the control and CD40L-transfected L-cells. We also thank revision and corrections made by Dr. Manel Juan. This work has been partially supported by a grant from the 'Fondo de Investigaciones Sanitarias' FIS 01/3120 and 'Red Temática de Investigación en SIDA, (Red de grupos 173)'. MN is supported by a grant FIS 03/0142. FEB is supported by contract FIS 01/3120 from the BTB, in collaboration with the Spanish Health Department.

## References

1. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 2001; 411: 385–389.
2. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245–252.
3. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994; 82: 487–493.
4. Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CD. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2769–2778.
5. Borrás FE, Matthews NC, Lowdell MW, Navarrete CV. Identification of both myeloid CD11c+ and lymphoid CD11c–dendritic cell subsets in cord blood. *Br J Haematol* 2001; 113: 925–931.
6. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000; 165: 6037–6046.
7. Summers KL, Hock BD, McKenzie JL, Hart DN. Phenotypic characterization of five dendritic cell subsets in human tonsils. *Am J Pathol* 2001; 159: 285–295.
8. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 151–161.

9. Merad M, Hoffmann P, Ranheim E et al. Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nat Med* 2004; 10: 510–517.
10. Grewal IS, Flavell RA. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev* 1996; 153: 85–106.
11. Waller EK, Rosenthal H, Sagar L. DC2 effect on survival following allogeneic bone marrow transplantation. *Oncology (Huntingt)* 2002; 16(1 Suppl. 1): 19–26.
12. Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* 2000; 95: 2484–2490.
13. Klangsinrikul P, Russell NH. Peripheral blood stem cell harvests from G-CSF-stimulated donors contain a skewed Th2 CD4 phenotype and a predominance of type 2 dendritic cells. *Exp Hematol* 2002; 30: 495–501.
14. Arpinati M, Chirumbolo G, Urbini B et al. Infusion of high numbers of G-CSF mobilized blood dendritic cells type 2 is associated with an increased rate of chronic GvHD in allogeneic PBSC (abstract). *Blood* 2002; 100: 419a.
15. Avery S BG, Spencer A, Schwarzer AP. Type 2 DCs content in donor peripheral blood stem cell (PBSC) grafts is associated with improved survival following allogeneic transplantation (abstract). *Blood* 2002; 100: 138a.
16. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283: 1183–1186.
17. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002; 23: 445–449.
18. Moser M. Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions? *Immunity* 2003; 19: 5–8.
19. Kuwana M, Kaburaki J, Wright TM, Kawakami Y, Ikeda Y. Induction of antigen-specific human CD4(+) T cell anergy by peripheral blood DC2 precursors. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2547–2557.
20. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 685–711.
21. Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195: 695–704.
22. Krug A, Veeraswamy R, Pekosz A et al. Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unopolarized T cells. *J Exp Med* 2003; 197: 899–906.
23. Roura-Mir C, Catalfamo M, Sospedra M, Alcalde L, Pujol-Borrell R, Jaraquemada D. Single-cell analysis of intrathyroidal lymphocytes shows differential cytokine expression in Hashimoto's and Graves' disease. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3290–3302.
24. Sabater L, Ashhab Y, Caro P, Kolkowski EC, Pujol-Borrell R, Dominguez O. Identification of a KRAB-containing zinc finger protein, ZNF304, by AU-motif-directed display method and initial characterization in lymphocyte activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 1066–1072.
25. Klangsinrikul P, Carter GI, Byrne JL, Hale G, Russell NH. Campath-1G causes rapid depletion of circulating host dendritic cells (DCs) before allogeneic transplantation but does not delay donor DC reconstitution. *Blood* 2002; 99: 2586–2591.
26. Morelli AE, Thomson AW. Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. *Immunol Rev* 2003; 196: 125–146.
27. Reddy V, Hill GR, Pan L et al. G-CSF modulates cytokine profile of dendritic cells and decreases acute graft-versus-host disease through effects on the donor rather than the recipient. *Transplantation* 2000; 69: 691–693.
28. Korbling M, Anderlini P. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood* 2001; 98: 2900–2908.
29. Kitabayashi A, Hirokawa M, Hatano Y et al. Granulocyte colony-stimulating factor downregulates allogeneic immune responses by posttranscriptional inhibition of tumor necrosis factor-alpha production. *Blood* 1995; 86: 2220–2227.
30. Volpi I, Perruccio K, Tosti A et al. Postgrafting administration of granulocyte colony-stimulating factor impairs functional immune recovery in recipients of human leukocyte antigen haplotype-mismatched hematopoietic transplants. *Blood* 2001; 97: 2514–2521.
31. Janczewska S, Wisniewski M, Stepkowski SM, Lukomska B. Fast hematopoietic recovery after bone marrow engraftment needs physiological proximity of stromal and stem cells. *Cell Transplant* 2003; 12: 399–406.
32. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284: 1835–1837.
33. Penna G, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 2002; 63: 1164–1171.
34. Xu D, Chan WL, Leung BP et al. Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med* 1998; 188: 1485–1492.
35. Bofill M, Almirall E, McQuaid A et al. The cytokine receptors for human IL-12 and IL-18 are preferentially expressed on effector memory lymphocytes of both CD45RA+ and CD45RO+ phenotype from tonsils, cord and adult peripheral blood. *Clin Exp Immunol* 2004; 138: 460–465.
36. Matthews NC, Wadhwa M, Bird C, Borrás FE, Navarrete CV. Sustained expression of CD154 (CD40L) and proinflammatory cytokine production by alloantigen-stimulated umbilical cord blood T cells. *J Immunol* 2000; 164: 6206–6212.
37. Kaser A, Kaser S, Kaneider NC, Enrich B, Wiedermann CJ, Tilg H. Interleukin-18 attracts plasmacytoid dendritic cells (DC2s) and promotes Th1 induction by DC2s through IL-18 receptor expression. *Blood* 2004; 103: 648–655.
38. Reddy P, Ferrara JL. Role of interleukin-18 in acute graft-vs-host disease. *J Lab Clin Med* 2003; 141: 365–371.
39. Arpinati M, Chirumbolo G, Urbini B, Perrone G, Rondelli D, Anasetti C. Role of plasmacytoid dendritic cells in immunity and tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol* 2003; 11: 345–356.
40. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997; 185: 1101–1111.
41. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999; 5: 919–923.
42. Bedford P, Garner K, Knight SC. MHC class II molecules transferred between allogeneic dendritic cells stimulate primary mixed leukocyte reactions. *Int Immunol* 1999; 11: 1739–1744.
43. Russo V, Zhou D, Sartirana C et al. Acquisition of intact allogeneic human leukocyte antigen molecules by human dendritic cells. *Blood* 2000; 95: 3473–3477.



3

RESULTADOS II





## Expression and function of the IL-2 receptor in activated human plasmacytoid dendritic cells

Mar Naranjo-Gómez, Harold Oliva, Nuria Climent, Marco A. Fernández, Marta Ruiz-Riol, Margarita Bofill, José M. Gatell, Teresa Gallart, Ricardo Pujol-Borrell and Francesc E. Borràs

Eur. J. Immunol. 2007. 37: 1764-1772

### RESUMEN

#### Antecedentes:

Historicamente, la IL-2 se conoce como el principal factor de crecimiento de los linfocitos T aunque podría actuar sobre múltiples células diana. Además, la inducción de la cadena alfa para el receptor de IL-2 (CD25) se ha asociado, clásicamente, a un marcador de activación linfocitario. Sin embargo, se ha descrito que distintos subtipos de DCs, tanto en modelos murinos como en humanos, expresan CD25. Así, algunos trabajos han reportado que las pDCs activadas expresan CD25, aunque no se ha estudiado el papel que la IL-2 tiene en este tipo celular.

#### Objetivos:

En el trabajo anterior (Resultados I) definimos la existencia de posibles factores solubles derivados de linfocitos T activados que podían influir en la activación de la pDC; en base a estas observaciones y los datos existentes en la literatura pretendemos investigar la expresión y funcionalidad del receptor para IL-2 en pDCs humanas activadas, utilizando dos tipos de estímulos: CD40L (no inductor de IL-2 en DCs) y CpG (inductor de IL-2 en DCs).

#### Resultados y Conclusiones:

Los resultados de este trabajo demuestran que las pDCs expresan el receptor funcional para IL-2 en respuesta a diferentes estímulos de activación, siendo el CD25

un buen marcador de activación temprana. Además, la IL-2 se muestra como un importante factor auto- y/o paracrino para las pDCs, ya que modula su supervivencia y activación (incremento en la secreción de citocinas proinflamatorias: TNF- $\alpha$  y IL-6). Es por tanto, uno de los factores solubles que pueden contribuir a la activación de las pDCs en el contexto de una respuesta inmune.

Este trabajo constituye el primer ensayo funcional sobre el papel de IL-2/IL-2R en la biología de las pDCs humanas.

# Expression and function of the IL-2 receptor in activated human plasmacytoid dendritic cells

Mar Naranjo-Gómez<sup>1</sup>, Harold Oliva<sup>2</sup>, Nuria Climent<sup>2</sup>, Marco A. Fernández<sup>1</sup>, Marta Ruiz-Riol<sup>1</sup>, Margarita Bofill<sup>3</sup>, José M. Gatell<sup>2</sup>, Teresa Gallart<sup>2</sup>, Ricardo Pujol-Borrell<sup>1</sup> and Francesc E. Borràs<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Immunobiology for Research and Applications to Diagnosis, Blood and Tissue Bank, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Service of Immunology and Service of Infectious Diseases and AIDS Unit, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS-AIDS-Research Group, Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, IrsiCaixa Foundation, Barcelona, Spain

Human and mouse plasmacytoid dendritic cells (PDC) express IL-2 mRNA specifically upon TLR stimulation, but not under CD40L stimulation. Even though the expression of the IL-2R by PDC has been described, the functional implications of this expression remain unknown. Here, we investigated the expression and function of the IL-2R in activated human PDC. The IL-2R $\alpha$  chain, CD25, is expressed in both CpG- and CD40L-activated PDC. CD25 expression is a relatively rapid event, as the receptor was detected 6 h after the initial activation signal. Exogenous IL-2 added to CD40L-activated PDC increased the expression of CD25, enhanced the secretion of pro-inflammatory cytokines and promotes PDC survival. CpG-activated PDC cultured in the presence of IL-2R-blocking monoclonal antibodies showed a reduced expression of pro-inflammatory cytokines, especially TNF- $\alpha$ . This reduction was dose and time dependent, suggesting a regulatory role of IL-2 in TNF secretion that might occur at the post-transcriptional level. These results indicate that the expression of the IL-2R is relevant to human PDC activation, and that IL-2 may be an important auto- and/or paracrine factor modulating the activation and survival of PDC. Finally, CD25 expression may be considered as a useful early activation marker for human PDC.

Received 3/12/06

Revised 26/3/07

Accepted 24/4/07

[DOI 10.1002/eji.200636980]

## Key words:

Activation · CD25

· Cytokine secretion

· Interleukin 2

· Plasmacytoid dendritic cells

## Introduction

Dendritic cells (DC) play an important role in both the innate and adaptive immune responses [1]. Plasmacytoid DC (PDC) are the DC subtype endowed with the

capacity to secrete large quantities of type I IFN upon microbial infection [2], a cytokine that induces an antiviral state and contributes to the integration of innate and adaptive immunity. Importantly, stimulation of PDC by microbial products also promotes the secretion of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-6 [3]. Similarly, both human conventional DC and PDC have been described to express IL-2 mRNA upon CpG activation but not upon CD40 ligation [4]. Several reports have demonstrated that PDC participate in the activation of various cell types involved in the immune response, including NK cells, B and T lymphocytes and myeloid (conventional) DC [5]. In this sense, the expression of IL-2 by PDC may play a role

**Correspondence:** Dr. Francesc E. Borràs, LIRAD-Banc de Sang i Teixits, Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol, Ctra. de Can Ruti, Camí de les "Escoles" s/n, 08916 Badalona (Barcelona), Spain

Fax: +34-93-4978668

e-mail: feborras.liradbst.germanstrias@gencat.net

**Abbreviations:** 7-AAD: 7-amino-actinomycin D ·

**CBA:** cytometric bead array · **PDC:** plasmacytoid dendritic cell

in the activation of NK cells in murine models [6, 7]. In humans, a novel molecular mechanism through the TNFR family member glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand (GITRL) is used by PDC to costimulate NK cells in the presence of IL-2 or IFN- $\alpha$  [8]. However, the role of IL-2 secreted by conventional DC or PDC in the induction of immune responses is still controversial [9–11].

IL-2, historically known as the main T cell growth factor, may act on multiple cell targets. It binds to a specific high-affinity receptor ( $K_d = 5\text{--}10$  pM) consisting of three different polypeptide chains [12]. The  $\alpha$  (CD25) chain is mainly involved in cytokine binding, whereas the  $\beta$  (CD122) and  $\gamma$  (CD132) chains are necessary for signal transduction events involving the tyrosine-specific kinases JAK1 and JAK3. Although the induction of CD25 has been classically used as a lymphocyte activation marker, different DC subtypes from both human and mice may express CD25 [13–16]. Additionally, IL-2 and CD25 have been associated with maturation of human monocyte-derived DC [17, 18], and CD25 induction has also been shown in murine intestinal lymph DC [19]. Functionally, the expression of IL-2R $\alpha$  by murine DC does not modify the magnitude of allogeneic T cell proliferation [20]. In contrast, IL-2 has been reported to augment the IL-12-induced IFN- $\gamma$  production by murine splenic DC [21], an effect that could be blocked by anti-CD25 monoclonal antibodies.

Although mentioned in several publications [22, 23], the functional characteristics of CD25 and the possible role of IL-2 on activated PDC have not been studied. Here, we have investigated the expression and functional implications of the IL-2R on human activated PDC, using separately CD40L (a non-IL-2-inducing stimulus) and CpG (an IL-2-inducing stimulus) as activating factors. Our results show that CD25 is an early activation marker that plays a functional role in the modulation of cytokine secretion by activated PDC, and provide evidence that IL-2 may also enhance the survival of these cells upon activation.

## Results

### Activation-induced expression of CD25 by human PDC

Immature human PDC did not express either CD25 or CD122 upon isolation ( $n > 10$ ). To analyze the capacity of these cells to express CD25 and CD122 following activation, sorted PDC (Fig. 1A) were cultured for up to 48 h and the surface expression of each marker was assessed using specific monoclonal antibodies. In control experiments, PDC cultured for 48 h in the presence of IL-3, or the combination of IL-3 + IL-2

(200 U/mL), did not show any CD25 expression. However, activation of PDC using either CpG or CD40L induced the expression of CD25 in these cells ( $66 \pm 17\%$  and  $55 \pm 13\%$ , respectively,  $n \geq 4$ ). Confirming the activation state of these cells, PDC also expressed high levels of HLA-DR and CD86, as expected. In contrast, a moderate expression of CD122 was detected in all conditions tested (Fig. 1B).

Time course experiments revealed that the majority of the cultured PDC expressed CD25 as early as 6 h after CpG activation ( $92 \pm 19\%$ ,  $n \geq 5$ ). At the same time point, CD40L activated CD25<sup>+</sup> PDC represented about 30% of the total PDC. However, this proportion was increased up to 60% at 24 h of activation (Fig. 1C). Finally, as previously reported, IL-2 mRNA expression could only be detected upon CpG activation but not upon CD40L activation (Fig. 1D).

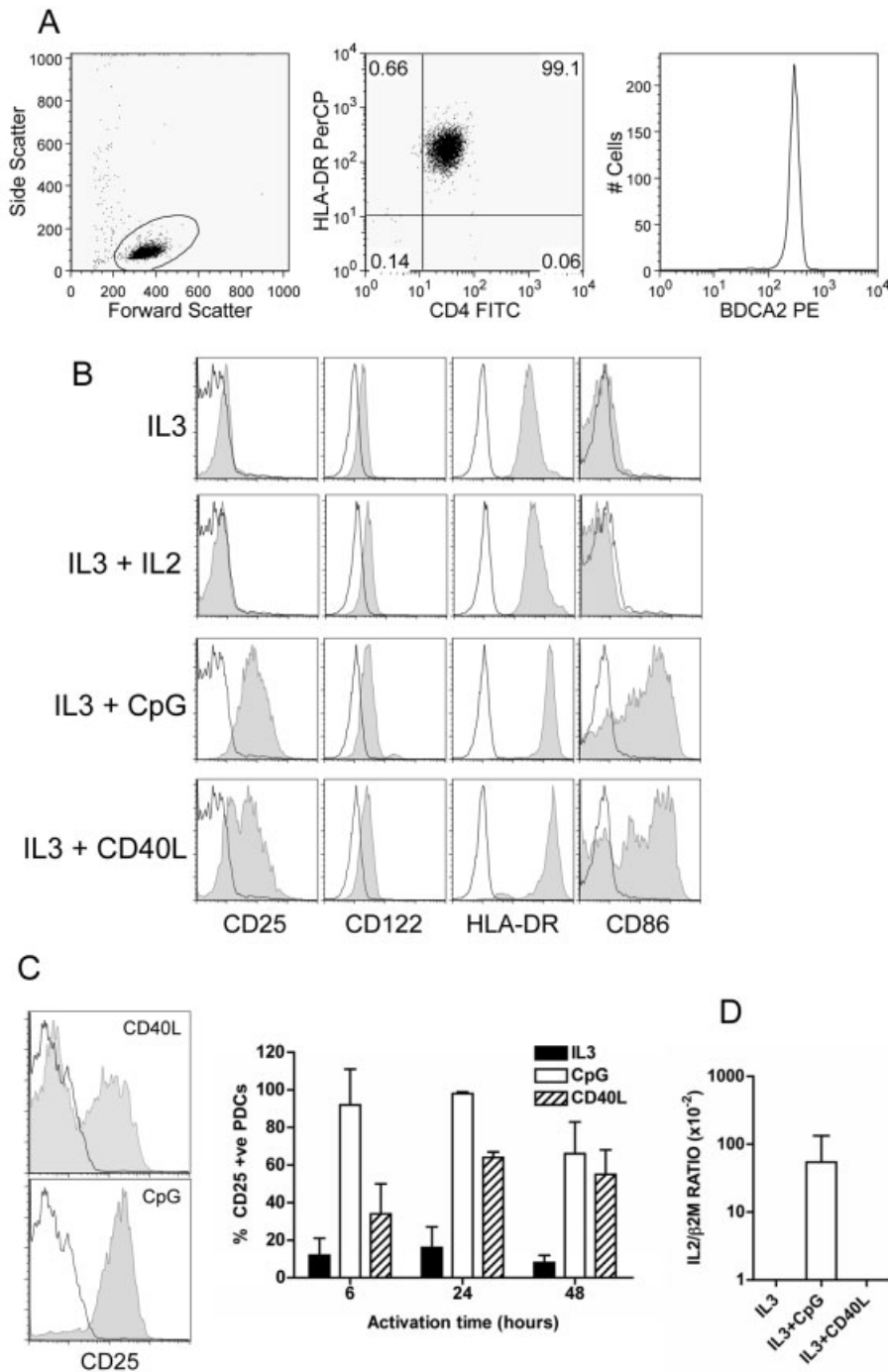
### IL-2 effect on CD40L-activated PDC

As CD40L-activated PDC express IL-2R but do not produce endogenous IL-2, these cells were cultured either in the presence or absence of exogenous IL-2 to assess the effect of the cytokine on CD40L-activated PDC. Based on the results mentioned above, the induction of CD25 expression was used as an early marker of cell activation. After 24 h of incubation, the addition of increasing amounts of IL-2 resulted in a higher proportion of CD40L-activated CD25<sup>+</sup> PDC ( $48 \pm 12$  vs.  $63 \pm 9$ ,  $n = 4$ , paired *t*-test,  $p = 0.01$ ) (Fig. 2A). The secretion of cytokines was also analyzed in supernatants from these CD40L-induced cultures (Fig. 2B). The presence of IL-2 (800 U/mL) resulted in a significantly increased secretion of TNF- $\alpha$  in these cultures ( $240 \pm 215$  vs.  $354 \pm 271$  pg/mL,  $n = 6$ , Wilcoxon test,  $p = 0.03$ ). IL-6 did not show significant changes, although some samples contained increased levels ( $29 \pm 38$  vs.  $90 \pm 163$  pg/mL,  $n = 7$ , Wilcoxon test,  $p = \text{n.s.}$ ). Additionally, an important secretion of IL-4 was found in cultures containing exogenous IL-2 ( $11 \pm 6$  vs.  $55 \pm 34$  pg/mL,  $n = 7$ , paired *t*-test,  $p \leq 0.0001$ ). Finally, small amounts of IFN- $\gamma$  were also detected in cultures where CD40L-activated PDC received the IL-2 stimulus during 24 h ( $1.7 \pm 1.3$  vs.  $31 \pm 26$  pg/mL,  $n = 5$ , Wilcoxon test,  $p = 0.06$ ) (Fig. 2B). Overall, the results showed that the presence of IL-2 had a significant effect on the secretion of some cytokines induced by CD40L stimulation in PDC, including TNF- $\alpha$  and IL-4.

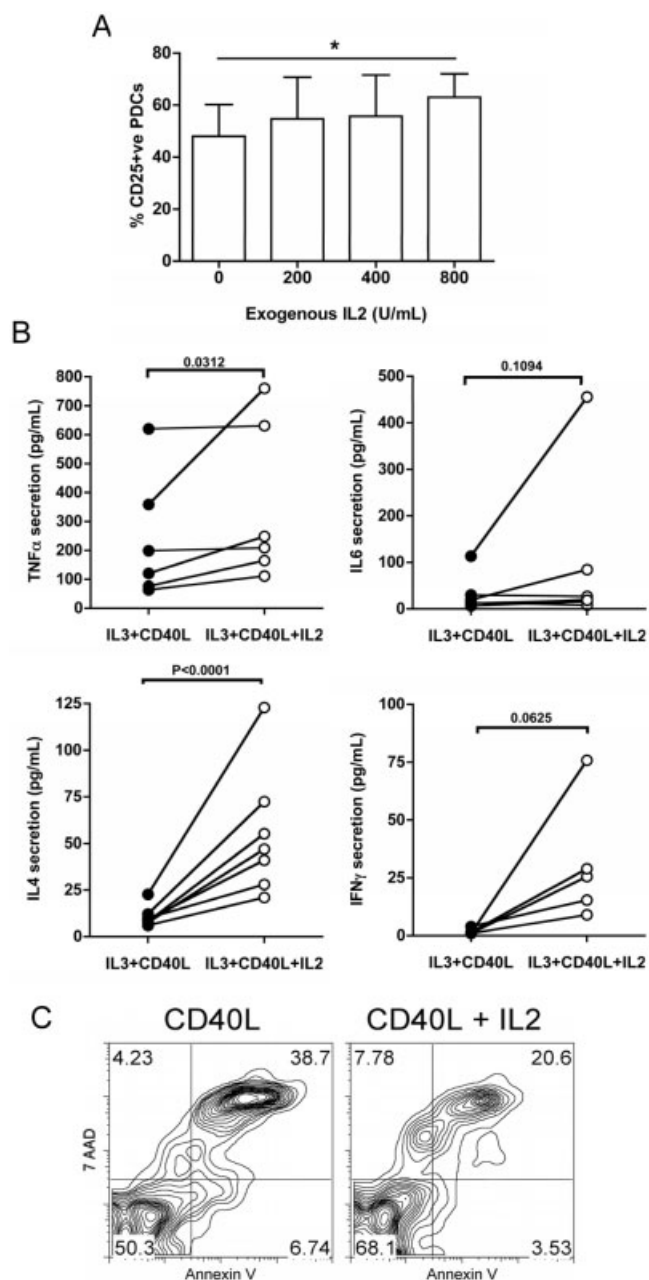
As activated T cells may supply both CD40L and IL-2 stimuli, and the effect of T cells on PDC survival has been well established, we also tested whether exogenous IL-2 may have a positive effect on PDC survival upon activation. In four different experiments, CD40L activation of PDC in the presence of IL-2 resulted in a higher

proportion of Annexin V/7-amino-actinomycin D (7-AAD) double-negative cells compared to those receiving the CD40L stimulus only ( $58 \pm 24$  vs.

$44 \pm 21$ ,  $n = 4$ ,  $p = 0.01$ , paired  $t$ -test) (Fig. 2C), confirming that IL-2 may play a role in PDC survival upon activation.



**Figure 1.** The expression of CD25, CD122 and IL-2 mRNA on activated PDC. (A) Assessment of PDC isolation after sorting. Cells were gated (left plot) and analyzed for the double expression of CD4 and HLA-DR (middle plot) and BDCA-2 (right plot). Numbers in the middle plot indicate the percentages of cells in each quadrant. (B) Sorted PDC were cultured for 48 h in the presence of IL-3 + IL-2, CpG or CD40L as indicated. The expression of CD25, CD122 and the activation markers HLA-DR and CD86 is shown (one representative experiment of four). (C) Histograms show the expression of CD25 after 6 h of CpG or CD40L activation. The time course expression of CD25 upon activation is shown in the bar plot (mean  $\pm$  SD,  $n \geq 5$  experiments). (D) The induction of IL-2 mRNA in PDC. Cells were incubated for 6 h in the presence of IL-3, IL3 + CpG or IL-3 + CD40L as shown. After the incubation, total mRNA was extracted and the proportion of IL-2 mRNA was calculated as relative to  $\beta$ 2-microglobulin expression. The mean  $\pm$  SD of three independent experiments is shown.



**Figure 2.** IL-2 modulates CD25 expression, cytokine secretion and survival of CD40L-activated PDC. Sorted PDC were cultured with IL-3 + CD40L for 24 h. In some cultures, exogenous IL-2 was added. (A) The presence of increasing amounts of IL-2 enhanced the proportion of CD25<sup>+</sup> CD40L-activated PDC. The mean  $\pm$  SD of four independent experiments is shown ( $*p \leq 0.05$ ). (B) Supernatants of at least five independent experiments were collected and the indicated cytokines quantified by CBA. Plots show the results of the respective treatment in each individual sample. Significance is indicated by the  $p$  value. (C) PDC were cultured for 24 h as above, but without exogenous IL-3. After the incubation period, cells were recovered and viability analyzed by Annexin V and 7-AAD expression. Contour plots show the results of one representative experiment of four. The numbers indicate the percentages of cells in each quadrant.

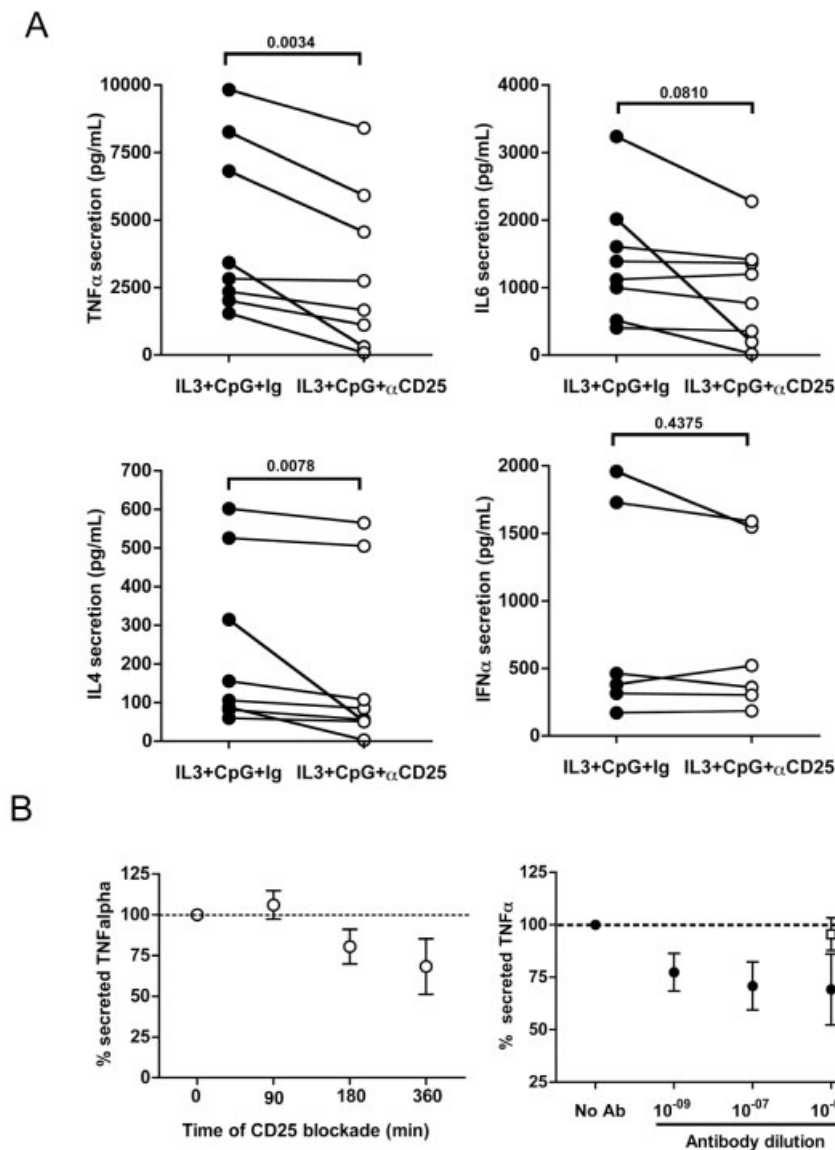
### Effect of IL-2 blockade in CpG-induced PDC activation

As previously shown, CpG-activated PDC induced IL-2 mRNA shortly after the stimulation. In our experiments, minute amounts of IL-2 were detected in supernatants by cytometric bead array (CBA), but the results showed a wide variation depending on each sample (data not shown). However, the presence in the culture of endogenous IL-2 secreted by PDC upon CpG activation could have a functional effect on PDC. To explore this possibility, PDC were *in vitro* CpG-stimulated during 6 h in the presence of an anti-CD25 blocking monoclonal antibody (MAR108) or an isotype control antibody. Interestingly, the presence of MAR108 significantly reduced the secretion of TNF- $\alpha$  by activated PDC ( $4637 \pm 3191$  vs.  $3103 \pm 2957$  pg/mL,  $n = 8$ , paired  $t$ -test,  $p = 0.0034$ ) (Fig. 3A). IL-4 was also detected at slightly reduced levels ( $242 \pm 215$  vs.  $178 \pm 223$  pg/mL,  $n = 8$ , Wilcoxon test,  $p = 0.0078$ ). Finally, although in some samples IL-6 also exhibited reduced levels ( $1412 \pm 911$  vs.  $950 \pm 759$  pg/mL,  $n = 8$ , paired  $t$ -test,  $p = 0.081$ ), the results were not found to be significant. In sharp contrast, IFN- $\alpha$  secretion was not modified in the presence of the blocking CD25 antibody ( $837 \pm 790$  vs.  $751 \pm 642$  pg/mL,  $n = 6$ ,  $p = \text{n.s.}$ ).

The effect of CD25 blockade was both dose and time dependent (Fig. 3B). In three independent experiments, blocking anti-CD25 antibodies added to the culture media for the whole activation period (6 h) were able to inhibit TNF secretion up to 30% (Fig. 3B). The inhibitory effect was still observed when the blocking antibody was added for the last 180 min of incubation (after 3 h of activation). In contrast, when the blocking antibody was added during the last 90 min of incubation (after 4.5 h of activation), the inhibitory effect was lost. These results suggest that the putative effect of endogenous IL-2 on TNF- $\alpha$  secreted by PDC occurs during the early phases of cell activation.

To further analyze the inhibition of TNF- $\alpha$  secretion due to CD25 blockade, total mRNA of 6-h CpG-activated PDC was obtained and RT-PCR was performed. In two independent experiments, the relative expression of TNF- $\alpha$  was approximately increased by tenfold in CpG-activated PDC compared to non-activated controls (Fig. 4). The presence of blocking anti-CD25 antibodies did not induce any significant change on the TNF mRNA levels, suggesting that the modulatory effect of CD25 blockade must occur at the post-transcriptional level.

Finally, the addition of exogenous IL-2 (400 U/mL) to CpG-activated PDC resulted in a moderate increase of TNF and IL-4 secretion whilst IL-6 levels were not substantially different (data not shown).



**Figure 3.** CD25 blockade on CpG-activated PDC impairs cytokine secretion in a time-dependent fashion. (A) PDC were cultured with IL-3 + CpG in the presence of CD25-blocking antibodies (anti-CD25) or isotype control antibodies (Ig). After 6 h, supernatants were collected and the indicated cytokines analyzed by either ELISA or CBA. Plots show the results of the respective treatment in each individual sample (eight independent experiments). Significance is indicated by the *p* value. (B) Time- and dose-dependent CD25 blockade on CpG-activated PDC. Cells were activated in culture by CpG for 6 h. The CD25-blocking antibody was added at the beginning of the incubation (360 min of blockade), after 3 h since the initial activation (180 min of blockade), or after 4.5 h since the initial activation (90 min blockade). All supernatants were analyzed after the whole incubation period (6 h). For the dose-response experiments (right panel), cells were incubated for 6 h in the presence of the indicated antibodies (black symbols). Isotype control (white square) was measured at the highest concentration. The results (mean  $\pm$  SD, *n* = 3) are expressed as the proportion of secreted TNF compared to non-blocking (isotype) conditions (dotted line).

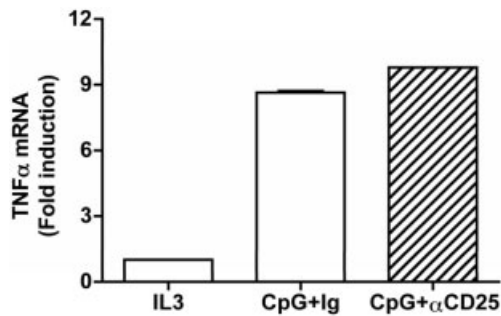
## Discussion

Different subtypes of DC, including activated PDC, have been shown to express CD25 [22, 23], but to our knowledge the data reported here constitutes the first functional study on the role of IL-2/IL-2R in the biology of human PDC.

Our results confirm that both CpG and CD40L induce the up-regulation of CD25 in human PDC, with high

levels of expression being detected within the first 6 h of activation. A recent report has also shown an early up-regulation of CD25 expression by murine intestinal migrating lymph DC that had been activated by resiquimod, a TLR7/8 ligand [19], indicating that CD25 may be one of the early activation markers for PDC.

Depending on the stimulus, some differential effects may be observed. CpG induces a rapid and important



**Figure 4.** CD25 blockade on CpG-activated PDC did not affect TNF mRNA expression. PDC were activated and cultured in the presence (striped bar) of CD25-blocking antibody ( $10^{-5}$ ) or isotype control antibody (white bar). After 6 h, the cells were recovered, total mRNA was extracted, and TNF- $\alpha$  mRNA revealed by RT-PCR using specific primers. The results are expressed as the fold induction of normalized values (TNF- $\alpha/\beta 2m$ ) compared to non-stimulating conditions (IL-3). A representative experiment of two is shown.

expression of CD25, which is concomitant to IL-2 mRNA induction by these cells. In contrast, CD25 expression by CD40L-activated PDC is slightly delayed when compared to CpG. These differences were not all that unexpected, given the different sources of the stimuli, *i.e.* activated T cells *versus* microbial DNA/RNA, which use completely different signaling pathways that also trigger very different levels of inflammatory cytokine secretion. It is well established, and also confirmed here, that CpG stimulation of PDC induces high levels of inflammatory cytokine production while the CD40L effect is much more moderate [3].

To explore the function of newly expressed IL-2R, we recurred to experiments in which either exogenous IL-2 was added or the CD25 was blocked with antibodies, depending on the activating stimuli used.

Functionally, the addition of exogenous IL-2 to CD40L-activated PDC resulted in: (1) a higher expression of CD25 by these cells, a classical effect of IL-2-IL-2R ligation in T cells [24]; (2) an increased expression of pro-inflammatory cytokines, similarly to data described in monocyte-derived DC [18]; and (3) an increased survival, the latter supporting the view that factors other than IL-3 may have an anti-apoptotic effect in PDC [25]. Although previously described in PDC from lymph nodes [26], an unexpected observation was the secretion of IL-4 by CpG-activated and/or CD40L + IL-2-activated PDC. This effect is similar to the well-described IL-4 secretion by T cells in response to IL-2 [27]. Functionally, IL-4 was first shown to induce apoptosis on freshly isolated PDC [28]. However, activated PDC are resistant to IL-4-induced cell death ([28] and our own results) but may still be responsive to this cytokine. A recent report has linked the expression of IL-4 and secretion of IFN- $\gamma$  by mouse PDC [29]. Interestingly, we

also detected small amounts of IFN- $\gamma$  in supernatants from CD40L-stimulated PDC in the presence of IL-2, in which IL-4 was also found. With regard to IFN- $\gamma$  secretion, IL-2 has also been demonstrated to have a synergistic effect with IL-12, CD40 ligation and/or MHC class II stimulation on DC to induce IFN- $\gamma$  production [21]. Altogether, our results may suggest a modulatory role for IL-2 and CD40L provided by activated T cells on DC, which may in turn secrete important factors to direct the final differentiation of T cells. Thus, IL-2 may act as a modulatory factor for cytokines secreted by activated human PDC. Being located in the T cell area of the lymph node, PDC are ideal candidates for creating a cytokine environment influencing T cell differentiation.

Granucci *et al.* [30] demonstrated that mouse DC were able to produce IL-2. A more recent publication from the same group has also confirmed the capacity of both subtypes of human DC (conventional and plasmacytoid) to produce IL-2, but only upon microbial stimulation [4], a finding with implications for both innate and adaptive immune responses. As CpG activation clearly up-regulated IL-2R expression by PDC, a putative auto/paracrine role for IL-2 could be proposed. To explore this possibility, we conducted experiments in which an anti-CD25 blocking monoclonal antibody [31] was added to PDC activated by CpG in a setting in which the only source of IL-2 are PDC themselves. Anti-CD25 antibodies were indeed able to reduce the secretion of TNF- $\alpha$  and, to a lesser extent, of IL-6, but did not substantially modify IFN- $\alpha$  secretion. CpG is a powerful stimulus for PDC, and it is not surprising that the blockade of CD25 does not completely abolish the production of inflammatory cytokines. Our group has reported similar results when PDC were pretreated with the calcineurin inhibitor Tacrolimus prior to CpG activation [32]. Among other effects, Tacrolimus may directly inhibit the binding of NF- $\kappa$ B, induced by CpG-TLR induction, to its DNA regulatory motifs, which are present in the promoter of TNF among many other genes. Thus, it is possible that the interaction between IL-2 and its receptor leads to the activation and nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in PDC, as known for other cell types [33]. In this sense, type I IFN production is considered the only non-NF- $\kappa$ B-mediated activation event in PDC [34], which could explain the unchanged levels detected here and in our previous work [32].

Interestingly, the inhibitory effect observed by CD25-blocking antibodies was both dose and time dependent. When PDC were activated and the blocking monoclonal antibody was added 3 h later, the inhibitory effect was lost, suggesting a modulatory effect on TNF production, most possibly through IL-2. The results obtained in the CD40L experiments also support the view that the IL-2-IL-2R interaction exhibits cytokine modulatory proper-



ties. Moreover, the modulation of TNF secretion by IL-2 has already been published [35, 36]. From the results presented here, a post-transcriptional regulation of TNF secretion is strongly suggested. This modulation of TNF secretion has been previously reported in monocytes and T cells in the presence of MAPK and PI3K inhibitors [37, 38], thus suggesting a potential regulatory role of these two signaling mediators in the IL-2/IL-2R pathway also in PDC.

To summarize, our results show that PDC express a functional IL-2R in response to different activation stimuli. This acquisition of IL-2 responsiveness by PDC may be important in the context of antigen presentation. When T cells recognize antigen on DC, the interaction is prolonged and IL-2 is produced. The ability of PDC to respond to IL-2 may contribute to the ongoing T cell activation by providing further cytokines such as TNF or IL-4. In the small enclosure of the immunological synapse, the amount of cytokines released may reach considerably high concentrations [39]. This active role of PDC during the interaction with T cells may contribute to shift T cell differentiation to one of the effector phenotypes [40]. Additionally, CD25 is a good candidate as PDC early activation marker in functional experiments.

## Materials and methods

### PDC isolation

Buffy coats, provided by our Blood Bank department, were obtained from healthy blood donors following all the guidelines and standards for blood donation. PBMC were isolated by Ficoll-Paque density gradient centrifugation (Lymphoprep; Axis Shield, Oslo, Norway) and PDC were isolated from PBMC by sorting (FACSVantage cell sorter; BD Biosciences, San Jose, CA) as described [25]. PDC were defined as CD4<sup>+</sup> BDCA2<sup>+</sup> HLADR<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup>. In all samples, the purity and viability of the purified PDC was over 99%, as assessed by expression of specific markers and Trypan blue exclusion or Annexin V + 7-AAD labeling (BD Biosciences, Oxford, UK), respectively. Immaturity of isolated cells was revealed by the low/negative expression of CD80 and CD86.

### Cell culture

PDC were cultured for the indicated time periods and conditions in 96-well flat-bottom plates at approximately  $1 \times 10^5$  cells/well (Nunc, Roskilde, Denmark). The culture medium was composed of RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, UK) supplemented with 10% v/v heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco), 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich Company LTD, St. Louis, MO), 100 U/mL penicillin (Cepa S.L, Madrid, Spain), and 100 µg/mL streptomycin (Laboratorios Normon S.A, Madrid, Spain). Recombinant human IL-3 (Peprotech, London, UK) was used at 10 ng/mL, and IL-2 (Roche, Mannheim, Germany) was used as

indicated. Previously described CpG-A ODN [41] (Sigma-Aldrich) was used at 50 µg/mL to yield maximal activity. Murine CD40L-transfected and control L-cells (kindly donated by Prof. John Gordon) were used as a source of CD40L. These cells were maintained in RPMI + 10%FCS and irradiated (90 Gy; CLINAC 2100C Varian, Milpitas, CA) before use.

### Antibodies, immunostaining and flow cytometry

The following murine monoclonal antibodies were used: peridinin chlorophyll protein (PerCP)-labeled anti-HLA-DR; fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-CD4; phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD11c, -CD25, -CD40, -CD80, -CD83, -CD86, -CD122 and -CD123 (BD Biosciences); FITC-labeled anti-BDCA2 (Miltenyi Biotec); RPE-Cy5-labeled anti-CD14, -CD19 (Serotec Ltd., Kidlington, Oxford, UK). Isotype-matched antibodies were used as controls. Cells were washed, resuspended in 50 µL buffer (PBS + 0.1% BSA) and incubated with monoclonal antibodies for 20 min at 4°C. Analyses were performed in a FACSCalibur flow cytometer using the standard CellQuest acquisition software (BD Biosciences). Samples were gated using forward (FSC) and side scatter (SSC) to exclude dead cells and debris. The CD25-blocking monoclonal antibody MAR108 (kindly donated by Prof. Miguel Lopez-Botet, UPF, Barcelona) was used at a  $10^{-5}$  dilution unless otherwise stated. This antibody has been previously shown to block IL-2 binding to its high-affinity receptor in T lymphocytes [31].

### Cytokine analyses

Cytokines were determined on supernatants using the CBA assay (BD Biosciences). IFN- $\alpha$  was determined on supernatants using an ELISA kit (Bender Medisystems) following the manufacturer's instructions.

### Relative mRNA expression by real-time PCR

Total RNA was extracted from cells using TRIzol reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. Aliquots of 1 µg total RNA, 0.5 µg oligo-(dT) (Sigma-Aldrich) as primers and 2 µL dNTPs (mix, 5 mM each; Sigma-Aldrich) were dissolved with sterile RNase-free water until 12 µL, heated at 65°C for 5 min and cooled at 4°C. Then, 4 µL of First Strand Buffer 5 $\times$  (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl, pH 8.3; Invitrogen SA, Barcelona, Spain), 2 µL 100 mM dithiothreitol (Invitrogen) and 1 µL RNase inhibitor (RNasa OUT; Invitrogen) were added and incubated at 42°C for 2 min. The reaction was started adding 1 µL (200 U) SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen), incubated at 42°C for 50 min and finished at 70°C for 15 min. The cDNA were amplified using a commercially available kit, LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche). Each reaction was carried out with 2 µL cDNA, 4 µL 5 $\times$  Master Mix (FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I), 0.5 µM of each primer and sterile RNase-free water at a final volume of 20 µL. Real-time PCR was carried out for 35 cycles using the LightCycler instrument (Roche). Specific primers were selected according to the GeneBank database resource. Primer sequences and temperatures for amplification were as follows: IL-2: amplicon 457 bp, forward: 5'-ATG TAC AGG ATG CAA

CTC CTG TCT T-3', reverse 5'-GTC AGT GTT CAG ATG ATG CTT TGA C-3' (5 s at 95°C, 5 s annealing at 69°C, 19 s at 72°C, and acquire for 4 s at 80°C); TNF $\alpha$ : amplimer 266 bp, forward: 5'-CTT CTC CTT CCT GAT CGT GC-3', reverse: 5'-GCT GGT TAT CTC TCA GCT CCA-3' (5 s at 95°C, 5 s annealing at 60°C, 11 s at 72°C, and acquire for 4 s at 84°C);  $\beta$ 2-microglobulin: amplimer 107 bp, forward: 5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC-3', reverse: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3' (5 s at 95°C, 10 s annealing at 58°C, 4 s at 72°C, and acquire for 4 s at 85°C).  $\beta$ 2-Microglobulin mRNA levels were used as an endogenous control to normalize mRNA quantities. The relative mRNA levels of each gene were calculated as follows: Relative mRNA expression =  $2^{-(Ct_{\text{gene}} - Ct_{\beta 2\text{-microglobulin}})}$  [42].

### Statistical analysis

Results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) unless otherwise stated. Comparison between groups was conducted using the Wilcoxon test for paired non-parametric data or the paired *t*-test for parametric data. Normal distributions were confirmed by the Kolmogorov-Smirnov test. Analyses were performed using the SigmaStat v3.0 software (SPSS, Erkrath, Germany). A value of *p* < 0.05 was considered significant.

**Acknowledgements:** The authors would like to thank Prof. Dr. Miguel Lopez-Botet (UPF, Barcelona) for the CD25-blocking antibody (MAR108) and Prof. Dr. John Gordon (Birmingham, UK) for the CD40L-transfected L-cells. Sorting and flow cytometry experiments were performed in the Cytometry Unit of the IGTP. This work has been partially supported by grants from the "Fondo de Investigaciones Sanitarias" FIS 01/3120 and FIS 03/0142 to F.E.B. M.N.G. is supported by a grant FIS 03/0142. F.E.B. is supported by contract FIS 01/3120 from the BST in collaboration with the Spanish Health Department.

### References

- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. and Palucka, K., Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000. **18**: 767–811.
- Liu, Y. J., IPC: Professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 2005. **23**: 275–306.
- Bauer, M., Redecke, V., Ellwart, J. W., Scherer, B., Kremer, J. P., Wagner, H. and Lipford, G. B., Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c<sup>+</sup>, CD123<sup>+</sup> dendritic cells. *J. Immunol.* 2001. **166**: 5000–5007.
- Feau, S., Facchinetti, V., Granucci, F., Citterio, S., Jarrossay, D., Seresini, S., Protti, M. P. *et al.*, Dendritic cell-derived IL-2 production is regulated by IL-15 in humans and in mice. *Blood* 2005. **105**: 697–702.
- Colonna, M., Trinchieri, G. and Liu, Y. J., Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* 2004. **5**: 1219–1226.
- Granucci, F., Zanoni, I., Pavelka, N., Van Dommelen, S. L., Andoniou, C. E., Belardelli, F., Degli Esposti, M. A. and Ricciardi-Castagnoli, P., A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation. *J. Exp. Med.* 2004. **200**: 287–295.
- Foti, M., Granucci, F. and Ricciardi-Castagnoli, P., A central role for tissue-resident dendritic cells in innate responses. *Trends Immunol.* 2004. **25**: 650–654.
- Hanabuchi, S., Watanabe, N., Wang, Y. H., Ito, T., Shaw, J., Cao, W., Qin, F. X. and Liu, Y. J., Human plasmacytoid pre-dendritic cells activate NK cells through glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand (GITRL). *Blood* 2006. **107**: 3617–3623.
- Granucci, F., Zanoni, I., Feau, S. and Ricciardi-Castagnoli, P., Dendritic cell regulation of immune responses: A new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity. *EMBO J.* 2003. **22**: 2546–2551.
- Romagnani, C., Della Chiesa, M., Kohler, S., Moewes, B., Radbruch, A., Moretta, L., Moretta, A. and Thiel, A., Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4(+) T helper cells and CD4(+) CD25(hi) T regulatory cells. *Eur. J. Immunol.* 2005. **35**: 2452–2458.
- Schartz, N. E., Chaput, N., Taieb, J., Bonnaventure, P., Trébeden-Nègre, H., Terme, M., Ménard, C. *et al.*, IL-2 production by dendritic cells is not critical for the activation of cognate and innate effectors in draining lymph nodes. *Eur. J. Immunol.* 2005. **35**: 2840–2850.
- Sugamura, K., Asao, H., Kondo, M., Tanaka, N., Ishii, N., Ohbo, K., Nakamura, M. and Takeshita, T., The interleukin-2 receptor gamma chain: Its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu. Rev. Immunol.* 1996. **14**: 179–205.
- Steiner, G., Tschachler, E., Tani, M., Malek, T. R., Shevach, E. M., Holter, W., Knapp, W. *et al.*, Interleukin 2 receptors on cultured murine epidermal Langerhans cells. *J. Immunol.* 1986. **137**: 155–159.
- Bykovskaja, S. N., Buffo, M. J., Bunker, M., Zhang, H., Majors, A., Herbert, M., Lokshin, A. *et al.*, Interleukin-2 induces development of dendritic cells from cord blood CD34<sup>+</sup> cells. *J. Leukoc. Biol.* 1998. **63**: 620–630.
- O'Doherty, U., Steinman, R. M., Peng, M., Cameron, P. U., Gezelter, S., Kopeloff, I., Swiggard, W. J. *et al.*, Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. *J. Exp. Med.* 1993. **178**: 1067–1076.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I. and Banchereau, J., Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* 1994. **180**: 1263–1272.
- von Bergwelt-Baildon, M. S., Popov, A., Saric, T., Chemnitz, J. M., Classen, S., Stoffel, M. S., Fiore, F. *et al.*, CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are upregulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells *in vivo*: Additional mechanisms of T cell inhibition. *Blood* 2006. **108**: 228–237.
- Sanarico, N., Ciarabella, A., Sacchi, A., Bernasconi, D., Bossù, P., Mariani, F., Colizzi, V. and Vendetti, S., Human monocyte-derived dendritic cells differentiated in the presence of IL-2 produce proinflammatory cytokines and prime Th1 immune response. *J. Leukoc. Biol.* 2006. **80**: 555–562.
- Yrliid, U., Milling, S. W., Miller, J. L., Cartland, S., Jenkins, C. D. and Macpherson, G. G., Regulation of intestinal dendritic cell migration and activation by plasmacytoid dendritic cells, TNF- $\alpha$  and type 1 IFNs after feeding a TLR7/8 ligand. *J. Immunol.* 2006. **176**: 5205–5212.
- Kronin, V., Vremec, D. and Shortman, K., Does the IL-2 receptor alpha chain induced on dendritic cells have a biological function? *Int. Immunol.* 1998. **10**: 237–240.
- Fukao, T. and Koyasu, S., Expression of functional IL-2 receptors on mature splenic dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 2000. **30**: 1453–1457.
- Willmann, K. and Dunne, J. F., A flow cytometric immune function assay for human peripheral blood dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 2000. **67**: 536–544.
- Ida, J. A., Shrestha, N., Desai, S., Pahwa, S., Hanekom, W. A. and Haslett, P. A., A whole blood assay to assess peripheral blood dendritic cell function in response to Toll-like receptor stimulation. *J. Immunol. Methods* 2006. **310**: 86–99.
- Smith, K. A. and Cantrell, D. A., Interleukin 2 regulates its own receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985. **82**: 864–868.
- Naranjo-Gómez, M., Fernández, M. A., Bofill, M., Singh, R., Navarrete, C. V., Pujol-Borrell, R. and Borràs, F. E., Primary alloproliferative Th1 response induced by immature plasmacytoid dendritic cells in collaboration with myeloid DCs. *Am. J. Transplant.* 2005. **5**: 2838–2848.

- 26 Cox, K., North, M., Burke, M., Singhal, H., Renton, S., Aqel, N., Islam, S. and Knight, S. C., Plasmacytoid dendritic cells (PDC) are the major DC subset innately producing cytokines in human lymph nodes. *J. Leukoc. Biol.* 2005. **78**: 1142–1152.
- 27 Seder, R. A., Germain, R. N., Linsley, P. S. and Paul, W. E., CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon gamma production. *J. Exp. Med.* 1994. **179**: 299–304.
- 28 Kohrgruber, N., Halanek, N., Gröger, M., Winter, D., Rappersberger, K., Schmitt-Egenolf, M., Stingl, G. and Maurer, D., Survival, maturation, and function of CD11c<sup>-</sup> and CD11c<sup>+</sup> peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J. Immunol.* 1999. **163**: 3250–3259.
- 29 Suto, A., Nakajima, H., Tokumasa, N., Takatori, H., Kagami, S., Suzuki, K. and Iwamoto, I., Murine plasmacytoid dendritic cells produce IFN-gamma upon IL-4 stimulation. *J. Immunol.* 2005. **175**: 5681–5689.
- 30 Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Rescigno, M. *et al.*, Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat. Immunol.* 2001. **2**: 882–888.
- 31 Lopez-Botet, M., Moretta, A., Lowenthal, J., Accolla, R., Pantaleo, G. and Moretta, L., Caracterización de anticuerpos monoclonales específicos para el receptor de interleucina 2. *Immunología* 1986. **5**: 46–50.
- 32 Naranjo-Gómez, M., Climent, N., Cos, J., Oliva, H., Bofill, M., Gatell, J. M., Gallart, T. *et al.*, Tacrolimus treatment of plasmacytoid dendritic cells inhibits dinucleotide (CpG)-induced tumour necrosis factor-alpha secretion. *Immunology* 2006. **119**: 488–498.
- 33 Arima, N., Kuziel, W. A., Grdina, T. A. and Greene, W. C., IL-2-induced signal transduction involves the activation of nuclear NF-kappa B expression. *J. Immunol.* 1992. **149**: 83–91.
- 34 Fuchsberger, M., Hochrein, H. and O'Keeffe, M., Activation of plasmacytoid dendritic cells. *Immunol. Cell. Biol.* 2005. **83**: 571–577.
- 35 Stanková, J., Dupuis, G., Gagnon, N., Thivierge, M., Turcotte, S. and Rola-Pleszczynski, M., Priming of human monocytes with leukotriene B4 enhances their sensitivity in IL-2-driven tumor necrosis factor-alpha production. Transcriptional and post-transcriptional up-regulation of IL-2 receptors. *J. Immunol.* 1993. **150**: 4041–4051.
- 36 Wei, S., Blanchard, D. K., Liu, J. H., Leonard, W. J. and Djeu, J. Y., Activation of tumor necrosis factor-alpha production from human neutrophils by IL-2 via IL-2-R beta. *J. Immunol.* 1993. **150**: 1979–1987.
- 37 Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D. *et al.*, A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994. **372**: 739–746.
- 38 Ramírez, M., Fernández-Troy, N., Buxadé, M., Casaroli-Marano, R. P., Benítez, D., Pérez-Maldonado, C. and Espel, E., Wortmannin inhibits translation of tumor necrosis factor-alpha in superantigen-activated T cells. *Int. Immunol.* 1999. **11**: 1479–1489.
- 39 Huse, M., Lillemeier, B. F., Kuhns, M. S., Chen, D. S. and Davis, M. M., T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nat. Immunol.* 2006. **7**: 247–255.
- 40 Krug, A., Veeraswamy, R., Pekosz, A., Kanagawa, O., Unanue, E. R., Colonna, M. and Cella, M., Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *J. Exp. Med.* 2003. **197**: 899–906.
- 41 Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdörfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z. K., Endres, S. *et al.*, Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 2001. **31**: 2154–2163.
- 42 O'Garra, A. and Howard, M., IL-10 production by CD5 B cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1992. **651**: 182–199.





RESULTADOS III



## Tacrolimus treatment of plasmacytoid dendritic cells inhibits dinucleotide (CpG)-induced tumour necrosis factor-alpha secretion

Mar Naranjo-Gómez, Nuria Climent, Joan Cos, Harold Oliva, Margarita Bofill, José M. Gatell, Teresa Gallart, Ricardo Pujol-Borrell and Francesc E. Borràs

Immunology 2006, 119, 488-498

### RESUMEN

#### Antecedentes:

En los estudios anteriormente mencionados, definimos la activación de las pDCs en un modelo de respuesta alogénica *in vitro*, y observamos el efecto de diferentes tipos de interacciones celulares y factores solubles involucrados en su activación. Quizás la interacción CD25-IL-2 sea una de las más novedosas respecto a este tipo celular. Esta interacción y su modulación está bien definida en linfocitos T por sus implicaciones en el rechazo de los trasplantes y otras patologías. Así, se han definido muchos inmunosupresores que actúan a nivel de la síntesis de IL-2 y/o su receptor, y que contribuyen a reducir el rechazo del injerto tras un trasplante de órgano y también en el tratamiento de algunas enfermedades autoinmunes y trastornos inflamatorios, como la artritis reumatoide y la dermatitis atópica.

El tacrolimus (FK506) es un agente inmunosupresor ampliamente utilizado que inhibe la proliferación de linfocitos T a través del bloqueo de la activación por NF-AT. Aunque los linfocitos T son las principales dianas de estas drogas farmacológicas, también se ha demostrado que afectan a otros tipos celulares, especialmente a APCs y en particular a las DCs. Sin embargo, el papel del FK506 en pDCs no se ha descrito.

#### Objetivos:

La finalidad de este estudio es investigar cómo el FK506 puede modular las funciones de las pDCs *in vitro*. Para ello, determinaremos el efecto que este

inmunosupresor tiene sobre la viabilidad, el fenotipo, la secreción de citocinas y la capacidad aloestimuladora de las pDCs.

#### Resultados y Conclusiones:

El efecto del FK506 se observa principalmente cuando las pDCs, se han incubado previamente con el agente inmunosupresor, es decir, antes de la activación.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran como el tacrolimus reduce la expresión de moléculas coestimuladoras en superficie y afecta a la secreción de citocinas, especialmente de TNF- $\alpha$ . Así pues en el contexto de la respuesta inmune, el tratamiento con FK506 afectaría a la respuesta adaptativa inducida por pDCs.



# Tacrolimus treatment of plasmacytoid dendritic cells inhibits dinucleotide (CpG)-induced tumour necrosis factor- $\alpha$ secretion

Mar Naranjo-Gómez,<sup>1</sup> Nuria Climent,<sup>2</sup> Joan Cos,<sup>3</sup> Harold Oliva,<sup>2</sup> Margarita Bofill,<sup>4</sup> José M. Gatell,<sup>2</sup> Teresa Gallart,<sup>2</sup> Ricardo Pujol-Borrell<sup>1</sup> and Francesc E. Borràs<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunobiology for Research and Diagnosis (LIRAD), Blood and Tissue Bank (BST), Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Barcelona, Spain,

<sup>2</sup>Service of Immunology and Service of Infectious Diseases and AIDS Unit, Hospital Clínic de Barcelona. IDIBAPS-AIDS-Research Group,

<sup>3</sup>Centre de Teixits i Teràpia Cellular, BST, Barcelona, and <sup>4</sup>Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA). IrsiCaixa Foundation. Badalona, Barcelona, Spain

doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02460.x

Received 8 April 2006; revised 24 July 2006; accepted 24 July 2006.

Correspondence: Dr Francesc E. Borràs, LIRAD-Banc de Sang i Teixits, Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol, Ctra. del Canyet s/n, Edifici Escoles 08916, Badalona, Barcelona, Spain.  
Email: feborras@ns.hugtip.scs.es

## Introduction

Immunosuppressive agents (IAs) are used currently to reduce allograft rejection following organ transplantation<sup>1,2</sup> and also in the treatment of several autoimmune disorders and inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis and atopic dermatitis.<sup>3,4</sup> One of the most widely used IAs is tacrolimus, a macrolide lactone antibiotic obtained from a Japanese fungus (*Streptomyces tsukubensis*). Similar to cyclosporin A, the main effect of tacrolimus in T lymphocytes is the inhibition of the calcineurin activity, although it binds to FKBP12, whereas cyclosporin binds to cyclophilin A.<sup>5</sup> These intracellular proteins form a complex with calcium, calmodulin and calcineurin, inhibiting the phosphatase activity of calcineurin. One of the final consequences is the sequestration of phosphoryl-

## Summary

Tacrolimus is a widely used immunosuppressive agent. Although T cells are the main targets of these pharmacological drugs, antigen presentation may also be affected. Among antigen-presenting cells, plasmacytoid dendritic cells (PDCs) are the main source of type I interferons upon microbial challenge, and are involved in several diseases and autoimmune disorders. The aim of this study was to evaluate whether tacrolimus can modulate the function of PDCs *in vitro*. Maturation and function of PDCs was determined using flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay and cytometry bead arrays. The effect of tacrolimus on PDCs was observed mainly when the cells were pretreated with the immunosuppressive agent before activation. Upon dinucleotide-oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) activation, tacrolimus pretreated PDCs showed a significant reduction in the surface expression of co-stimulatory molecules and human leucocyte antigen D-related (HLA-DR) and secreted reduced levels of tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . These results show that tacrolimus treatment of PDCs impairs CpG-induced activation, which could affect the outcome of the immune response.

**Keywords:** autoimmunity; immunosuppression; plasmacytoid dendritic cells; tacrolimus; transplantation

ated-NF-AT in the cytoplasm and the inhibition of interleukin (IL)-2 secretion by T cells. Several authors have pointed out that IAs, including tacrolimus, may be also affecting the immune response at the level of antigen presentation,<sup>6,7</sup> especially in dendritic cells (DCs).<sup>8-13</sup> In particular, CD34<sup>+</sup>-derived DCs cultured in the presence of tacrolimus showed a poor capacity to stimulate allogeneic T cell responses and secreted low levels of IL-12.<sup>14</sup> Also, monocyte-derived DCs (MDDCs) cultured in the presence of tacrolimus display a reduced allostimulatory capacity and impaired cytokine production, including IL-12, IL-6 and tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ ,<sup>15,16</sup> possibly affecting the nuclear factor (NF)- $\kappa$ B translocation to the nucleus as shown in other cell types.<sup>17</sup>

The effect of different IAs has been studied mainly on myeloid DCs. However, DCs form a heterogeneous family

represented by two main populations, the myeloid and the plasmacytoid subsets.<sup>18,19</sup> Plasmacytoid DCs (PDCs) are the main producers of type I interferons (IFN) upon microbial infection, linking innate and adaptative immune responses.<sup>20</sup> *In vitro*, PDC may be activated by CD40 ligation and/or dinucleotide (CpG) oligodeoxynucleotide (CpG-ODN),<sup>21</sup> inducing different types of responses, including peripheral tolerance.<sup>22,23</sup> CpG oligodeoxynucleotides are often used to induce PDC activation via recognition of Toll-like receptor 9 (TLR9). It has been shown that diverse CpG-ODNs may induce a different type of maturation/activation on PDCs, especially with regard to IFN- $\alpha$  secretion.<sup>21</sup> PDCs may migrate constitutively to lymph nodes in steady-state conditions.<sup>24</sup> However, PDCs have been also found in different tissues upon inflammation and in some autoimmune disorders, such as rheumatoid and psoriatic arthritis.<sup>25</sup> Importantly, autoimmune disorders such as systemic lupus erythematosus (SLE)<sup>26,27</sup> and primary Sjögren's syndrome<sup>28</sup> are also related to PDC function. This relation is based mainly in the capacity of PDCs to secrete type I IFN, the presence of factors inducing this function – such as anti-dsDNA antibodies<sup>29</sup> in the serum of autoimmune patients<sup>30</sup> – and the consistent up-regulation of IFN-regulated genes observed in SLE patients.<sup>31</sup> Also, the induction of SLE-like syndromes in patients after type I IFN treatment further confirmed the role of the cytokines and PDCs in the etiology of the disorder. Often, patients affected by lupus and other autoimmune diseases are treated with corticosteroids, which have been shown to reduce both the number of circulating cells and the ability to produce IFN per PDC.<sup>32</sup> In this regard, a recent study exposed the role of dexamethasone in PDC-enhanced apoptosis and suppression of differentiation from haematopoietic precursors.<sup>33</sup>

Due to the implication of PDCs in several autoimmune disorders and their essential role in innate and adaptative immunity, our aim was to investigate whether tacrolimus could modulate PDC function. Our results show that tacrolimus may affect the immune response induced by PDCs through co-stimulatory blockade and impairment in cytokine secretion.

## Materials and methods

### Cells

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from apheresis products of healthy blood donors from the Blood and Tissue Bank (BTB) by Ficoll-Paque density gradient centrifugation (Lymphoprep, Axis Shield, Oslo, Norway). Blood PDCs were enriched from PBMC using the BDCA-4 cell isolation kit and the Automacs device (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). In some experiments PDCs were obtained by cell sorting, as

reported previously.<sup>34</sup> In all samples, the purity and viability of the enriched PDCs was over 90%, as assessed by expression of specific markers and trypan blue exclusion or annexin V + 7-actinomycin D labelling (BD Biosciences, Oxford, UK), respectively. Naive cord blood T cells (CbT) were obtained from umbilical cord blood units (supplied by the Cord Bank of Barcelona) rejected for banking owing to their low volume. Cord blood mononuclear cells were obtained as in PBMCs and CD3<sup>+</sup> T lymphocytes were purified by negative selection (Miltenyi Biotec). The purity of the CbT cells was 90–95% in all experiments.

### Oligodeoxynucleotides

Endotoxin-free phosphorothioate-modified stimulatory CpG-ODNs (CpG-2216 and CpG-2006) (Invitrogen Corporation, Paisley, UK) have been described previously.<sup>21</sup> CpG-ODNs were resuspended in TE buffer, diluted in phosphate-buffered saline (PBS) and used as indicated.

### Monoclonal antibodies

The following murine monoclonal antibodies (mAbs) and isotype controls were used: peridinin chlorophyll protein (PerCP)-labelled CD3 and human leucocyte antigen D-related (HLA-DR); fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled CD4; phycoerythrin (PE)-labelled CD11c, CD80, CD83, CD86 and CD123 (BD Biosciences); allophycocyanin (APC)-labelled IFN- $\gamma$  (Caltag Laboratories, Hamburg, Germany); FITC-labelled anti-BDCA2 (Miltenyi Biotec); and RPE-Cy5-labelled CD14, CD19 (Serotec Ltd, Kidlington, UK).

### Immunostaining and flow cytometry

Cells were washed, resuspended in 50  $\mu$ l of buffer [PBS + 0.1% bovine serum albumin (BSA)] and incubated with mAbs for 20 min at 4°. Cells were then washed, resuspended in PBS and analysed in a FACSCalibur flow cytometer using the standard CellQuest<sup>TM</sup> acquisition software (BD Biosciences, Oxford, UK). Samples were gated using forward (FSC) and side (SSC) scatter to exclude dead cells and debris.

### Cell culture media and reagents

A minimum of 50 000 PDCs were cultured in 200  $\mu$ l in flat-bottomed 96-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) containing RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, UK) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco), 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 100 U/ml penicillin (Cepa SL, Madrid, Spain), 100  $\mu$ g/ml streptomycin

(Laboratorios Normon SA, Madrid, Spain), 250 ng/ml Fungizone<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich) and recombinant human IL-3 (Peprotech, London, UK) used at 25 ng/ml. Tacrolimus (PROGRAF<sup>®</sup>; Fujisawa Ireland Limited, Killorglin, Ireland) was used mainly at 5 µM, based on published observations.<sup>11</sup> Other doses are indicated in each experiment. CpG-ODNs were used at 50 µg/ml to yield maximal activity and were added at the indicated time-points. After the incubation, supernatants were collected and cells counted using perfect count beads (BD Biosciences). Dead cells were excluded by size and annexin V detection.

#### *Cytokine analyses*

Cytokines were determined on supernatants using the cytometric bead array (CBA) assay (BD Biosciences). PDCs secreted IFN-α was determined on supernatants using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Bender Medisystems, Vienna, Austria) following the manufacturer's instructions. The presence of tacrolimus in supernatants was analysed using a specific immunoassay (IMX system, tacrolimus II; Abbott Diagnostics, Madrid, Spain).

#### *Relative mRNA expression by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)*

Total RNA was extracted from cells using TRIzol reagent (Sigma-Aldrich) according the manufacturer's protocol. Aliquots of 1 µg total RNA, 0.5 µg of oligo-(dT) (Sigma-Aldrich) as primers and 2 µl dNTPs (mix, 5 mM each; Sigma-Aldrich) were dissolved with sterile RNase-free water until 12 µl, heated at 65° for 5 min and cooled at 4°. Then, 4 µl of first-strand buffer 5× (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl, pH 8.3; Invitrogen), 2 µl of 100 mM dithiothreitol (Invitrogen) and 1 µl of RNase inhibitor (RNasa OUT; Invitrogen) were added and incubated at 42° for 2 min. The reaction was started adding 1 µl (200 units) of SuperScript II RT (Invitrogen), incubated at 42° for 50 min and finished at 70° for 15 min. The cDNAs were amplified using a commercially available kit (LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I; Roche). Each reaction was carried out with 2 µl of cDNA, 4 µl of 5× Master Mix (FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I), 0.5 µM of each primer and sterile RNase-free water at final volume of 20 µl. RT-PCR was carried out for 35 cycles using the LightCycler instrument (Roche). Specific primers were selected according to the GenBank database resource. Primers and PCR conditions were as follows: TNF-α: amplicon 266 base pairs (bp), forward: 5'-CTT CTC CTT CCT GAT CGT GC-3', reverse: 5'-GCT GGT TAT CTC TCA GCT CCA-3' 5 seconds at 95°, 5 s annealing at 60°, 11 seconds at 72°, and acquire for 4 seconds at 84°; β2-microglobulin: amplicon

107 bp, forward: 5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC-3', reverse: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3' 5 seconds at 95°, 10 s annealing at 58°, 4 seconds at 72°, and acquire for 4 seconds at 85°. β2-microglobulin mRNA levels were used as an endogenous control to normalize mRNA quantities. The relative mRNA levels of TNF-α were calculated as  $2^{-(Ct\ TNF-\alpha - Ct\ \beta 2\text{-microglobulin})}$ .

#### *Allostimulatory assays*

Allostimulatory conditions were set up following previous results.<sup>34</sup> Briefly, allogeneic  $5 \times 10^4$  CbT cells were stimulated *in vitro* with the indicated PDCs at a 10:1 ratio during 4 days. Previously, PDCs were washed three times with an excess of PBS + 0.1% BSA to exclude dead cells and debris and to minimize the direct effect of tacrolimus on CbT cells. Cell proliferation was assessed using the carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)-based (Molecular Probes Europe, Leiden, the Netherlands) flow cytometry assay. Briefly,  $5 \times 10^6$  isolated CbT cells were resuspended in 1 ml PBS + 0.1% BSA and incubated with an equal volume of 1.25 µM CFSE. After 10 min, unbound dye was quenched with an equal volume of RPMI-1640 + 10% FCS at 37°. Labelled cells were washed twice in RPMI-1640 + 10% FCS before placing in culture. Alloproliferative CbT cells were determined as the CFSE-low/negative population by FACS analyses (BD Biosciences). The number of cell divisions was estimated by gating the cells in areas based on the non-proliferating T cells area (as shown in Fig. 4b).

#### *Intracellular cytokines*

Day 4 alloproliferative CbT cells were washed and restimulated for 5 hr with phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA) (50 ng/ml) and ionomycin (500 ng/ml) in the presence of monensin (2.5 µg/ml). Then cells were washed, fixed and permeabilized using the IntraStain kit (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). Finally, cells were labelled with anti-IFN-γ allophycocyanin (APC) mAbs (Caltag Laboratories) or the corresponding isotype control.

#### *Statistical analysis*

Results are expressed as the mean ± standard deviation (SD). Comparison between groups was conducted using the Wilcoxon test for paired nonparametric data and the paired *t*-test for parametric data after confirming normal distribution by the Kolmogorov-Smirnov test, as indicated. Unpaired observations were analysed by Mann-Whitney test (nonparametric data) and unpaired *t*-test (parametric data), respectively. Analyses were performed using SigmaStat version 3.0 software (SPSS, Ekrath, Germany). A value of  $P < 0.05$  was considered significant.

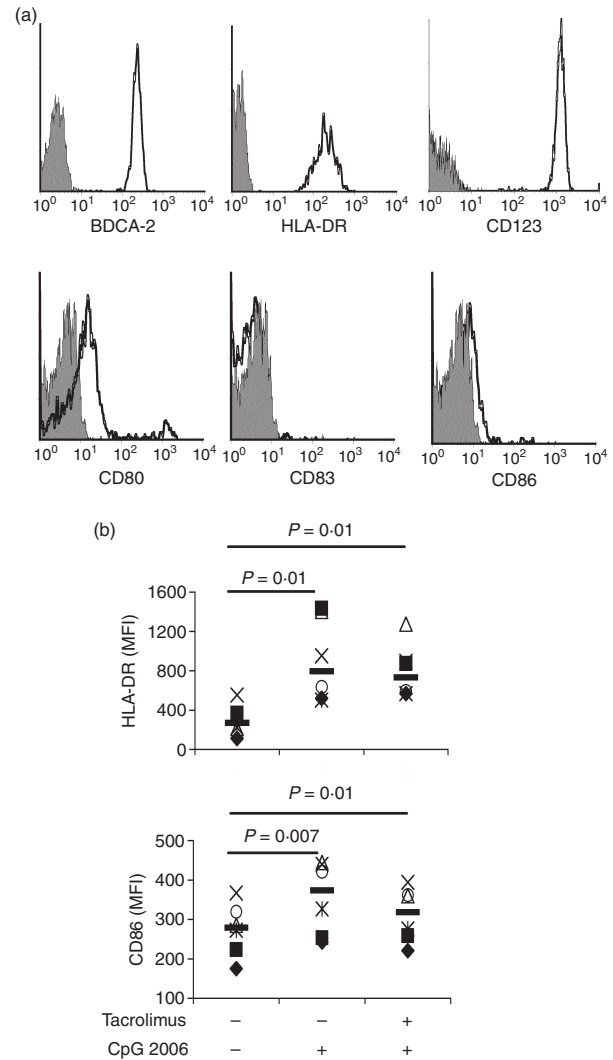
## Results

### Tacrolimus does not modify the viability and phenotype of unactivated cultured PDCs and does not block CpG activation of PDCs

Freshly isolated PDCs were defined as CD4<sup>+</sup> HLADR<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup> and confirmed by the expression of the PDC-specific marker BDCA-2. Immaturity of cells was demonstrated by the low expression of co-stimulatory molecules (CD80 and CD86) and the absence of CD83 (Fig. 1a). Cells were cultured in complete medium in the presence or absence of tacrolimus. After 48 hr, non-activated PDCs showed a similar phenotype (data not shown) and survival ( $46 \pm 12\%$  versus  $41 \pm 16\%$ ,  $n = 6$ , ns) in both conditions, indicating that tacrolimus did not affect the viability of the cells. As expected, the addition of CpG-ODN at the onset of the culture period increased the survival of PDCs and induced the activation of PDCs, as revealed by the up-regulation of HLA-DR and co-stimulatory molecules (Fig. 1b). Activation was not blocked by the presence of tacrolimus, although CD86 expression did not reach the levels of the CpG-activated controls. An unexpected observation was a reduced survival of PDCs in the presence of tacrolimus only upon CpG2216 activation ( $49 \pm 7\%$  versus  $26 \pm 1\%$ ,  $n = 3$ ,  $P = 0.006$ , paired *t*-test). In contrast, this reduction was less evident when CpG 2006 was used in the same conditions ( $62 \pm 10\%$  versus  $55 \pm 13\%$ ,  $n = 4$ , ns).

### Tacrolimus-pretreated PDCs (Tp-PDCs) show lower activation and secretion of inflammatory cytokines

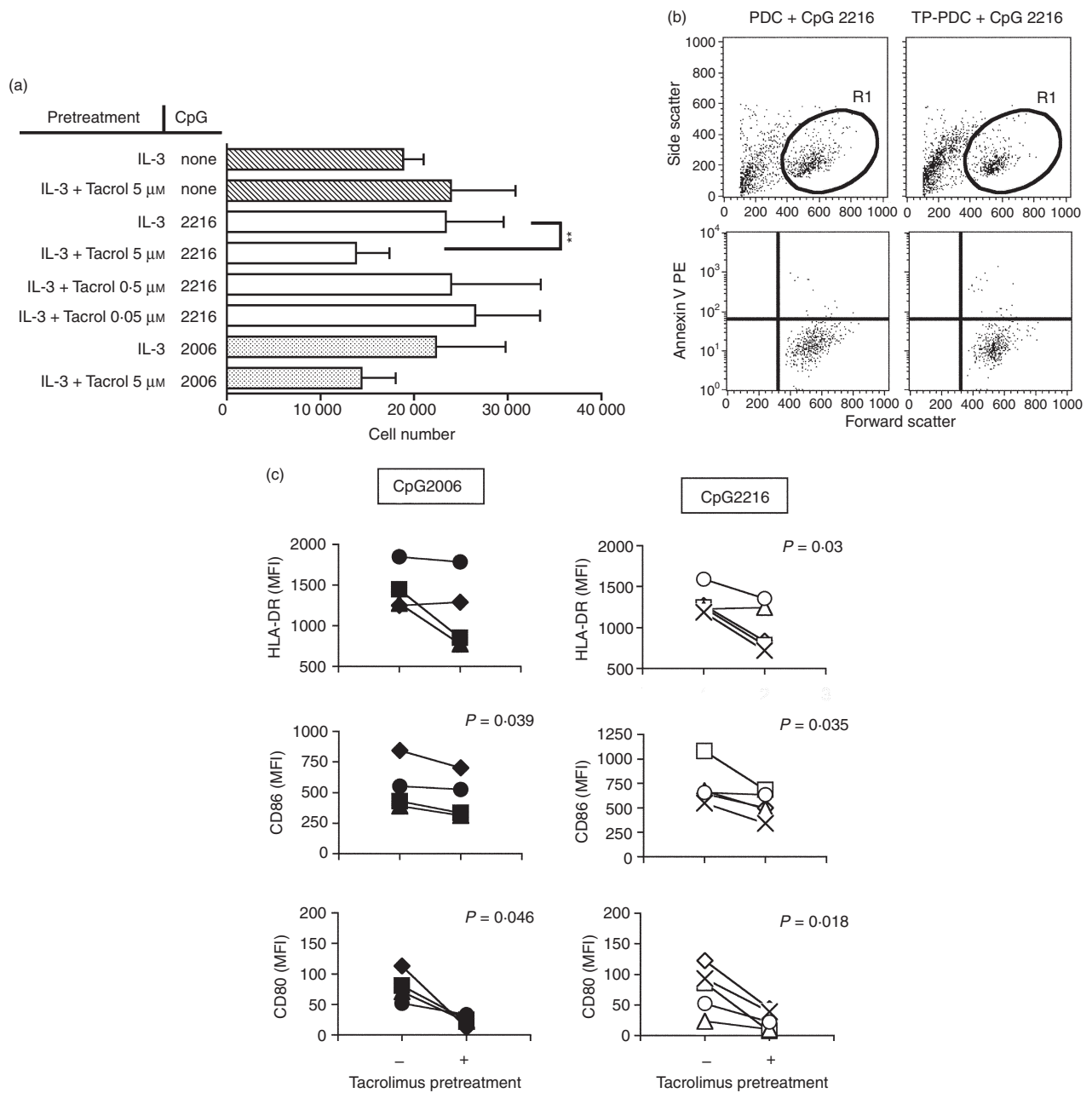
As tacrolimus pretreatment could affect PDCs survival upon activation, dose-viability experiments were performed. Isolated PDCs were cultured in the absence or presence of tacrolimus (tacrolimus-pretreatment, Tp). After 48 hr, CpG-ODNs were added to the cultures to induce activation of PDCs and the cells were incubated further for 48 hr (Tp-CpG PDCs). In these experiments, the recovered cells were counted using perfect count beads (Fig. 2a). A significant reduction of cell numbers was detected in CpG2216 activated Tp-PDCs at the higher dose of tacrolimus used ( $5 \mu\text{M}$ ) ( $23416 \pm 6149$  versus  $13805 \pm 3560$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.002$ , paired *t*-test). Also, a slightly reduced cell survival was detected in CpG2006 activated Tp-PDCs, although this was not found significant. At lower doses, the survival of activated Tp-PDCs was not different compared to activated controls, suggesting a direct implication of the drug in the activation-induced cell death. However, in the absence of CpG activation, the higher dose of tacrolimus used did not affect PDCs survival (Fig. 2a). Importantly, over 90% of PDCs contained in the living gate in all situations were annexin V negative, suggesting that they were not prone



**Figure 1.** Assessment of plasmacytoid dendritic cells (PDCs) phenotype upon isolation and after dinucleotide-oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) activation. (a) The phenotype of PDCs upon isolation. Isotype controls are shown in grey. (b) PDCs were cultured for 48 hr in the presence of interleukin (IL)-3, tacrolimus and CpG-ODN as indicated. After the incubation period, the expression of human leucocyte antigen D-related (HLA-DR) and CD86 was analysed by flow cytometry. Each symbol represents an independent sample. Significant differences are indicated in the figure ( $n \geq 5$ , paired *t*-test).

to cell death (Fig. 2b). These cells were used later as stimulators in alloresponse experiments.

In all experiments, the majority of cells were positive for the analysed markers upon activation. However, Tp-CpG PDCs showed reduced levels of HLA-DR, CD80 and CD86 compared to their fully activated controls (Fig. 2c). This effect was independent of the CpG-ODN used, and was marked specially on the expression of CD80. Finally, supernatants of the cultured Tp-CpG PDCs and controls were analysed to evaluate the presence



**Figure 2.** Tacrolimus pretreatment impairs plasmacytoid dendritic cells (PDC) survival and maturation upon dinucleotide (CpG) activation. PDCs were cultured during 48 hr in the presence of interleukin (IL)-3 and tacrolimus at the concentrations indicated. After this pretreatment, dinucleotide-oligodeoxynucleotide (CpG-ODNs) were added and cells further incubated during 48 hr. (a) The number of viable cells in each condition (mean  $\pm$  SD of at least four independent experiments) recovered at the end of this period as determined by perfect count. The cells contained in the R1 gate were mainly annexin V negative (a single representative experiment is shown in panel b). (c) The expression of the indicated markers was analysed after the activation period. Each symbol represents an individual sample. Black symbols represent cells activated by CpG-ODN 2006 and white symbols represent cells activated by CpG-ODN 2216. Significant differences are shown by the indicated *P*-value ( $n \geq 4$ , paired *t*-test).

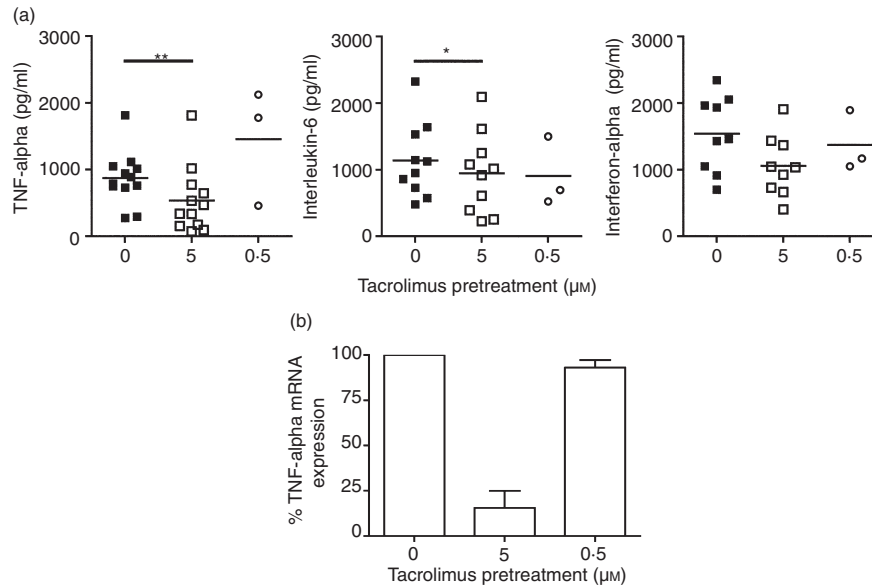
of proinflammatory cytokines. The results, summarized in Table 1, showed a consistent (14 of 16 experiments) and important reduction (up to 85%) in the secreted levels of TNF- $\alpha$  by Tp-PDCs stimulated by CpG. In CpG2216-stimulated cultures secretion of IL-6 was also reduced

(Fig. 3a). However, overall this reduction was quantitatively less important, and only four of 13 experiments showed values below 50% compared to controls. Finally, the presence of tacrolimus did not significantly affect the levels of secreted IFN- $\alpha$  (Fig. 3a).

**Table 1.** Cytokine secretion by tacrolimus-pretreated plasmacytoid dendritic cells (Tp-PDCs). The indicated cytokines (pg/ml) were determined in supernatants after culture. The number of independent experiments is indicated (*n*). Statistical differences are indicated by the *P*-value (paired *t*-test)

	Cytokine secretion (pg/ml)							
	CpG 2006				CpG2216			
	Control	Tacrolimus (5 $\mu$ M)	<i>P</i>	<i>n</i>	Control	Tacrolimus (5 $\mu$ M)	<i>P</i>	<i>n</i>
TNF- $\alpha$	126 $\pm$ 46	69 $\pm$ 47	0.02	4	871 $\pm$ 400	538 $\pm$ 496	0.002	12
IL-6	752 $\pm$ 504	716 $\pm$ 491	ns	3	1138 $\pm$ 562	947 $\pm$ 605	0.02	10
IFN- $\alpha$	212 $\pm$ 186	198 $\pm$ 249	ns	3	1540 $\pm$ 571	1059 $\pm$ 457	ns	9

CpG: dinucleotide; IFN: interferon; IL: interleukin; TNF: tumour necrosis factor.



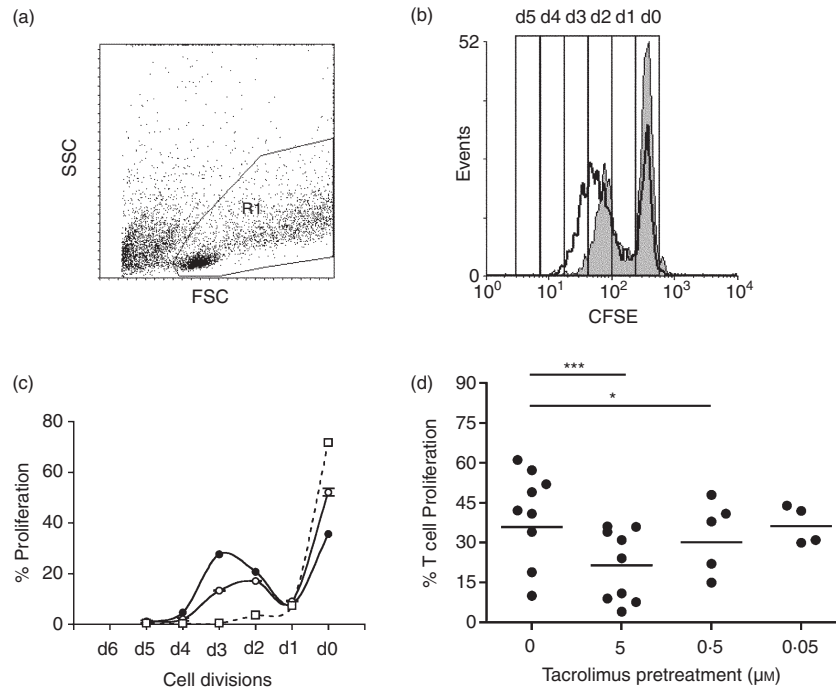
**Figure 3.** Tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$  secretion by activated plasmacytoid dendritic cells (PDCs) is impaired by tacrolimus pretreatment. (a) PDCs were incubated during 48 hr in the presence of interleukin (IL)-3 and tacrolimus at the dose indicated. After this pretreatment, dinucleotide-oligodeoxynucleotide (CpG-ODNs) were added. After the additional 48 hr of incubation, supernatants were recovered. Indicated cytokines were determined either by enzyme-linked immunosorbent assay or cytometric bead array (CBA). Each symbol represents an individual sample. Significant differences are indicated ( $*P < 0.05$ , paired *t*-test). (b) Cells were pretreated with the indicated dose of tacrolimus for 12 hr. Then CpG-ODN were added and cells incubated further during 6–8 hr before mRNA was extracted. The expression of TNF- $\alpha$  mRNA is shown as the relative proportion (TNF- $\alpha$ / $\beta$ 2 m) normalized to the maximum level of stimulation (CpG-activated non-pretreated PDCs). The mean  $\pm$  SD of two independent experiments is shown.

As the impaired survival observed in 5  $\mu$ M Tp-PDCs could account for the reduced secretion of some cytokines, i.e. TNF- $\alpha$ , and to investigate further the involvement of tacrolimus in the reduced cytokine secretion, PDCs were pretreated with two different doses of the drug for 12 hr. Then CpG2216 was added to cultures and both mRNA and protein levels were analysed in short-term cultures (up to 8 hr upon activation). Under these experimental conditions, in which cell viability was not affected, 5  $\mu$ M Tp-PDCs showed an important reduction in the TNF- $\alpha$  mRNA levels. When used at lower doses, this reduction was no longer detected (Fig. 3b). Accordingly, protein levels were also reduced in these conditions (about 60%, data

not shown), indicating that tacrolimus was indeed affecting TNF secretion by PDCs at the transcriptional level.

### Tp-PDCs are poor inducers of allostimulation

We next studied whether the defect on maturation observed in Tp-PDCs was affecting their allogeneic stimulatory capacity. As before, Tp-PDCs were activated with CpG2216 for 48 hr. Cells were then recovered and washed extensively. PDCs included in the living gate were counted and added to fresh U-bottomed wells in which CFSE-labelled naive CbT cells had been dispensed. As shown before, cells included in the living gate were not prone to



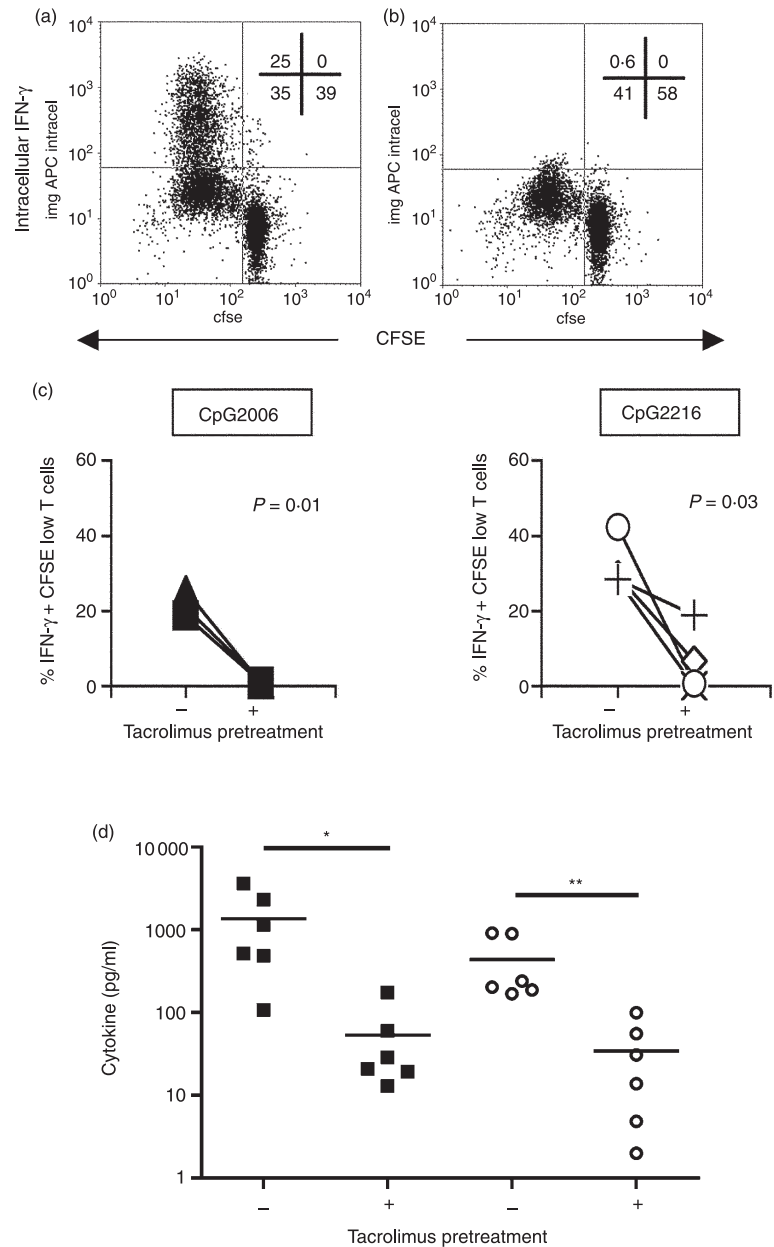
**Figure 4.** Allostimulatory capacity of dinucleotide (CpG)-activated tacrolimus-pretreated plasmacytoid dendritic cells (Tp-PDCs). PDCs were incubated during 48 hr in the presence of interleukin (IL)-3 alone or IL-3 plus tacrolimus. After this pretreatment period, dinucleotide-oligodeoxynucleotide (CpG-ODNs) were added to induce cell activation. After 48 hr, cells were recovered, washed and counted before allostimulatory experiments were set up, using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)-labelled cord blood T cell (CbT) lymphocytes as responders. After 4 days, cells contained in the living gate (R1 in panel a) were analysed for CFSE labelling. (b) The loss of CFSE in proliferating T cells (gated in R1) in a single representative experiment. The thick line represents the proliferation of T cells responding to activated PDCs (control), whereas the grey area represents the proliferation of T cells responding to Tp-activated PDCs. (c) Number of cell divisions was estimated based on the area of CFSE-labelled non-proliferating cells. The dotted line shows the non-stimulated control. Circles (black CpG2006 stimulated-PDCs, white CpG2006 stimulated Tp-PDCs) show the number of cell divisions and the proportion of proliferating T cells. Each symbol represents the mean of at least three independent determinations. A representative experiment of nine is shown. (d) Summary of results of the alloproliferation experiments induced by CpG2216 activated PDCs pretreated or not with tacrolimus at the concentrations indicated. Proliferation is represented as the percentage of CFSE-low T cells. Each symbol represents an individual experiment (mean of at least two replicates). Significant differences are indicated (\* $P < 0.05$ , paired  $t$ -test).

cell death (Fig. 2b). After 96 hr, cells contained in the living gate (R1) were analysed and the proportion of proliferating T cells was significantly lower in allogeneic cultures induced by activated Tp-PDCs than in activated control PDCs ( $39 \pm 18\%$  versus  $20 \pm 14\%$ ,  $n = 8$ ,  $P = 0.0003$ , paired  $t$ -test) (Fig. 4). Similar results were obtained with CpG2006 (data not shown). PDCs pretreated with a lower dose of tacrolimus ( $0.5 \mu\text{M}$ ) still showed a reduced capacity to induce allogeneic T cell proliferation compared to untreated controls ( $28 \pm 5\%$ ,  $n = 4$ ,  $P = 0.02$ , paired  $t$ -test). In these experiments, the higher proportion of proliferating T cells in control cultures had suffered three divisions, whereas Tp-PDCs-stimulated T cells reached only two divisions in the same period (Fig. 4). Additionally, the presence of tacrolimus in 24-hr and 48-hr mixed lymphocyte culture (MLC) supernatants was determined. Although all measured values were below the negative control (data not shown), technical limita-

tions (lower detection limit was  $1.8 \text{ nM}$ ) do not permit to completely rule out the possibility of a carryover effect.

### T cells responding to Tp-PDCs show impaired cytokine production

To gain some knowledge of the cytokines secreted by these responding cells, CFSE-low alloproliferative T lymphocytes were re-stimulated with PMA + ionomycin and the production of IFN- $\gamma$  was measured by intracellular staining. The capacity of responder T cells to produce IFN- $\gamma$  was almost completely abrogated in cultures where activated Tp-PDCs were used as stimulators compared to controls (Fig. 5). As before, the effect was equally observed when both CpG 2216 or 2006 were used to activate PDCs. Also, CBA analyses of allogeneic culture supernatants stimulated with CpG2216 confirmed these results (Fig. 5d). In general, pretreatment of PDC with



**Figure 5.** The production and secretion of cytokines by T lymphocytes stimulated with tacrolimus-pretreated plasmacytoid dendritic cells (PDCs) is altered. Proliferating T lymphocytes were obtained from allostimulatory experiments. The production of interferon (IFN)- $\gamma$  was measured by intracellular staining upon restimulation of the cells in the presence of monensin. Cells were gated as in Figure 4(a). (a, b) The IFN- $\gamma$  production of T cells responding to control CpG2216-activated PDCs (a) or 5  $\mu$ M Tp-pretreated PDCs (b) in a representative experiment. The numbers inside each plot indicate the percentage of cells in each quadrant. (c) Summary of the results of the intracellular IFN- $\gamma$  production in both CpG2006 ( $n = 3$ ) and 2216 ( $n = 4$ ) activated cultures, respectively. Each symbol represents an individual sample. Significant differences are shown by the indicated  $P$ -value (paired  $t$ -test). (d) IFN- $\gamma$  (black squares) and interleukin (IL)-2 (white circles) were measured by cytometric bead array (CBA) in supernatants of T cell alloproliferation experiments in which CpG2216-activated PDCs or 5  $\mu$ M Tp-PDCs were used. Each symbol represents an individual experiment. The line shows the mean of all experiments. Statistical differences are indicated ( $*P < 0.05$ , paired  $t$ -test).

tacrolimus reduced the production of IFN- $\gamma$  and IL-2 to less than 10% by allogeneic T cells.

## Discussion

The results of this study provide evidence that tacrolimus affects the adaptative immune response induced by activated PDCs. PDCs have been broadly shown to induce T cell responses only upon activation. In particular, some CpG-ODNs are well known to promote TNF- $\alpha$  secretion by PDCs and to induce IFN- $\gamma$  production by allogeneic T cells.<sup>21,35</sup> When tacrolimus and the activating factor (CpG) were added simultaneously, PDCs acquired an activated phenotype similar to

controls. However, when PDCs were pretreated with tacrolimus, CpG-activated Tp-PDCs showed a reduced level of co-stimulatory molecules upon activation, an effect already described in PDCs treated with cyclosporin A.<sup>9</sup> These observations could indicate that in the presence of calcineurin inhibitors PDCs may reach a state of 'partial' maturation only upon activation. Also, a reduced capacity to secrete IFN- $\alpha$  was reported.<sup>9</sup> Our results showed only a slightly reduced capacity of Tp-CpG PDCs to secrete IFN- $\alpha$  upon activation. This minor difference may be due to the timing at which interferon was measured (24 hr in the cyclosporine study versus 48 hr in our experiments). Although it has been described that the maximum level of IFN- $\alpha$  production by activated



PDCs may be around 24 hr,<sup>20,21</sup> it is possible that incubation with the immunosuppressive agent may delay the production and secretion of the cytokine, which may accumulate and be detected at 48 hr. Also, tacrolimus pretreatment could modulate TLR9 levels on PDCs. In this sense, no differences were found in intracellular staining experiments using monoclonal antibodies to TLR-9 between tacrolimus-treated PDCs and controls (data not shown). This observation is in tune with those reported for other immunosuppressive agents, such as dexamethasone.<sup>33</sup>

Secretion of TNF- $\alpha$  and IL-6, both negatively regulated by calcineurin inhibitors in myeloid DCs,<sup>15,16</sup> was also studied. TNF- $\alpha$  secretion showed a consistent and significant reduction in Tp-CpG PDCs. The secretion of IL-6 was also reduced significantly, although to a much lesser extent. Tacrolimus, as other calcineurin inhibitors, blocks the binding of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B to their regulatory domains.<sup>8</sup> The promoter regions of TNF- $\alpha$  and IL-6<sup>36,37</sup> contain NF- $\kappa$ B regulatory domains. Interestingly, the NF- $\kappa$ B domain in the IL-6 promoter functions as a potent IL-1/TNF- $\alpha$ -responsive element in myeloid cells.<sup>38</sup> In addition, NF- $\kappa$ B activation is crucial for TNF production.<sup>39</sup> Recently, in NF- $\kappa$ B<sup>(-/-)</sup> mice, it has been shown that murine pDCs produced type I interferon but not IL-6.<sup>40</sup> In our system, IL-6 secretion by PDCs was impaired importantly only when TNF- $\alpha$  levels were reduced drastically (> 80% reduction). These results further suggest TNF- $\alpha$  as one of the potential regulators of IL-6 secretion by PDCs. Also, a cross-regulation between TNF- $\alpha$  and IFN- $\alpha$  has been suggested in autoimmune diseases.<sup>41</sup> It is considered that TNF- $\alpha$  may block IFN- $\alpha$  secretion, a capacity owned by immature PDCs, by inducing PDC maturation. Consequently, TNF blockade is thought to impair PDC maturation, thus indirectly promoting IFN- $\alpha$  secretion. Our results show that tacrolimus treatment impaired TNF- $\alpha$  secretion by PDCs and affected PDC maturation, but did not increase IFN- $\alpha$  secretion upon activation. This is due most probably to the multiple factors affected by tacrolimus on PDCs that can modulate IFN- $\alpha$  secretion, rendering basal or even lower levels of type I IFN upon stimulation.

Of note, tacrolimus-pretreated PDCs showed a dose-dependent impaired survival exclusively upon activation. Glucocorticoids<sup>33</sup> but not cyclosporin A<sup>9</sup> have been shown to induce apoptosis in PDCs. As NF- $\kappa$ B translocation is related to PDC survival,<sup>40</sup> it is possible that blockade of this factor may be involved in the induction of apoptosis on PDCs upon activation.

With regard to allogeneic T cell responses, both proliferation and cytokine secretion were clearly impaired when Tp-CpG PDCs were used as stimulators. A putative carryover effect of tacrolimus, suggested in MDCC cultures,<sup>15</sup> could also be affecting these MLCs. In our titration experiments 1 nM tacrolimus affected only 1% of PMA + ionomycin-induced T cell proliferation (data not

shown). However, it has been reported that murine T cell proliferation and IFN- $\gamma$  secretion were reduced by approximately 50% using 1 nM tacrolimus.<sup>12</sup> Using a commercial immunoassay we could not detect tacrolimus in supernatants from 24-hr and 48-hr MLCs, although due to technical limitations we cannot completely exclude that minute amounts of tacrolimus would still be present in those cultures and may affect, at least partially, the outcome of the alloresponse. However, other factors, such as the lower expression of HLA-DR and co-stimulatory molecules on Tp-activated PDCs and the reduced secretion of cytokines such as TNF- $\alpha$ , may also account for the functional impairment exhibited by these cells. Also, in the context of an immune response, the reduced secretion of proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  may have an autocrine activity to direct the PDCs final differentiation and also affect the function of other cells, such as monocytes, neutrophils or endothelial cells.

In conclusion, tacrolimus pretreatment importantly affected the secretion of TNF- $\alpha$  by PDCs upon activation. TNF blockade using monoclonal antibodies is an alternative approach to control autoimmune disorders, but it may induce the secretion of IFN- $\alpha$  by PBMCs, and particularly PDCs.<sup>41</sup> In fact, 0-2% of rheumatoid arthritis patients on TNF-blockade treatment have developed symptoms of SLE, including increased anti-dsDNA antibodies.<sup>42</sup> Regulation of IFN- $\alpha$  secretion may be crucial in some autoimmune disorders such as SLE, where increased levels of IFN- $\alpha$  are found routinely. Use of tacrolimus, providing reduced levels of TNF- $\alpha$  and a moderate decrease in IFN- $\alpha$  secretion, may be an alternative choice in these situations. Studies on samples from patients under continuous immunosuppressive therapy would further clarify the role of IAs in PDCs function.

## Acknowledgements

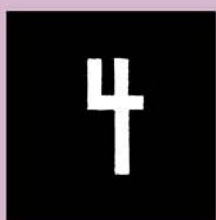
The authors would like to thank Dr Carlos Margarit (Unitat de Cirurgia Hepato-Bilio-Pancreàtica i Trasplantament Hepàtic, Hospital Universitari Vall d'Hebron) for kindly providing tacrolimus; also Dr Alejandro Olivé (Rheumatology Unit, Hospital U. Germans Trias i Pujol) for critically revising the manuscript, and Ms Laura Ocaña (Centre de Teixits i Teràpia Cellular, BST) for helpful discussions. We also thank Drs Cruz Pastor and Susana Montes (Hospital U. Germans Trias i Pujol) for tacrolimus determinations. This work was supported partially by grants from the 'Fondo de Investigaciones Sanitarias' FIS 01/3120 and FIS 03/0142 to F.E.B. and 'Red Temática de Investigación en SIDA (Red de grupos 173)' to M.B. M.N.G is supported by grant FIS 03/0142. F.E.B. is supported by contract FIS 01/3120 from the BST in collaboration with the Spanish Health Department.

## References

- 1 Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States 1988–96. *N Engl J Med* 2000; **342**:605–12.
- 2 Fung JJ. Tacrolimus and transplantation: a decade in review. *Transplantation* 2004; **77** (9 Suppl.):S41–3.
- 3 Tugwell P, Bombardier C, Gent M *et al.* Low-dose cyclosporin versus placebo in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet* 1990; **335**:1051–5.
- 4 Cheer SM, Plosker GL. Tacrolimus ointment. A review of its therapeutic potential as a topical therapy in atopic dermatitis. *Am J Clin Dermatol* 2001; **2**:389–406.
- 5 Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin–cyclosporin A and FKBP–FK506 complexes. *Cell* 1991; **66**:807–15.
- 6 Jirapongsananuruk O, Leung DY. The modulation of B7.2 and B7.1 on B cells by immunosuppressive agents. *Clin Exp Immunol* 1999; **118**:1–8.
- 7 Wasowska BA, Zheng XX, Strom TB, Kupieck-Weglinski JW. Adjunctive rapamycin and CsA treatment inhibits monocyte/macrophage associated cytokines/chemokines in sensitized cardiac graft recipients. *Transplantation* 2001; **71**:1179–83.
- 8 Lee JI, Ganster RW, Geller DA, Burckart GJ, Thomson AW, Lu L. Cyclosporine A inhibits the expression of costimulatory molecules on in vitro-generated dendritic cells: association with reduced nuclear translocation of nuclear factor kappa B. *Transplantation* 1999; **68**:1255–63.
- 9 Tajima K, Amakawa R, Ito T, Miyaji M, Takebayashi M, Fukuhara S. Immunomodulatory effects of cyclosporin A on human peripheral blood dendritic cell subsets. *Immunology* 2003; **108**:321–8.
- 10 Vieira PL, Kaliński P, Wierenga EA, Kapsenberg ML, de Jong EC. Glucocorticoids inhibit bioactive IL-12p70 production by in vitro-generated human dendritic cells without affecting their T cell stimulatory potential. *J Immunol* 1998; **161**:5245–51.
- 11 Cos J, Villalba T, Parra R *et al.* FK506 in the maturation of dendritic cells. *Haematologica* 2002; **87**:679–87; discussion 687.
- 12 Matsue H, Yang C, Matsue K, Edelbaum D, Mummert M, Takashima A. Contrasting impacts of immunosuppressive agents (rapamycin, FK506, cyclosporin A, and dexamethasone) on bidirectional dendritic cell–T cell interaction during antigen presentation. *J Immunol* 2002; **169**:3555–64.
- 13 Lee YR, Yang IH, Lee YH, Im SA, Song S *et al.* Cyclosporin A and tacrolimus, but not rapamycin, inhibit MHC-restricted antigen presentation pathways in dendritic cells. *Blood* 2005; **105**:3951–5.
- 14 Shimizu K, Fujii S, Fujimoto K, Kawa K, Yamada A, Kawano F. Tacrolimus (FK506) treatment of CD34+ hematopoietic progenitor cells promote the development of dendritic cells that drive CD4+ T cells toward Th2 responses. *J Leukoc Biol* 2000; **68**:633–40.
- 15 Woltman AM, de Fijter JW, Kamerling SW, Paul LC, Daha MR, van Kooten C. The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur J Immunol* 2000; **3**:1807–12.
- 16 Szabo G, Gavala C, Mandrekar P. Tacrolimus and cyclosporine A inhibit allostimulatory capacity and cytokine production of human myeloid dendritic cells. *J Invest Med* 2001; **49**:442–9.
- 17 Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, Gutiérrez B, Culebras JM, González-Gallego J. Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 2003; **66**:439–45.
- 18 Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CD. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; **29**:2769–78.
- 19 O'Doherty U, Peng M, Gezelter S *et al.* Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994; **82**:487–93.
- 20 Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M *et al.* The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; **284**:1835–7.
- 21 Krug A, Rothenfusser S, Hornung V *et al.* Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; **3**:2154–63.
- 22 Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997; **185**:1101–11.
- 23 Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004; **5**:1219–26.
- 24 Cella M, Jarrossay D, Facchetti F *et al.* Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999; **5**:919–23.
- 25 Jongbloed SL, Lebre MC, Fraser AR *et al.* Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther* 2006; **8**:R15.
- 26 Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, Jahnsen FL. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon-alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol* 2001; **159**:237–43.
- 27 Lövgren T, Eloranta ML, Båve U, Alm GV, Rönnblom L. Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG. *Arthritis Rheum* 2004; **50**:1861–72.
- 28 Båve U, Nordmark G, Lövgren T *et al.* Activation of the type I interferon system in primary Sjögren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism. *Arthritis Rheum* 2005; **52**:1185–95.
- 29 Vallin H, Perers A, Alm GV, Rönnblom L. Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1999; **163**:6306–13.
- 30 Vallin H, Blomberg S, Alm GV, Cederblad B, Rönnblom L. Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have a circulating inducer of interferon-alpha (IFN-alpha) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 1999; **115**:196–202.
- 31 Qing X, Putterman C. Gene expression profiling in the study of the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2004; **3**:505–9.
- 32 Shodell M, Shah K, Siegal FP. Circulating human plasmacytoid dendritic cells are highly sensitive to corticosteroid administration. *Lupus* 2003; **12**:222–30.

- 33 Abe M, Thomson AW. Dexamethasone preferentially suppresses plasmacytoid dendritic cell differentiation and enhances their apoptotic death. *Clin Immunol* 2005; **118**:300–6.
- 34 Naranjo-Gómez M, Fernández MA, Bofill M *et al.* Primary alloproliferative TH1 response induced by immature plasmacytoid dendritic cells in collaboration with myeloid DCs. *Am J Transplant* 2005; **5**:2838–48.
- 35 Krug A, Veeraswamy R, Pekosz A *et al.* Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *J Exp Med* 2003; **197**:899–906.
- 36 Drouet C, Shakhov AN, Jongeneel CV. Enhancers and transcription factors controlling the inducibility of the tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter in primary macrophages. *J Immunol* 1991; **147**:1694–700.
- 37 Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF- $\kappa$ B transcription factor. *Mol Cell Biol* 1990; **10**:2327–34.
- 38 Nakayama K, Shimizu H, Mitomo K, Watanabe T, Okamoto S, Yamamoto K. A lymphoid cell-specific nuclear factor containing c-Rel-like proteins preferentially interacts with interleukin-6  $\kappa$ B-related motifs whose activities are repressed in lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 1992; **12**:1736–46.
- 39 Foxwell B, Browne K, Bondeson J *et al.* Efficient adenoviral infection with  $\kappa$ B $\alpha$  reveals that macrophage tumor necrosis factor  $\alpha$  production in rheumatoid arthritis is NF- $\kappa$ B dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 8211–15.
- 40 O’Keeffe M, Grumont RJ, Hochrein H *et al.* Distinct roles for the NF- $\kappa$ B1 and c-Rel transcription factors in the differentiation and survival of plasmacytoid and conventional dendritic cells activated by TLR-9 signals. *Blood* 2005; **106**:3457–64.
- 41 Palucka AK, Blanck JP, Bennett L, Pascual V, Banchereau J. Cross-regulation of TNF and IFN- $\alpha$  in autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**:3372–7.
- 42 Aringer M, Graninger WB, Steiner G, Smolen JS. Safety and efficacy of tumor necrosis factor  $\alpha$  blockade in systemic lupus erythematosus: an open-label study. *Arthritis Rheum* 2004; **50**:3161–9.





# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

**L**as DCs son las células presentadoras de antígeno más potentes y eficientes del sistema inmune. Dado su relevante papel en la homeostasis del organismo, las DCs han sido profundamente estudiadas en los últimos 15 años. Gran parte de los trabajos realizados en células de origen humano han abordado el estudio de las DCs en base al modelo de células dendríticas derivadas de monocito (MDDC). El uso preferente de este modelo responde, probablemente, a la dificultad de obtener células dendríticas o sus precursores presentes en sangre periférica debido a su escasez. Sin embargo, el modelo MDDC es muy interesante por dos razones claves: 1) se ha demostrado *in vivo* que algunos estímulos influyen la diferenciación de monocitos a DCs, por lo que se trata de un modelo "fisiológico"; 2) hoy por hoy, cualquier terapia celular que utilice DC (exceptuando el "*targeting*" *in vivo* aún en desarrollo) debe basarse en el modelo MDDC por cuestiones meramente numéricas. Este necesario "sesgo" en el tipo de estudios realizados ha sido causa, al menos en parte, de algunos vacíos de conocimiento que aún restan por definir y que afectan a los diferentes subtipos de DCs. Por ejemplo, a pesar de los estudios realizados en la biología molecular y celular de estas células, apenas existían trabajos (anteriores al 2005) que describiesen la posible interacción de ambos subtipos de DCs presentes en sangre periférica (cDCs y pDCs) en la respuesta inmune [34, 83, 351]. Determinar cómo interactúan ambos subtipos de DCs y cómo esta interacción puede influenciar la respuesta T inducida han sido uno de los objetivos principales de esta tesis, y los datos obtenidos muestran un efecto cooperativo entre ambas subpoblaciones en la modulación de esta respuesta.

Diversos autores habían descrito que las pDCs aisladas muestran una pobre capacidad aloestimuladora, mientras que las cDCs inducen una potente proliferación en linfocitos T naive. En esta observación, entre otras, se basaba la hipótesis (hoy descartada) de que las subpoblaciones de DCs podrían desempeñar un papel diferencial en la inducción de tolerancia e inmunidad. La diferente capacidad aloestimuladora observada entre los dos subtipos de DCs inmaduras podría explicarse

por múltiples factores. Uno de ellos podría ser la mayor expresión de moléculas de MHC II (HLA-DR) y coestimuladoras (CD86 y CD40) que muestran las cDCs. Por otra parte, la labilidad de las pDCs en cultivos *in vitro* podría también explicar, parcialmente, su pobre capacidad aloestimuladora. En los primeros ensayos realizados, nuestros resultados mostraron como la adición de sólo 100 cDCs a la pDCs (pDCs+100cDC) incrementaba su capacidad aloestimuladora, lo que parecía sugerir algún tipo de aspecto cooperativo entre ambos subtipos celulares. Además, también observamos cómo la presencia de ambas subpoblaciones favorecía la inducción de una potente respuesta de tipo Th1. Este efecto sinérgico -observado en respuesta alogénica- podría ser también de importancia en la generación de potentes respuestas frente a un antígeno nominal en condiciones fisiológicas (infecciones), patológicas (autoinmunidad) y terapéuticas (transplante, terapia celular).

Entre los trabajos pioneros que describieron la posible acción coordinada de las dos subpoblaciones de DCs en el contexto de la respuesta inmune cabe destacar los estudios de Krug y col. (2003), que sugirieron por primera vez que la cooperación de ambos subtipos podría ser importante para la regulación de la respuesta inmune. En experimentos llevados a cabo en ratones, se demostró cómo las pDCs podían inducir la proliferación y diferenciación Th1 de linfocitos T antígeno-específicos no polarizados. En estos trabajos se ponía de manifiesto que la inducción de la expresión de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T dependía en gran medida de las pDCs. De forma similar, en nuestros experimentos comprobamos cómo la producción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T naive alo-reactivos se incrementaba de manera importante cuando la activación se llevaba a cabo en presencia de pDCs. Además, pudimos también comprobar cómo la maduración de las cDCs era suficiente para condicionar a las pDCs y dotarlas de una capacidad aloestimuladora que sólo exhiben cuando eran directamente activadas por estímulos potentes como son CpG (vía TLR9) o bien por CD40L.



En nuestro modelo detectamos múltiples evidencias indicativas de la inducción de una respuesta Th1. Entre ellas señalar la expresión de varios marcadores [352, 353], incluyendo IL12R $\beta$ 2 cuya expresión en la superficie de los linfocitos T se detectó de forma transitoria coincidiendo con el patrón descrito por otros autores [5], además de la expresión del mRNA para IL-2 y la síntesis de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T respondedores [354]. A pesar de mostrar un perfil Th1 en ambas condiciones de aloestimulación, se evidenció un retraso temporal en la expresión de IL12R $\beta$ 2 y de IL-2 por parte de los linfocitos T aloestimulados con pDCs+cDC. Sin embargo, la combinación de ambos subtipos de DCs promueve una respuesta Th1 más eficiente existiendo una mayor proporción de células productoras de IFN- $\gamma$ . Esta diferencia en la producción de IFN- $\gamma$  podría explicarse, en parte, a través de un mecanismo regulador por parte de la IL-10. Esta citocina está considerada como factor inmunosupresor de la respuesta Th1 [205]. Nuestros resultados muestran (aunque no de forma cuantitativa) una mayor expresión de IL-10 por parte de los linfocitos T estimulados con cDCs aisladas, hecho que podría estar condicionando la producción de IFN- $\gamma$  mediante un mecanismo de feedback negativo. La producción de IL-10 permitiría el retorno a un estado de no inflamación (*steady state*) gracias a la disminución de citocinas proinflamatorias y/o a la inhibición de la maduración de DCs [355, 356] lo cual impediría que las APCs fueran potentes estimuladoras de linfocitos T [77].

#### Factores implicados en la activación de las pDCs

Por qué las pDCs muestran un comportamiento proinflamatorio en el contexto estudiado? El conjunto de resultados subrayan la importancia de ambos subtipos de DCs en la modulación de la respuesta inmune. Estos resultados parecen indicar que la mayor supervivencia y la inducción del estado madurativo que muestran las pDCs en nuestras condiciones de cultivo mixto linfocitario podrían ser algunos de los múltiples factores que pudieran influir en la generación de este tipo de respuesta. En las pDCs,

hemos observado un incremento de MHC II (HLA-DR) y de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD40), características propias de un fenotipo maduro, lo que sin duda contribuye al incremento de su capacidad aloestimuladora. A parte de los estímulos recibidos por parte de una célula T activada, es muy posible que la propia interacción entre los dos subtipos de APCs contribuya a la generación de la respuesta.

La comunicación entre distintas células es un hecho crucial en todos los sistemas biológicos. Los modelos clásicos comprenden básicamente dos grandes sistemas de comunicación: por un lado, el contacto íntimo célula-célula y por otro lado, la acción de factores solubles (como las citocinas). En nuestros experimentos pudimos evidenciar que ambos sistemas pueden contribuir a la activación y supervivencia de las pDCs.

De entre los factores solubles, la IL-3 se ha descrito como factor clave en la supervivencia de las pDCs. En la literatura, se ha relacionado la elevada expresión en superficie de la subunidad  $\alpha$  del receptor para IL-3 (CD123) con el requerimiento de la IL-3 como factor de supervivencia en las pDCs [28]. No en vano, el cultivo *in vitro* de pDCs requiere la adición de IL-3 al medio, a un riesgo de inducir un cierto estado de activación, para evitar un proceso masivo (próximo al 90%) de muerte celular por apoptosis en 4-6 horas. Existen un gran número de trabajos que muestran como la IL-3 es secretada por numerosos tipos celulares, en especial los linfocitos T [357]. Nuestros resultados evidenciaron que la presencia de la IL-3 (muy probablemente secretada por los linfocitos T) en los cultivos de estimulación combinada (pDCs+100cDC) es fundamental para la viabilidad de las pDCs *in vitro*, a diferencia de los cultivos estimulados con cDCs como población única en los que esta citocina podría tener un papel secundario.

Por lo que a contacto intercelular se refiere, los experimentos de *transwell* demostraron que el contacto celular entre los tres subtipos celulares (pDCs, cDCs y

linfocitos T) era necesario para que las pDCs adquirieran una potente capacidad aloestimuladora. En este sentido, la expresión del CD40L en los linfocitos T aloestimulados (pDCs+100cDC) como también se demostró en nuestras condiciones de cultivo, juega un papel destacado.

La señalización a través de los miembros de la familia del TNF/TNFR ha sido una de las principales vías de estudio en la comunicación DC/linfocito T constituyendo una vía de coestimulación en las respuestas T [266]. Uno de los eventos clave para que tenga lugar una respuesta inmune efectiva es la señal obtenida por la interacción CD40/CD40L [243, 358]. Las interacciones entre linfocitos T y DCs proporcionan señales bidireccionales estimuladoras para ambos tipos celulares. Así pues, la interacción CD40/CD40L, entre otras, regula la activación de las DCs incrementando su actividad coestimuladora, la supervivencia celular así como también la producción de citocinas [74, 244], y en consecuencia, podría determinar la polarización de la respuesta T. Es importante destacar que no sólo la maduración de las DCs se ve afectada, sino que otros factores antiapoptóticos están regulados por la interacción CD40/CD40L gracias a la inducción del factor de transcripción NF- $\kappa$ B [248].

El CD40L pertenece a la superfamilia TNF y su expresión está finamente regulada. En condiciones fisiológicas, los linfocitos T activados son la población predominante que presenta en su superficie CD40L. Asimismo, la expresión también fue detectada en nuestra situación de estimulación alogénica combinada interviniendo en la interacción y promoviendo la activación de las pDCs, permitiendo su diferenciación y convirtiéndose en pDCs completamente maduras. Sin embargo, la expresión del CD40L no es exclusiva de linfocitos T CD4. En la literatura ya se han descrito otros tipos celulares que presentan CD40L en superficie (células endoteliales, macrófagos, eosinófilos y plaquetas activas). Incluso, se ha encontrado una expresión moderada de CD40L en las propias DCs [359] (DCs humanas de sangre periférica [360], células de Langerhans murinas, DCs murinas localizadas en el pulmón y en pDCs

[361]). Este marcaje moderado en la superficie de las DCs podría explicarse por diversas razones (rápida endocitosis tras su unión con CD40 y por su enmascaramiento por la presencia de CD40 soluble, por ejemplo) y es lo que ha dificultado su consideración como candidato de estudio.

Las interacciones CD40/CD40L se han asociado con la maduración de las DCs, aunque la mayoría de las investigaciones se han llevado a cabo desde el punto de vista en el que las DCs expresan CD40 en su superficie, mientras que la expresión de CD40L ha merecido menos atención. Muchos autores han asumido que el CD40L era un marcador típico de linfocitos T y ha sido obviado como posible marcador coestimulador de DCs. Sin embargo, la expresión de CD40L también es importante en DCs promoviendo una óptima estimulación de linfocitos T CD8 sin la presencia de los T CD4 [359]. Por tanto, la presencia de CD40L y CD40 en linfocitos T (CD4 y CD8) y en DCs podría explicar las múltiples posibilidades de amplificación de la respuesta inmune por las potenciales interacciones entre cada tipo celular.

En el capítulo de las interacciones intercelulares, otro grupo de moléculas a tener en cuenta son las moléculas de adhesión [362]. La presencia combinada de complejos p-MHC con moléculas de adhesión intercelulares y de coestimulación en los mismos microdominios son esenciales para la estimulación de linfocitos T naive antígeno-específicos [12, 139]. Los cambios en el patrón de expresión de moléculas de adhesión reportados en MDDCs revelan alteraciones transitorias y estables de un gran número de moléculas durante su proceso de maduración [363, 364]. Una de estas moléculas es el CD54 (ICAM-1), el cual incrementa su expresión tanto a nivel génico [365, 366] como proteico [30, 367] en DCs que han sufrido un proceso de maduración gracias a la presencia de distintos tipos de estímulos. Otro ejemplo destacado es el CD58, también conocido como LFA-3, y receptor para CD2 [218, 365, 366]. Otras moléculas de adhesión presentes en DCs convencionales maduras incluyen CD49d [368], CD44, CD61, CD100, CD147 [369]. Alguno de ellos (CD54; CD58; CD166 ligando para CD6) son receptores importantes para el contacto con linfocitos T; y

otros (CD54, CD58, CD162 [365]) destacan por su interacción con moléculas presentes en pDCs (LFA-1, LFA-2 (CD2) [66]; CD62L [79], respectivamente). Estos datos, entre otros, contribuyen a explicar al menos en parte por qué la maduración de las cDCs (vía CD40/CD40L) fue suficiente para condicionar a las pDCs y dotarlas de una capacidad aloestimuladora, estabilizando la interacción pDCs-linfocitos T. El tiempo de contacto y la organización molecular de la sinapsis inmunológica entre la célula presentadora y los linfocitos T es un parámetro clave, el cual conduce a la tolerancia inmune o a la generación de respuestas T efectoras [370]. De nuevo, las moléculas de adhesión presentes en la superficie de las DCs serían esenciales en las fases iniciales de la formación de la sinapsis [371, 372]. Se ha descrito que las pDCs inmaduras muestran una menor capacidad para formar conjugados estables con linfocitos T, ya que tan sólo median interacciones transitorias [373]. Esto podría explicarse, en parte, por la menor expresión de moléculas de adhesión, integrinas y tetraspaninas en pDCs inmaduras. Sin embargo, con la ayuda de las cDCs, las pDCs promoverían contactos estables prolongados que facilitarían la activación eficiente de los linfocitos T.

Así pues, evidenciamos que la IL-3 y el CD40L eran factores clave en la activación de las pDC. Sin embargo, se ha descrito que la IL-3 y la señalización vía CD40L condicionan a las pDCs a inducir respuestas del tipo Th2 [100]. En este aspecto, los resultados obtenidos en nuestros experimentos parecen contradictorios, ya que revelan que los linfocitos T estimulados en cultivos mixtos linfocitarios con la combinación pDCs+100cDCs muestran un perfil de respuesta T que no se corresponde con el tipo Th2, sino más bien con un tipo Th1. En la literatura, ya se han descrito trabajos en los que se apunta la capacidad por parte de las pDCs de inducir una respuesta del tipo Th1 [111, 374]. Además, recientemente se ha demostrado, mediante un modelo indirecto de presentación alogénica, que las pDCs inducen una gran producción de IFN- $\gamma$  en los linfocitos T estimulados [375].

Hoy por hoy no podemos señalar cuál o cuáles son los mecanismos responsables de la generación de la respuesta Th1. Sin embargo, existen distintos factores que merecen especial atención. Así, analizamos el papel que el IFN- $\alpha$  –una

de las principales citocinas secretadas por las pDCs- podría estar desempeñando en la determinación de la respuesta. Los IFNs de tipo I ( $\text{IFN}\alpha/\beta$ ), podrían contribuir a el tipo de respuesta T inducida; no sólo por su posible capacidad de inducir respuestas Th1, sino también por su papel autocrino en la supervivencia y maduración de las pDCs. Sin embargo, la combinación de pDCs+cDCs+T favorece la maduración y supervivencia de las pDCs *in vitro*, pero no induce la producción de interferon alfa. Por otra parte, aunque se ha descrito que los IFNs tipo I incrementan el receptor de alta afinidad para la IL12 ( $\text{IL12R}\beta1+\text{IL12R}\beta2$ ) en células Th productoras de  $\text{IFN-}\gamma$  [376] existe cierta controversia sobre el papel del  $\text{IFN}\alpha$  en la estimulación de la respuesta con un perfil Th1 [89].

Otras citocinas, derivadas de las cDCs como son la IL-18 [187, 188], también podrían apoyar el resultado observado en la inducción de una respuesta Th1 inducida por pDCs activadas a través de CD40L. La IL-18 originalmente se identificó como un potente factor inductor en la producción de  $\text{IFN-}\gamma$  por parte de los linfocitos T. Además, las pDCs expresan el receptor para dicha citocina [190]. De este modo, se podría sugerir un papel directo de la IL-18 sobre las pDCs en la inducción de la respuesta Th1. Sin embargo, los resultados obtenidos en experimentos de bloqueo de la IL-18 por su receptor, demostraron que no existe alteración en los niveles de proliferación sobre los linfocitos T (resultados no mostrados). Dichos resultados fueron confirmados en la literatura por experimentos realizados en modelos murinos [374], aunque existe aún cierto grado de controversia al respecto [190]. Así pues, parece que la citocina IL-18 no interviene directamente en la capacidad aloestimuladora de las pDCs en nuestro contexto de estimulación combinada.

En este sentido, es importante valorar si podrían contribuir al tipo de respuesta inducida citocinas secretadas por las cDCs estimuladas a través de la vía CD40/CD40L. En el contexto de una respuesta inmune, la estimulación vía CD40L tendría lugar en los ganglios linfáticos donde las DCs interactuarían con los linfocitos T naive promoviendo la secreción de IL-12 y otras citocinas por parte de las DCs aumentando así su capacidad para estimular a los linfocitos T [74, 244, 377, 378].

Sin embargo, la IL-12 por sí sola no es suficiente para una óptima polarización a Th1 [379, 380]. Se cree que otros miembros de la familia de la IL-12 [216, 381] como es la IL-27 son necesarios.

La IL-27 (subunidades IL-27p28 y EBI3) se expresa predominantemente en macrófagos y DCs activadas. Como he mencionado anteriormente, la IL-27 está involucrada con el desarrollo y la diferenciación de células Th1 induciendo la producción de IFN- $\gamma$  en linfocitos T no polarizados. Regula en positivo la subunidad beta 2 del receptor de IL-12 (IL-12R $\beta$ 2) en la superficie de linfocitos T activados mientras suprime la inducción hacia linaje Th2. Además, esta diferenciación a Th1 por parte de la IL-27 es dependiente de la señalización ICAM-1/LFA1. Destacar que la IL-27 tiene un efecto sinérgico con la IL-12 en la producción de IFN- $\gamma$ , especialmente cuando los niveles de IL-12 son bajos. Otra citocina secretada por las cDCs estimuladas a través de la vía CD40/CD40L es la IL-15 [377, 382, 383]. Existen trabajos publicados que demuestran el papel autocrino de la IL-15 como un factor activador de DCs [384]. Además, se ha descrito a la IL-15 como una vía de comunicación entre los subtipos de DCs [361]. Esta comunicación se produciría a través de interacciones CD40/CD40L en la que la IL-15 promovería la inducción en cDCs de CD40 el cual interactuaría con su ligando (CD40L) expresado en pDCs.

Por todos los indicios apuntados anteriormente y por otro lado, la presencia de IL-10 en nuestra condición de cultivo, un inhibidor crítico en la producción de IL-12 [385], la ausencia del receptor IL-12R $\beta$ 2 y la ligera expresión de IL-12R $\beta$ 1 en pDCs [190]; así como la expresión de EBI3 (subunidad de IL-27) en pDCs activadas [386], parece ser la IL-27 un buen candidato de estudio.

Papel de la IL-2 secretada por linfocitos T activados en la biología de las pDCs

El perfil de citocinas inducido en los linfocitos T aloestimulados por pDC+cDCs incluye la expresión de IL-2. Este resultado no fue sorprendente; a finales de los 80 ya se propuso que la IL-2 era una citocina producida por linfocitos T CD4 y CD8 activados [387]. Esta citocina ejerce múltiples efectos biológicos directos sobre células del sistema inmune de los cuales destacamos la supervivencia, la producción de citocinas así como la proliferación y la actividad citotóxica entre su variedad de células respondedoras. Una de sus dianas potenciales son las células dendríticas, de las que se sabía podían expresar el receptor de alta afinidad para esta citocina (IL-2  $\alpha\beta\gamma$ ). Sin embargo, pocos autores han investigado el papel de la IL-2 en las funciones de las DCs [194, 388, 389], y su función en las pDCs no estaba definido.

En nuestros experimentos demostramos que la presencia de IL-2 en pDCs activadas vía CD40L se traduce en una elevada expresión de CD25; un aumento en la secreción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6) y un incremento en la supervivencia de las pDCs. El conjunto de estos resultados, sugieren un papel modulador sobre las pDCs por parte de la IL-2 y del CD40L proporcionados por linfocitos T activados. En el contexto de la respuesta inmune, las pDCs localizadas en las zonas T de los ganglios linfáticos, serían las candidatas ideales para la creación de un microambiente determinado (en función de la secreción de citocinas) para influir en la diferenciación de los linfocitos T. Este podría ser pues uno de los mecanismos moduladores de la respuesta Th1. Así, se ha descrito que la señalización IL-2/IL-2R conferiría a las DCs su habilidad por dirigir respuestas inmunes hacia un fenotipo Th1 [390].

Por otra parte, la IL-2 se ha utilizado a nivel terapéutico para promover la respuesta inmune en pacientes que padecen estadios de cancer avanzados [391, 392] y para reforzar el sistema inmunitario de pacientes que padecen infecciones crónicas [393].



Los resultados obtenidos de la administración inmunoterapéutica de la IL-2 muestran un extenso abanico de efectos proinflamatorios [391, 394]. Parece ser que la administración local o sistémica de IL-2 no tendría un efecto directo sobre las células cancerígenas sino más bien una acción moduladora de las funciones efectoras de las células inmunes a través de factores secretados como resultado de la administración de IL-2 [395]. La cascada de citocinas y quimiocinas producidas como consecuencia de la IL-2 ha sido extensamente reportada [396]. De hecho, múltiples variables clínicas se han asociado como respuesta a la IL-2, entre las cuales destacamos concentraciones séricas elevadas de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 en pacientes que han recibido IL-2 [397].

También se han llevado a cabo estudios a nivel génico para determinar las moléculas responsables de las acciones que se obtienen como consecuencia de la presencia de IL-2 [398]. Existen un amplio abanico de genes dianas para esta citocina, que incluyen aquellos relacionados con la apoptosis celular, como por ejemplo bcl-2, que podría estar relacionado con la supervivencia dependientes de IL-2. Además, existen evidencias que los genes regulados por IL-2 se localizan en *clusters* cromosómicos [399]. Dos de ellos, uno localizado en 5q31 conocido como el *cluster* de citocinas; y otro, 6p21.3, región que contiene genes que codifican para los miembros de la superfamilia TNF, serían de relevancia en nuestro modelo y podrían contribuir a explicar los resultados que hemos obtenidos en pDCs como consecuencia de la presencia de IL-2.

La IL-2 por sí sola no induce ninguna señal de activación en DCs inmaduras, ya que dichas células no expresan CD25 (subunidad alfa del receptor para IL-2) en su superficie. Sólo las DCs activadas expresan el receptor, siendo pues uno de los marcadores de activación en DCs [400].

En nuestros resultados, observamos que las pDCs expresan CD25 en respuesta a diferentes estímulos de activación (CD40L y CpG).

Los anticuerpos monoclonales anti-CD25 se han utilizado ampliamente a nivel clínico. Aunque sus efectos sobre linfocitos T han sido copiosamente estudiados, existen pocos trabajos que estudien los efectos del bloqueo de CD25 en DCs [390, 401, 402]. Estos estudios apuntan que el impedimento de la unión de IL-2 por su receptor (anti-CD25) se traduce en una menor capacidad para estimular linfocitos T así como una disminución en la secreción de citocinas por parte de las DCs. De hecho, en modelos murinos se ha descrito que las DCs obtenidas de un animal *knockout* para IL-2 (IL-2  $-/-$ ) tienen disminuída su habilidad para inducir respuestas alogénicas sobre linfocitos T CD4 [195]. Y lo que a la secreción de citocinas se refiere, existe una inhibición de IFN- $\gamma$  e IL-12 [194, 390] así como de TNF- $\alpha$  e IL-6 [403, 404]. Estos últimos datos concuerdan con los resultados que hemos obtenido en pDCs cuando utilizamos MAR-108 (anticuerpo que bloquea la unión de IL-2 por su receptor). Resumiendo, la IL-2 jugaría un papel importante en la regulación del patrón de síntesis de citocinas en DCs determinante en el resultado de las respuestas T inducidas.

Los anticuerpos monoclonales anti-CD25 se han utilizado ampliamente en la clínica del trasplante para prevenir el rechazo agudo. De hecho, Mnasria y col. y otros autores [291], han observado que la ciclosporina A y otros inmunosupresores de uso clínico, inhibían la inducción de CD25 (datos también observados por nuestro grupo de trabajo). Hasta la fecha, a la ciclosporina y al FK506 (drogas anticalcineurina) se les atribuía una actuación principal sobre linfocitos T. Sin embargo, actualmente se cree que también ejercen su función tolerogénica en el mantenimiento de DCs inmaduras gracias a la inhibición, entre otros efectos, de la maduración dependiente de la producción de IL-2 en DCs. Como consecuencia, las DCs fracasarían en su progreso a una maduración, un procesamiento y una presentación de aloantígenos a los linfocitos T de forma eficiente; lo cual interferiría en la activación de estos linfocitos. Este hecho, ha promovido la visión de una nueva perspectiva que apunta a un modelo integrador en el modo de acción de los inmunosupresores que inhiben la actividad de la calcineurina [405].

Nuestro grupo aporta un trabajo original dónde se describe con detalle el papel que juega FK506 en la biología de las pDCs. Se presenta, por primera vez, el efecto del tacrolimus en la inmunomodulación fenotípica y en la secreción de citocinas por parte de las pDCs y sus consecuencias en la inducción de la respuesta alogénica. Cabe señalar que se trata de una aportación de conocimiento básico que debe trasladarse a un estudio clínico en el contexto de diversas situaciones patológicas. Aunque esta última propuesta puede resultar de difícil abordaje ya que, normalmente, las terapias inmunosupresoras no son monoterapias (un único inmunosupresor) sino la combinación de varios agentes supresores [406].

Por último destacar que, una de las nuevas perspectivas en el estudio de los subtipos de células dendríticas es la de profundizar en la definición de los posibles efectos cooperativos de ambas subpoblaciones, y de cómo pueden modular la respuesta inmunitaria. De hecho, debemos subrayar que existen numerosos trabajos contemporáneos al nuestro que manifiestan la coordinación entre ambos subtipos de DCs en distintos contextos que avalan nuestra hipótesis inicial de trabajo [134, 361, 407-413].

El desarrollo de experimentos que permitan clarificar la comunicación que se establece entre distintos tipos celulares así como el conocimiento de los diferentes aspectos de la biología de las DCs puede aportar nuevos datos que permitan esclarecer puntos importantes de la respuesta inmune y en un futuro, manipular o regular dicha respuesta en distintas condiciones de aplicación clínica. Así pues, el balance entre cDCs y pDCs activadas podría ser crucial en la regulación de una respuesta inmune efectiva. Descifrar los mecanismos moleculares y celulares de las funciones de cada uno de los subtipos de DCs es importante para el diseño de futuros ensayos clínicos. El uso de las DCs en inmunoterapia (estimular o inhibir un determinado subtipo) representaría una aproximación alternativa que permitiría conseguir resultados más efectivos a nivel clínico.

Para terminar, a modo de resumen, proponemos un modelo de actuación complementaria de los dos subtipos de DCs en la definición de una potente respuesta T (ver **Figura 10**). De forma general, está ampliamente aceptado que las cDCs capturan y procesan antígenos en la periferia. Posteriormente, migran a los ganglios linfáticos donde tiene lugar la presentación antigénica. Para que la mencionada presentación tenga lugar de manera “productiva” la DC debe experimentar una serie de cambios morfológicos, fenotípicos y funcionales, proceso conocido como maduración [121]. En el transcurso de una respuesta inmune, y concretamente durante el proceso de maduración, también se introducen cambios en el patrón de expresión de receptores de quimiocinas y se reorganizan ciertas proteínas del citoesqueleto, para permitir la movilización de la DC hacia su nuevo destino en el ganglio linfático regional. Cuando alcanzan el ganglio, las cDCs maduras y activadas son las primeras en estimular a los linfocitos T [414] (**Figura 10 punto 1**). Y no sólo se encuentran con los linfocitos T inmaduros sino también con las pDCs (**Figura 10 punto 3-4**). Así, hipotéticamente, el linfocito T naive reconocería el péptido antigénico presentado por la cDC activada. Ésta, a su vez, secretaría factores que influenciarían tanto a la célula T como a la pDC (**Figura 10 punto 2 y 3**). Además, los linfocitos T activados proporcionarían factores solubles (IL-3 e IL-2, entre otros) así como factores celulares (CD40L) que modularían la biología de las pDCs (supervivencia y activación) (**Figura 10 punto 4**). Lo que su conjunto conduciría a que la pDC respondiera a esta estimulación aportando factores accesorios necesarios para la maduración final del linfocito T. Este modelo podría ser exportable a la presentación antigénica en tejido diana de diversos tipos de enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunidad.

Figura 10. Modelo de actuación complementaria de los dos subtipos de DCs en la inducción de una potente respuesta T

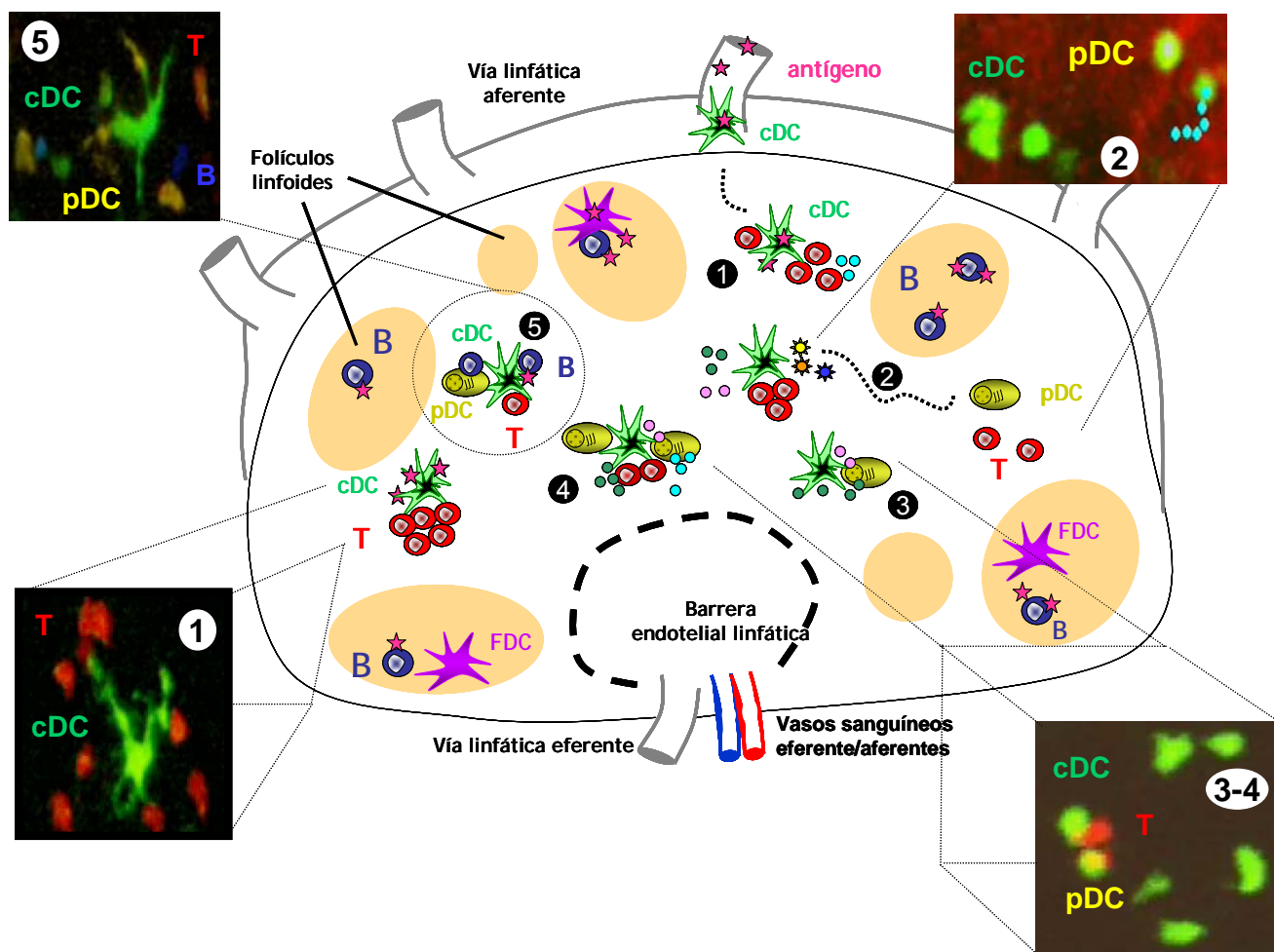


Figura 10. En los tejidos periféricos, las cDCs capturan y procesan antígenos. Tras un proceso de activación, viajan a los ganglios a través del circuito aferente de la linfa. En condiciones fisiológicas, en las zonas T de los órganos linfoides secundarios, las cDCs maduras y activadas son las primeras en estimular a los linfocitos T (1). Tras contactos con linfocitos T, las cDCs activadas por la vía CD40/CD40L, así como los linfocitos T secretarían diversos factores solubles, que podrían atraer a las pDCs al lugar de la sinapsis inmunológica (2). Por un lado, la cDC madura condicionaría la biología de las pDCs (3); y por otro lado, los linfocitos T proporcionarían factores solubles (IL-3 e IL-2, entre otros) así como factores celulares (CD40L, por ejemplo) que modularían aspectos fundamentales en las pDCs (supervivencia y activación) (4). Lo que su conjunto conduciría a que la pDC respondiera a esta estimulación aportando factores accesorios necesarios para la maduración final del linfocito T. Finalmente, existiría la posibilidad de encontrar conjugados celulares compuestos por cDCs, pDCs, linfocitos B y T (5) que determinarían el resultado final de las respuestas inmunes efectoras de la inmunidad adaptativa. (adaptación de *Annu. Rev. Immunol.*, 2008)



# 5

## CONCLUSIONES





## CONCLUSIONES



Las conclusiones que se derivan de este estudio son:

1-. La capacidad aloestimuladora de las subpoblaciones de DCs aisladas de sangre periférica sigue el patrón descrito previamente. En contraposición a este patrón, hemos definido que la combinación cDCs y pDCs juega un papel determinante en la magnitud y el fenotipo de la respuesta T inducida. Este papel se manifiesta principalmente a dos niveles:

1.1- Existe una potente respuesta proliferativa en linfocitos T alogénicos cuando ambos subtipos de DCs están presentes.

1.2- Esta respuesta representa un perfil Th1 caracterizado por una mayor producción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T (estimados con la combinación pDCs+100cDCs+T), comparado con los niveles obtenidos en la respuesta inducida con cDCs como únicas APCs.

2-. La respuesta alogénica inducida por la combinación pDC+cDC depende de forma determinante de la supervivencia y la maduración/activación del subtipo pDCs. Algunos de los factores que contribuyen a este nivel son:

2.1- La IL-3 que se demuestra como un factor clave en la supervivencia de las pDCs también en alogenicidad.

2.2- El CD40L, señal proporcionada tanto por linfocitos T como por cDC, promueve la supervivencia y activación de las pDCs.

## ■ CONCLUSIONES □

---

2.3- La IL-2, cuyo receptor expresan las pDCs activadas, y que actúa directamente sobre este tipo celular incrementando su viabilidad a través de la vía CD40/CD40L, promoviendo un fenotipo maduro y contribuyendo a la secreción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  y IL-6).

3-. Los inhibidores de la calcineurina, como el tacrolimus, reducen de forma significativa la maduración/activación de las pDCs, afectando de forma especial a la secreción de TNF. Este efecto podría ser en parte debido a la no expresión de CD25 en pDCs preincubadas con el inhibidor.



# BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

1. Fearon, D.T. and R.M. Locksley, *The instructive role of innate immunity in the acquired immune response*. Science, 1996. 272(5258): p. 50-3.
2. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition*. Cell, 1997. 91(3): p. 295-8.
3. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu Rev Immunol, 1994. 12: p. 991-1045.
4. Barton, G.M. and R. Medzhitov, *Toll-like receptors and their ligands*. Curr Top Microbiol Immunol, 2002. 270: p. 81-92.
5. Gately, M.K., et al., *The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. 16: p. 495-521.
6. Nakanishi, K., et al., *Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses*. Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 423-74.
7. Tang, Q. and J.A. Bluestone, *The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation*. Nat Immunol, 2008. 9(3): p. 239-44.
8. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. 27: p. 485-517.
9. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. 137(5): p. 1142-62.
10. Steinman, R.M. and M.D. Witmer, *Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. 75(10): p. 5132-6.
11. Inaba, K., M.D. Witmer, and R.M. Steinman, *Clustering of dendritic cells, helper T lymphocytes, and histocompatible B cells during primary antibody responses in vitro*. J Exp Med, 1984. 160(3): p. 858-76.
12. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. 392(6673): p. 245-52.
13. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, *Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(1): p. 351-8.
14. Fernandez, N.C., et al., *Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo*. Nat Med, 1999. 5(4): p. 405-11.

15. Munz, C., et al., *Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells*. *Blood*, 2005. 105(1): p. 266-73.
16. Lucas, M., et al., *Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15*. *Immunity*, 2007. 26(4): p. 503-17.
17. Kadowaki, N., et al., *Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells*. *J Exp Med*, 2001. 193(10): p. 1221-6.
18. Fujii, S., et al., *Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs*. *Nat Immunol*, 2002. 3(9): p. 867-74.
19. Steinman, R.M., *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. *Annu Rev Immunol*, 1991. 9: p. 271-96.
20. Inaba, K., et al., *Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ*. *J Exp Med*, 1990. 172(2): p. 631-40.
21. Dubois, B., et al., *Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes*. *J Exp Med*, 1997. 185(5): p. 941-51.
22. Wykes, M. and G. MacPherson, *Dendritic cell-B-cell interaction: dendritic cells provide B cells with CD40-independent proliferation signals and CD40-dependent survival signals*. *Immunology*, 2000. 100(1): p. 1-3.
23. Jego, G., et al., *Dendritic cells control B cell growth and differentiation*. *Curr Dir Autoimmun*, 2005. 8: p. 124-39.
24. Hart, D.N., *Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response*. *Blood*, 1997. 90(9): p. 3245-87.
25. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2000. 18: p. 767-811.
26. Thomas, R. and P.E. Lipsky, *Human peripheral blood dendritic cell subsets. Isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells*. *J Immunol*, 1994. 153(9): p. 4016-28.
27. O'Doherty, U., et al., *Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature*. *Immunology*, 1994. 82(3): p. 487-93.
28. Robinson, S.P., et al., *Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells*. *Eur J Immunol*, 1999. 29(9): p. 2769-78.
29. de Saint-Vis, B., et al., *The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation*. *J Immunol*, 1998. 160(4): p. 1666-76.

30. Nagorsen, D., F.M. Marincola, and M.C. Panelli, *Cytokine and chemokine expression profiles of maturing dendritic cells using multiprotein platform arrays*. *Cytokine*, 2004. 25(1): p. 31-5.
31. Moser, M. and K.M. Murphy, *Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development*. *Nat Immunol*, 2000. 1(3): p. 199-205.
32. Jonuleit, H., et al., *Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells*. *Trends Immunol*, 2001. 22(7): p. 394-400.
33. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes*. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(3): p. 151-61.
34. Patterson, S., *Flexibility and cooperation among dendritic cells*. *Nat Immunol*, 2000. 1(4): p. 273-4.
35. Pulendran, B., H. Tang, and T.L. Denning, *Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets*. *Curr Opin Immunol*, 2008. 20(1): p. 61-7.
36. Lindquist, R.L., et al., *Visualizing dendritic cell networks in vivo*. *Nat Immunol*, 2004. 5(12): p. 1243-50.
37. McLellan, A.D., et al., *Anatomic location and T-cell stimulatory functions of mouse dendritic cell subsets defined by CD4 and CD8 expression*. *Blood*, 2002. 99(6): p. 2084-93.
38. Borrás, F.E., et al., *Identification of both myeloid CD11c<sup>+</sup> and lymphoid CD11c<sup>-</sup> dendritic cell subsets in cord blood*. *Br J Haematol*, 2001. 113(4): p. 925-31.
39. Sallusto, F., et al., *Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function*. *Eur J Immunol*, 1999. 29(5): p. 1617-25.
40. Penna, G., et al., *Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells*. *Hum Immunol*, 2002. 63(12): p. 1164-71.
41. Kadowaki, N., et al., *Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens*. *J Exp Med*, 2001. 194(6): p. 863-9.
42. Thomas, R., L.S. Davis, and P.E. Lipsky, *Isolation and characterization of human peripheral blood dendritic cells*. *J Immunol*, 1993. 150(3): p. 821-34.
43. O'Doherty, U., et al., *Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium*. *J Exp Med*, 1993. 178(3): p. 1067-76.
44. Strobl, H., et al., *Identification of CD68<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics*. *J Immunol*, 1998. 161(2): p. 740-8.

45. Perez-Cabezas, B., et al., *Reduced numbers of plasmacytoid dendritic cells in aged blood donors*. *Exp Gerontol*, 2007. 42(10): p. 1033-8.
46. Dzionek, A., et al., *BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood*. *J Immunol*, 2000. 165(11): p. 6037-46.
47. Dzionek, A., et al., *Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions*. *Hum Immunol*, 2002. 63(12): p. 1133-48.
48. Maraskovsky, E., et al., *Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified*. *J Exp Med*, 1996. 184(5): p. 1953-62.
49. Pulendran, B., et al., *Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo*. *J Immunol*, 2000. 165(1): p. 566-72.
50. Arpinati, M., et al., *Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells*. *Blood*, 2000. 95(8): p. 2484-90.
51. Maraskovsky, E., et al., *In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand*. *Blood*, 2000. 96(3): p. 878-84.
52. Pulendran, B., et al., *Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors*. *Trends Immunol*, 2001. 22(1): p. 41-7.
53. Blom, B., et al., *Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells*. *J Exp Med*, 2000. 192(12): p. 1785-96.
54. Chen, W., et al., *Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors*. *Blood*, 2004. 103(7): p. 2547-53.
55. Valladeau, J. and S. Saeland, *Cutaneous dendritic cells*. *Semin Immunol*, 2005. 17(4): p. 273-83.
56. Nestle, F.O., L.A. Turka, and B.J. Nickoloff, *Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines*. *J Clin Invest*, 1994. 94(1): p. 202-9.
57. Vanbervliet, B., et al., *Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces*. *Eur J Immunol*, 2002. 32(1): p. 231-42.
58. Caux, C., et al., *CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis*. *Blood*, 1997. 90(4): p. 1458-70.



59. Caux, C., et al., *GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells*. *Nature*, 1992. 360(6401): p. 258-61.
60. Caux, C., et al., *CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha*. *J Exp Med*, 1996. 184(2): p. 695-706.
61. Kissenpfennig, A., et al., *Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells*. *Immunity*, 2005. 22(5): p. 643-54.
62. Itano, A.A., et al., *Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity*. *Immunity*, 2003. 19(1): p. 47-57.
63. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. *J Exp Med*, 1994. 179(4): p. 1109-18.
64. Romani, N., et al., *Proliferating dendritic cell progenitors in human blood*. *J Exp Med*, 1994. 180(1): p. 83-93.
65. Palucka, K.A., et al., *Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation*. *J Immunol*, 1998. 160(9): p. 4587-95.
66. Piccioli, D., et al., *Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets*. *Blood*, 2007. 109(12): p. 5371-9.
67. Osugi, Y., S. Vuckovic, and D.N. Hart, *Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes*. *Blood*, 2002. 100(8): p. 2858-66.
68. Luft, T., et al., *Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets*. *Blood*, 2002. 100(4): p. 1362-72.
69. Jefford, M., et al., *Functional comparison of DCs generated in vivo with Flt3 ligand or in vitro from blood monocytes: differential regulation of function by specific classes of physiologic stimuli*. *Blood*, 2003. 102(5): p. 1753-63.
70. Olweus, J., et al., *Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(23): p. 12551-6.
71. Almeida, J., et al., *Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells*. *Clin Immunol*, 2001. 100(3): p. 325-38.
72. MacDonald, K.P., et al., *Characterization of human blood dendritic cell subsets*. *Blood*, 2002. 100(13): p. 4512-20.

73. Lindstedt, M., K. Lundberg, and C.A. Borrebaeck, *Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells*. J Immunol, 2005. 175(8): p. 4839-46.
74. Cella, M., et al., *Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation*. J Exp Med, 1996. 184(2): p. 747-52.
75. Verhasselt, V., et al., *Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway*. J Immunol, 1997. 158(6): p. 2919-25.
76. Rissoan, M.C., et al., *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. Science, 1999. 283(5405): p. 1183-6.
77. Kalinski, P., et al., *T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal*. Immunol Today, 1999. 20(12): p. 561-7.
78. Siegal, F.P., et al., *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*. Science, 1999. 284(5421): p. 1835-7.
79. Cella, M., et al., *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon*. Nat Med, 1999. 5(8): p. 919-23.
80. Liu, Y.J., et al., *Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation*. Nat Immunol, 2001. 2(7): p. 585-9.
81. Colonna, M., A. Krug, and M. Cella, *Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens*. Curr Opin Immunol, 2002. 14(3): p. 373-9.
82. Bandyopadhyay, S., et al., *Requirement for HLA-DR+ accessory cells in natural killing of cytomegalovirus-infected fibroblasts*. J Exp Med, 1986. 164(1): p. 180-95.
83. Krug, A., et al., *TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function*. Immunity, 2004. 21(1): p. 107-19.
84. Jego, G., et al., *Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6*. Immunity, 2003. 19(2): p. 225-34.
85. Poeck, H., et al., *Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help*. Blood, 2004. 103(8): p. 3058-64.
86. Agnello, D., et al., *Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights*. J Clin Immunol, 2003. 23(3): p. 147-61.

87. Santini, S.M., et al., *Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice*. J Exp Med, 2000. 191(10): p. 1777-88.
88. Liu, Y.J., *IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors*. Annu Rev Immunol, 2005. 23: p. 275-306.
89. Ito, T., et al., *Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs*. J Immunol, 2001. 166(5): p. 2961-9.
90. Ito, T., et al., *Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets*. J Exp Med, 2002. 195(11): p. 1507-12.
91. Palucka, A.K., et al., *Cross-regulation of TNF and IFN-alpha in autoimmune diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(9): p. 3372-7.
92. Yoneyama, H., et al., *Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules*. Int Immunol, 2004. 16(7): p. 915-28.
93. Penna, G., S. Sozzani, and L. Adorini, *Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells*. J Immunol, 2001. 167(4): p. 1862-6.
94. Randolph, G.J., J. Ochando, and S. Partida-Sanchez, *Migration of dendritic cell subsets and their precursors*. Annu Rev Immunol, 2008. 26: p. 293-316.
95. Zabel, B.A., A.M. Silverio, and E.C. Butcher, *Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood*. J Immunol, 2005. 174(1): p. 244-51.
96. Res, P.C., et al., *Expression of pTalpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus*. Blood, 1999. 94(8): p. 2647-57.
97. Wang, Y.H. and Y.J. Liu, *Mysterious origin of plasmacytoid dendritic cell precursors*. Immunity, 2004. 21(1): p. 1-2.
98. Dzionek, A., et al., *BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction*. J Exp Med, 2001. 194(12): p. 1823-34.
99. Fitzgerald-Bocarsly, P., *Natural interferon-alpha producing cells: the plasmacytoid dendritic cells*. Biotechniques, 2002. Suppl: p. 16-20, 22, 24-9.
100. Grouard, G., et al., *The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand*. J Exp Med, 1997. 185(6): p. 1101-11.
101. Benitez-Ribas, D., et al., *Plasmacytoid dendritic cells of melanoma patients present exogenous proteins to CD4+ T cells after Fc gamma RII-mediated uptake*. J Exp Med, 2006. 203(7): p. 1629-35.

102. Cao, W., et al., *Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production*. J Exp Med, 2006. 203(6): p. 1399-405.
103. Ochando, J.C., et al., *Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts*. Nat Immunol, 2006. 7(6): p. 652-62.
104. Chehimi, J., et al., *Dendritic cells and IFN-alpha-producing cells are two functionally distinct non-B, non-monocytic HLA-DR+ cell subsets in human peripheral blood*. Immunology, 1989. 68(4): p. 486-90.
105. Asselin-Paturel, C., et al., *Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology*. Nat Immunol, 2001. 2(12): p. 1144-50.
106. Boonstra, A., et al., *Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation*. J Exp Med, 2003. 197(1): p. 101-9.
107. Liu, Y.J., et al., *T cell activation and polarization by DC1 and DC2*. Curr Top Microbiol Immunol, 2000. 251: p. 149-59.
108. Gilliet, M. and Y.J. Liu, *Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2002. 195(6): p. 695-704.
109. Brinkmann, V., et al., *Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells*. J Exp Med, 1993. 178(5): p. 1655-63.
110. Kadowaki, N., et al., *Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity*. J Exp Med, 2000. 192(2): p. 219-26.
111. Cella, M., et al., *Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization*. Nat Immunol, 2000. 1(4): p. 305-10.
112. Merad, M., M. Collin, and J. Bromberg, *Dendritic cell homeostasis and trafficking in transplantation*. Trends Immunol, 2007. 28(8): p. 353-9.
113. Ito, T., et al., *Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand*. J Exp Med, 2007. 204(1): p. 105-15.
114. Kuwana, M., *Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets*. Hum Immunol, 2002. 63(12): p. 1156-63.
115. Moseman, E.A., et al., *Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2004. 173(7): p. 4433-42.
116. Fonteneau, J.F., et al., *Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity*. Blood, 2003. 101(9): p. 3520-6.

117. Sallio, M., et al., *Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions*. Eur J Immunol, 2003. 33(4): p. 1052-62.
118. Schlecht, G., et al., *Murine plasmacytoid dendritic cells induce effector/memory CD8+ T-cell responses in vivo after viral stimulation*. Blood, 2004. 104(6): p. 1808-15.
119. Mouries, J., et al., *Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation*. Blood, 2008. 112(9): p. 3713-22.
120. Ardavin, C., *Differentiation pathways and precursors of mouse dendritic cells*. Inmunología, 2004. 23(1): p. 16-23.
121. Corbí, *Transcriptional and signalling mechanisms during dendritic cell differentiation and maturation*. Inmunología, 2002. 21(4): p. 228-248.
122. Granucci, F., et al., *Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli*. Eur J Immunol, 2001. 31(9): p. 2539-46.
123. Mellman, I. and R.M. Steinman, *Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines*. Cell, 2001. 106(3): p. 255-8.
124. Fanger, N.A., et al., *Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells*. J Immunol, 1996. 157(2): p. 541-8.
125. Figdor, C.G., Y. van Kooyk, and G.J. Adema, *C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(2): p. 77-84.
126. Jiang, W., et al., *The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing*. Nature, 1995. 375(6527): p. 151-5.
127. Delneste, Y., et al., *Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation*. Immunity, 2002. 17(3): p. 353-62.
128. Asea, A., et al., *Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4*. J Biol Chem, 2002. 277(17): p. 15028-34.
129. Rubartelli, A., A. Poggi, and M.R. Zocchi, *The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium*. Eur J Immunol, 1997. 27(8): p. 1893-900.
130. Albert, M.L., B. Sauter, and N. Bhardwaj, *Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs*. Nature, 1998. 392(6671): p. 86-9.
131. Albert, M.L., et al., *Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes*. J Exp Med, 1998. 188(7): p. 1359-68.

132. Rescigno, M., et al., *Coordinated events during bacteria-induced DC maturation*. Immunol Today, 1999. 20(5): p. 200-3.
133. Steinman, R.M. and J. Banchereau, *Taking dendritic cells into medicine*. Nature, 2007. 449(7161): p. 419-26.
134. Villadangos, J.A. and P. Schnorrer, *Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo*. Nat Rev Immunol, 2007. 7(7): p. 543-55.
135. Izquierdo-Useros, N., et al., *Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway*. Blood, 2009. 113(12): p. 2732-41.
136. Trombetta, E.S. and I. Mellman, *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo*. Annu Rev Immunol, 2005. 23: p. 975-1028.
137. Guermonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2002. 20: p. 621-67.
138. Inaba, K., et al., *The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli*. J Exp Med, 2000. 191(6): p. 927-36.
139. Turley, S.J., et al., *Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells*. Science, 2000. 288(5465): p. 522-7.
140. Delamarre, L., et al., *Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate*. Science, 2005. 307(5715): p. 1630-4.
141. Carbone, F.R. and W.R. Heath, *The role of dendritic cell subsets in immunity to viruses*. Curr Opin Immunol, 2003. 15(4): p. 416-20.
142. Sigal, L.J., et al., *Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen*. Nature, 1999. 398(6722): p. 77-80.
143. Barral, D.C. and M.B. Brenner, *CD1 antigen presentation: how it works*. Nat Rev Immunol, 2007. 7(12): p. 929-41.
144. Cao, X., et al., *CD1 molecules efficiently present antigen in immature dendritic cells and traffic independently of MHC class II during dendritic cell maturation*. J Immunol, 2002. 169(9): p. 4770-7.
145. van der Wel, N.N., et al., *CD1 and major histocompatibility complex II molecules follow a different course during dendritic cell maturation*. Mol Biol Cell, 2003. 14(8): p. 3378-88.
146. Sozzani, S., et al., *Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties*. J Immunol, 1998. 161(3): p. 1083-6.

147. Sallusto, F., et al., *Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation*. Eur J Immunol, 1998. 28(9): p. 2760-9.
148. Dieu, M.C., et al., *Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites*. J Exp Med, 1998. 188(2): p. 373-86.
149. Lin, C.L., et al., *Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation*. Eur J Immunol, 1998. 28(12): p. 4114-22.
150. Foti, M., et al., *Upon dendritic cell (DC) activation chemokines and chemokine receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of DC at the inflammatory site*. Int Immunol, 1999. 11(6): p. 979-86.
151. Saeki, H., et al., *Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes*. J Immunol, 1999. 162(5): p. 2472-5.
152. Pulendran, B., *Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors*. Immunol Rev, 2004. 199: p. 227-50.
153. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 335-76.
154. Hartmann, G., G.J. Weiner, and A.M. Krieg, *CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(16): p. 9305-10.
155. Cella, M., et al., *Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA*. J Exp Med, 1999. 189(5): p. 821-9.
156. Macagno, A., et al., *Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation*. Trends Immunol, 2007. 28(5): p. 227-33.
157. Kato, H., et al., *Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response*. Immunity, 2005. 23(1): p. 19-28.
158. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(7): p. 499-511.
159. Miggin, S.M. and L.A. O'Neill, *New insights into the regulation of TLR signaling*. J Leukoc Biol, 2006. 80(2): p. 220-6.
160. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. 124(4): p. 783-801.
161. Heil, F., et al., *The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily*. Eur J Immunol, 2003. 33(11): p. 2987-97.

162. Matsumoto, M., et al., *Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells*. J Immunol, 2003. 171(6): p. 3154-62.
163. Jarrossay, D., et al., *Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells*. Eur J Immunol, 2001. 31(11): p. 3388-93.
164. Geijtenbeek, T.B., et al., *Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 33-54.
165. Robinson, M.J., et al., *Myeloid C-type lectins in innate immunity*. Nat Immunol, 2006. 7(12): p. 1258-65.
166. Kanazawa, N., *Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells*. J Dermatol Sci, 2007. 45(2): p. 77-86.
167. Valladeau, J., et al., *Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules*. Immunity, 2000. 12(1): p. 71-81.
168. Geijtenbeek, T.B., et al., *Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses*. Cell, 2000. 100(5): p. 575-85.
169. Inohara, N. and G. Nunez, *NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(5): p. 371-82.
170. Martinon, F. and J. Tschopp, *NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens*. Trends Immunol, 2005. 26(8): p. 447-54.
171. Martinon, F., A. Mayor, and J. Tschopp, *The inflammasomes: guardians of the body*. Annu Rev Immunol, 2009. 27: p. 229-65.
172. Mariathasan, S. and D.M. Monack, *Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2007. 7(1): p. 31-40.
173. Martinon, F., et al., *Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome*. Nature, 2006. 440(7081): p. 237-41.
174. Miceli-Richard, C., et al., *CARD15 mutations in Blau syndrome*. Nat Genet, 2001. 29(1): p. 19-20.
175. Martinon, F. and J. Tschopp, *Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases*. Cell, 2004. 117(5): p. 561-74.
176. Kummer, J.A., et al., *Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response*. J Histochem Cytochem, 2007. 55(5): p. 443-52.



177. Creagh, E.M. and L.A. O'Neill, *TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity*. Trends Immunol, 2006. 27(8): p. 352-7.
178. Zou, G.M. and Y.K. Tam, *Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances*. Eur Cytokine Netw, 2002. 13(2): p. 186-99.
179. Blanco, P., et al., *Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. 19(1): p. 41-52.
180. Jonuleit, H., et al., *Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions*. Eur J Immunol, 1997. 27(12): p. 3135-42.
181. Langenkamp, A., et al., *Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells*. Nat Immunol, 2000. 1(4): p. 311-6.
182. Smith, D.E., et al., *Four new members expand the interleukin-1 superfamily*. J Biol Chem, 2000. 275(2): p. 1169-75.
183. Schmitz, J., et al., *IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines*. Immunity, 2005. 23(5): p. 479-90.
184. Steinman, R.M., *Cytokines amplify the function of accessory cells*. Immunol Lett, 1988. 17(3): p. 197-202.
185. Pascual, V., et al., *Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade*. J Exp Med, 2005. 201(9): p. 1479-86.
186. Larsen, C.M., et al., *Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus*. N Engl J Med, 2007. 356(15): p. 1517-26.
187. Stoll, S., et al., *Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development*. Eur J Immunol, 1998. 28(10): p. 3231-9.
188. Gardella, S., et al., *Interleukin-18 synthesis and secretion by dendritic cells are modulated by interaction with antigen-specific T cells*. J Leukoc Biol, 1999. 66(2): p. 237-41.
189. Gracie, J.A., S.E. Robertson, and I.B. McInnes, *Interleukin-18*. J Leukoc Biol, 2003. 73(2): p. 213-24.
190. Kaser, A., et al., *Interleukin-18 attracts plasmacytoid dendritic cells (DC2s) and promotes Th1 induction by DC2s through IL-18 receptor expression*. Blood, 2004. 103(2): p. 648-55.
191. Bykovskaja, S.N., et al., *Interleukin-2-induces development of dendritic cells from cord blood CD34+ cells*. J Leukoc Biol, 1998. 63(5): p. 620-30.

192. Civallero, M., et al., *Dendritic cells and interleukin-2: cytochemical and ultrastructural study*. *Histol Histopathol*, 2000. 15(4): p. 1077-85.
193. Kradin, R.L., et al., *Interleukin-2 promotes the motility of dendritic cells and their accumulation in lung and skin*. *Pathobiology*, 1996. 64(4): p. 180-6.
194. Fukao, T. and S. Koyasu, *Expression of functional IL-2 receptors on mature splenic dendritic cells*. *Eur J Immunol*, 2000. 30(5): p. 1453-7.
195. Granucci, F., et al., *Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis*. *Nat Immunol*, 2001. 2(9): p. 882-8.
196. Caux, C., et al., *Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells*. *Blood*, 1996. 87(6): p. 2376-85.
197. Sato, M., et al., *Functional heterogeneity among bone marrow-derived dendritic cells conditioned by T(h)1- and T(h)2-biasing cytokines for the generation of allogeneic cytotoxic T lymphocytes*. *Int Immunol*, 2000. 12(3): p. 335-42.
198. Storzynsky, E., et al., *Interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhance the generation and function of dendritic cells*. *Immunology*, 1999. 97(1): p. 138-49.
199. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. *Nature*, 2006. 441(7090): p. 235-8.
200. Keul, R., et al., *A possible role for soluble IL-6 receptor in the pathogenesis of systemic onset juvenile chronic arthritis*. *Cytokine*, 1998. 10(9): p. 729-34.
201. De Smedt, T., et al., *Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function*. *Eur J Immunol*, 1997. 27(5): p. 1229-35.
202. Corinti, S., et al., *Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions*. *J Immunol*, 2001. 166(7): p. 4312-8.
203. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *The instructive role of dendritic cells on T-cell responses*. *Arthritis Res*, 2002. 4 Suppl 3: p. S127-32.
204. D'Andrea, A., et al., *Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells*. *J Exp Med*, 1993. 178(3): p. 1041-8.
205. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. *Annu Rev Immunol*, 2001. 19: p. 683-765.
206. Roncarolo, M.G., M.K. Levings, and C. Traversari, *Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells*. *J Exp Med*, 2001. 193(2): p. F5-9.
207. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(2): p. 133-46.

208. Nagayama, H., et al., *IL-12 responsiveness and expression of IL-12 receptor in human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells*. J Immunol, 2000. 165(1): p. 59-66.
209. Cargill, M., et al., *A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes*. Am J Hum Genet, 2007. 80(2): p. 273-90.
210. Lee, E., et al., *Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris*. J Exp Med, 2004. 199(1): p. 125-30.
211. Duerr, R.H., et al., *A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene*. Science, 2006. 314(5804): p. 1461-3.
212. Smits, H.H., et al., *Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced Th1 development*. Eur J Immunol, 2004. 34(5): p. 1371-80.
213. Vaknin-Dembinsky, A., K. Balashov, and H.L. Weiner, *IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production*. J Immunol, 2006. 176(12): p. 7768-74.
214. Lock, C., et al., *Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis*. Nat Med, 2002. 8(5): p. 500-8.
215. Schmidt, C., et al., *Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2005. 11(1): p. 16-23.
216. Gee, K., et al., *The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2009. 8(1): p. 40-52.
217. Xu, H., et al., *Dendritic cells differentiated from human monocytes through a combination of IL-4, GM-CSF and IFN-gamma exhibit phenotype and function of blood dendritic cells*. Adv Exp Med Biol, 1995. 378: p. 75-8.
218. Mosca, P.J., et al., *A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 ligand and interferon-gamma treatment*. Blood, 2000. 96(10): p. 3499-504.
219. Bave, U., et al., *Activation of the type I interferon system in primary Sjogren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism*. Arthritis Rheum, 2005. 52(4): p. 1185-95.
220. Gottenberg, J.E., et al., *Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjogren's syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(8): p. 2770-5.
221. Nestle, F.O., et al., *Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production*. J Exp Med, 2005. 202(1): p. 135-43.

222. Hooks, J.J., et al., *Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease*. N Engl J Med, 1979. 301(1): p. 5-8.
223. Baechler, E.C., et al., *Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(5): p. 2610-5.
224. Crow, M.K. and J. Wohlgemuth, *Microarray analysis of gene expression in lupus*. Arthritis Res Ther, 2003. 5(6): p. 279-87.
225. Tracey, K.J. and A. Cerami, *Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target*. Annu Rev Med, 1994. 45: p. 491-503.
226. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. 104(4): p. 487-501.
227. Tracey, D., et al., *Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review*. Pharmacol Ther, 2008. 117(2): p. 244-79.
228. Kadowaki, N., *The divergence and interplay between pDC and mDC in humans*. Front Biosci, 2009. 14: p. 808-17.
229. Heil, F., et al., *Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8*. Science, 2004. 303(5663): p. 1526-9.
230. Diebold, S.S., et al., *Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA*. Science, 2004. 303(5663): p. 1529-31.
231. Kadowaki, N., S. Antonenko, and Y.J. Liu, *Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN*. J Immunol, 2001. 166(4): p. 2291-5.
232. Pulendran, B., *Immune activation: death, danger and dendritic cells*. Curr Biol, 2004. 14(1): p. R30-2.
233. Gallucci, S., M. Lolkema, and P. Matzinger, *Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells*. Nat Med, 1999. 5(11): p. 1249-55.
234. Sauter, B., et al., *Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells*. J Exp Med, 2000. 191(3): p. 423-34.
235. Ohashi, K., et al., *Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex*. J Immunol, 2000. 164(2): p. 558-61.
236. Binder, R.J., R. Vatner, and P. Srivastava, *The heat-shock protein receptors: some answers and more questions*. Tissue Antigens, 2004. 64(4): p. 442-51.
237. Scaffidi, P., T. Misteli, and M.E. Bianchi, *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. Nature, 2002. 418(6894): p. 191-5.

238. Lotze, M.T. and K.J. Tracey, *High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal*. Nat Rev Immunol, 2005. 5(4): p. 331-42.
239. Yang, D., et al., *Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal*. Trends Immunol, 2002. 23(6): p. 291-6.
240. Biragyn, A., et al., *Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2*. Science, 2002. 298(5595): p. 1025-9.
241. Bourgeois, C., B. Rocha, and C. Tanchot, *A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory*. Science, 2002. 297(5589): p. 2060-3.
242. Katsiari, C.G., et al., *CD40L overexpression on T cells and monocytes from patients with systemic lupus erythematosus is resistant to calcineurin inhibition*. Lupus, 2002. 11(6): p. 370-8.
243. Quezada, S.A., et al., *CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 307-28.
244. Caux, C., et al., *Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking*. J Exp Med, 1994. 180(4): p. 1263-72.
245. Frleta, D., et al., *Distinctive maturation of in vitro versus in vivo anti-CD40 mAb-matured dendritic cells in mice*. J Immunother, 2003. 26(1): p. 72-84.
246. Mackey, M.F., et al., *Distinct contributions of different CD40 TRAF binding sites to CD154-induced dendritic cell maturation and IL-12 secretion*. Eur J Immunol, 2003. 33(3): p. 779-89.
247. Ouaz, F., et al., *Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits*. Immunity, 2002. 16(2): p. 257-70.
248. Miga, A.J., et al., *Dendritic cell longevity and T cell persistence is controlled by CD154-CD40 interactions*. Eur J Immunol, 2001. 31(3): p. 959-65.
249. Schulz, O., et al., *CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal*. Immunity, 2000. 13(4): p. 453-62.
250. Burkly, L.C., *CD40 pathway blockade as an approach to immunotherapy*. Adv Exp Med Biol, 2001. 489: p. 135-52.
251. Markees, T.G., et al., *Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand*. Transplantation, 1997. 64(2): p. 329-35.
252. Snijders, A., et al., *High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals*. Int Immunol, 1998. 10(11): p. 1593-8.
253. Napolitani, G., et al., *Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells*. Nat Immunol, 2005. 6(8): p. 769-76.

254. Warger, T., et al., *Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo*. *Blood*, 2006. 108(2): p. 544-50.
255. Re, F. and J.L. Strominger, *IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells*. *J Immunol*, 2004. 173(12): p. 7548-55.
256. Luft, T., et al., *Tuning the volume of the immune response: strength and persistence of stimulation determine migration and cytokine secretion of dendritic cells*. *Blood*, 2004. 104(4): p. 1066-74.
257. Kalinski, P., et al., *Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells*. *J Immunol*, 1999. 162(6): p. 3231-6.
258. Le Naour, F., et al., *Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics*. *J Biol Chem*, 2001. 276(21): p. 17920-31.
259. Hofer, S., et al., *Differential activation of NF-kappa B subunits in dendritic cells in response to Gram-negative bacteria and to lipopolysaccharide*. *Microbes Infect*, 2001. 3(4): p. 259-65.
260. Voigtlander, C., et al., *Dendritic cells matured with TNF can be further activated in vitro and after subcutaneous injection in vivo which converts their tolerogenicity into immunogenicity*. *J Immunother*, 2006. 29(4): p. 407-15.
261. Tureci, O., et al., *Cascades of transcriptional induction during dendritic cell maturation revealed by genome-wide expression analysis*. *Faseb J*, 2003. 17(8): p. 836-47.
262. Lutz, M.B. and G. Schuler, *Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?* *Trends Immunol*, 2002. 23(9): p. 445-9.
263. Cella, M., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia, *Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells*. *Curr Opin Immunol*, 1997. 9(1): p. 10-6.
264. Piqueras, B., et al., *Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors*. *Blood*, 2006. 107(7): p. 2613-8.
265. Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe, *The B7 family revisited*. *Annu Rev Immunol*, 2005. 23: p. 515-48.
266. Watts, T.H., *TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses*. *Annu Rev Immunol*, 2005. 23: p. 23-68.

267. Diehl, L., et al., *The role of CD40 in peripheral T cell tolerance and immunity.* J Mol Med, 2000. 78(7): p. 363-71.
268. Kapsenberg, M.L., *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization.* Nat Rev Immunol, 2003. 3(12): p. 984-93.
269. Pulendran, B., et al., *Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(3): p. 1036-41.
270. Ronchese, F., B. Hausmann, and G. Le Gros, *Interferon-gamma- and interleukin-4-producing T cells can be primed on dendritic cells in vivo and do not require the presence of B cells.* Eur J Immunol, 1994. 24(5): p. 1148-54.
271. Hilkens, C.M., et al., *Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype.* Blood, 1997. 90(5): p. 1920-6.
272. Pulendran, B., et al., *Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo.* J Immunol, 2001. 167(9): p. 5067-76.
273. Shortman, K. and W.R. Heath, *Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells.* Nat Immunol, 2001. 2(11): p. 988-9.
274. Moser, M., *Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions?* Immunity, 2003. 19(1): p. 5-8.
275. Steinman, R.M., *Some interfaces of dendritic cell biology.* Apmis, 2003. 111(7-8): p. 675-97.
276. Albert, M.L., M. Jegathesan, and R.B. Darnell, *Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells.* Nat Immunol, 2001. 2(11): p. 1010-7.
277. O'Garra, A. and P. Vieira, *Regulatory T cells and mechanisms of immune system control.* Nat Med, 2004. 10(8): p. 801-5.
278. Sporri, R. and C. Reis e Sousa, *Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function.* Nat Immunol, 2005. 6(2): p. 163-70.
279. Reis e Sousa, C., *Dendritic cells in a mature age.* Nat Rev Immunol, 2006. 6(6): p. 476-83.
280. Rogers, N.J. and R.I. Lechler, *Allorecognition.* Am J Transplant, 2001. 1(2): p. 97-102.
281. Morelli, A.E. and A.W. Thomson, *Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction.* Immunol Rev, 2003. 196: p. 125-46.
282. Herrera, O.B., et al., *A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells.* J Immunol, 2004. 173(8): p. 4828-37.

283. Sherman, L.A. and S. Chattopadhyay, *The molecular basis of allorecognition*. Annu Rev Immunol, 1993. 11: p. 385-402.
284. Fluck, N., et al., *Indirect allorecognition is involved in both acute and chronic allograft rejection*. Transplant Proc, 1999. 31(1-2): p. 842-3.
285. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 47-64.
286. Rock, K.L. and L. Shen, *Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance*. Immunol Rev, 2005. 207: p. 166-83.
287. Bedford, P., K. Garner, and S.C. Knight, *MHC class II molecules transferred between allogeneic dendritic cells stimulate primary mixed leukocyte reactions*. Int Immunol, 1999. 11(11): p. 1739-44.
288. Russo, V., et al., *Acquisition of intact allogeneic human leukocyte antigen molecules by human dendritic cells*. Blood, 2000. 95(11): p. 3473-7.
289. Zitvogel, L., et al., *Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes*. Nat Med, 1998. 4(5): p. 594-600.
290. Metcalfe, S.M. and F.M. Richards, *Cyclosporine, FK506, and rapamycin. Some effects on early activation events in serum-free, mitogen-stimulated mouse spleen cells*. Transplantation, 1990. 49(4): p. 798-802.
291. Dumont, F.J., et al., *Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin*. J Immunol, 1990. 144(1): p. 251-8.
292. Dumont, F.J., et al., *The immunosuppressive macrolides FK-506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells*. J Immunol, 1990. 144(4): p. 1418-24.
293. Furue, M. and Y. Ishibashi, *Differential regulation by dexamethasone and cyclosporine of human T cells activated by various stimuli*. Transplantation, 1991. 52(3): p. 522-6.
294. Kahan, B.D. and J.S. Camardo, *Rapamycin: clinical results and future opportunities*. Transplantation, 2001. 72(7): p. 1181-93.
295. Sigal, N.H. and F.J. Dumont, *Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction*. Annu Rev Immunol, 1992. 10: p. 519-60.
296. Allison, A.C., *Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward*. Immunopharmacology, 2000. 47(2-3): p. 63-83.
297. Yu, X., P. Carpenter, and C. Anasetti, *Advances in transplantation tolerance*. Lancet, 2001. 357(9272): p. 1959-63.



298. Dummer, J.S., et al., *Morbidity of cytomegalovirus infection in recipients of heart or heart-lung transplants who received cyclosporine*. J Infect Dis, 1985. 152(6): p. 1182-91.
299. Cockfield, S.M., et al., *Post-transplant lymphoproliferative disorder in renal allograft recipients. Clinical experience and risk factor analysis in a single center*. Transplantation, 1993. 56(1): p. 88-96.
300. Boubenider, S., et al., *Incidence and consequences of post-transplantation lymphoproliferative disorders*. J Nephrol, 1997. 10(3): p. 136-45.
301. Cacciarelli, T.V., et al., *Management of posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplant recipients receiving primary tacrolimus (FK506) therapy*. Transplantation, 1998. 66(8): p. 1047-52.
302. Lechler, R., W.F. Ng, and R.M. Steinman, *Dendritic cells in transplantation--friend or foe? Immunity*, 2001. 14(4): p. 357-68.
303. Lee, J.I., et al., *Cyclosporine A inhibits the expression of costimulatory molecules on in vitro-generated dendritic cells: association with reduced nuclear translocation of nuclear factor kappa B*. Transplantation, 1999. 68(9): p. 1255-63.
304. Woltman, A.M., et al., *The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells*. Eur J Immunol, 2000. 30(7): p. 1807-12.
305. Piemonti, L., et al., *Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation*. J Immunol, 1999. 162(11): p. 6473-81.
306. Manome, H., et al., *Dexamethasone and cyclosporin A affect the maturation of monocyte-derived dendritic cells differently*. Int Arch Allergy Immunol, 2000. 122(1): p. 76-84.
307. Rea, D., et al., *Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10*. Blood, 2000. 95(10): p. 3162-7.
308. Woltman, A.M., et al., *Rapamycin induces apoptosis in monocyte- and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages*. Blood, 2001. 98(1): p. 174-80.
309. Hackstein, H. and A.W. Thomson, *Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(1): p. 24-34.
310. Abe, M. and A.W. Thomson, *Influence of immunosuppressive drugs on dendritic cells*. Transpl Immunol, 2003. 11(3-4): p. 357-65.
311. Mazariegos, G.V., et al., *Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplant patients*. Am J Transplant, 2003. 3(6): p. 689-96.
312. Athanassopoulos, P., et al., *Peripheral blood dendritic cells in human end-stage heart failure and the early post-transplant period: evidence for*

- systemic Th1 immune responses*. Eur J Cardiothorac Surg, 2004. 25(4): p. 619-26.
313. Hesselink, D.A., et al., *The effects of renal transplantation on circulating dendritic cells*. Clin Exp Immunol, 2005. 140(2): p. 384-93.
314. Moser, M., et al., *Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo*. Eur J Immunol, 1995. 25(10): p. 2818-24.
315. Piemonti, L., et al., *Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells*. J Immunol, 2000. 164(9): p. 4443-51.
316. Penna, G. and L. Adorini, *1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation*. J Immunol, 2000. 164(5): p. 2405-11.
317. Griffin, M.D., et al., *Dendritic cell modulation by 1alpha,25 dihydroxyvitamin D3 and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(12): p. 6800-5.
318. Mehling, A., et al., *Mycophenolate mofetil impairs the maturation and function of murine dendritic cells*. J Immunol, 2000. 165(5): p. 2374-81.
319. Brazelton, T.R. and R.E. Morris, *Molecular mechanisms of action of new xenobiotic immunosuppressive drugs: tacrolimus (FK506), sirolimus (rapamycin), mycophenolate mofetil and leflunomide*. Curr Opin Immunol, 1996. 8(5): p. 710-20.
320. Matsue, H., et al., *Contrasting impacts of immunosuppressive agents (rapamycin, FK506, cyclosporin A, and dexamethasone) on bidirectional dendritic cell-T cell interaction during antigen presentation*. J Immunol, 2002. 169(7): p. 3555-64.
321. Lutz, M.B., et al., *Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo*. Eur J Immunol, 2000. 30(7): p. 1813-22.
322. Liu, J., et al., *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes*. Cell, 1991. 66(4): p. 807-15.
323. Ho, S., et al., *The mechanism of action of cyclosporin A and FK506*. Clin Immunol Immunopathol, 1996. 80(3 Pt 2): p. S40-5.
324. Kino, T., et al., *FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro*. J Antibiot (Tokyo), 1987. 40(9): p. 1256-65.
325. Lee, Y.R., et al., *Cyclosporin A and tacrolimus, but not rapamycin, inhibit MHC-restricted antigen presentation pathways in dendritic cells*. Blood, 2005. 105(10): p. 3951-5.

326. Bundick, R.V., R.I. Craggs, and E. Holness, *The effect of cyclosporin A, FK506, and rapamycin on the murine chronic graft-versus-host response--an in vivo model of Th2-like activity*. Clin Exp Immunol, 1995. 99(3): p. 467-72.
327. Warner, L.M., L.M. Adams, and S.N. Sehgal, *Rapamycin prolongs survival and arrests pathophysiologic changes in murine systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1994. 37(2): p. 289-97.
328. Hackstein, H., et al., *Rapamycin inhibits macropinocytosis and mannose receptor-mediated endocytosis by bone marrow-derived dendritic cells*. Blood, 2002. 100(3): p. 1084-7.
329. Monti, P., et al., *Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells*. Transplantation, 2003. 75(1): p. 137-45.
330. Hackstein, H., et al., *Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo*. Blood, 2003. 101(11): p. 4457-63.
331. Taner, T., et al., *Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce ag-specific T cell regulation and prolong graft survival*. Am J Transplant, 2005. 5(2): p. 228-36.
332. Abraham, R.T. and G.J. Wiederrecht, *Immunopharmacology of rapamycin*. Annu Rev Immunol, 1996. 14: p. 483-510.
333. Blaha, P., et al., *The influence of immunosuppressive drugs on tolerance induction through bone marrow transplantation with costimulation blockade*. Blood, 2003. 101(7): p. 2886-93.
334. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 685-711.
335. Finkelman, F.D., et al., *Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion*. J Immunol, 1996. 157(4): p. 1406-14.
336. Wu, L. and K. Shortman, *Heterogeneity of thymic dendritic cells*. Semin Immunol, 2005. 17(4): p. 304-12.
337. Goldrath, A.W. and S.M. Hedrick, *Central tolerance matters*. Immunity, 2005. 23(2): p. 113-4.
338. Watanabe, N., et al., *Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus*. Nature, 2005. 436(7054): p. 1181-5.
339. Hengartner, H., et al., *Deletion of self-reactive T cells before entry into the thymus medulla*. Nature, 1988. 336(6197): p. 388-90.
340. Bonasio, R., et al., *Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus*. Nat Immunol, 2006. 7(10): p. 1092-100.
341. Steinman, R.M., et al., *The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells*. J Exp Med, 2000. 191(3): p. 411-6.

342. Hawiger, D., et al., *Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo*. J Exp Med, 2001. 194(6): p. 769-79.
343. Dalgaard, J., et al., *Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human peripheral blood dendritic cell subsets*. J Leukoc Biol, 2005. 77(5): p. 689-98.
344. Rovere, P., et al., *Remnants of suicidal cells fostering systemic autoaggression. Apoptosis in the origin and maintenance of autoimmunity*. Arthritis Rheum, 2000. 43(8): p. 1663-72.
345. Yamazaki, S., et al., *Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells*. J Exp Med, 2003. 198(2): p. 235-47.
346. Manavalan, J.S., et al., *High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells*. Transpl Immunol, 2003. 11(3-4): p. 245-58.
347. Suci-Foca, N., et al., *Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells: review*. Int Immunopharmacol, 2005. 5(1): p. 7-11.
348. Akbari, O., et al., *Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity*. Nat Med, 2002. 8(9): p. 1024-32.
349. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. J Exp Med, 2000. 192(7): p. 1027-34.
350. de Heer, H.J., et al., *Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen*. J Exp Med, 2004. 200(1): p. 89-98.
351. Yoneyama, H., et al., *Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs*. J Exp Med, 2005. 202(3): p. 425-35.
352. Xu, D., et al., *Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells*. J Exp Med, 1998. 188(8): p. 1485-92.
353. Bofill, M., et al., *Differential expression of the cytokine receptors for human interleukin (IL)-12 and IL-18 on lymphocytes of both CD45RA and CD45RO phenotype from tonsils, cord and adult peripheral blood*. Clin Exp Immunol, 2004. 138(3): p. 460-5.
354. Matthews, N.C., et al., *Sustained expression of CD154 (CD40L) and proinflammatory cytokine production by alloantigen-stimulated umbilical cord blood T cells*. J Immunol, 2000. 164(12): p. 6206-12.
355. Buelens, C., et al., *Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells*. Eur J Immunol, 1995. 25(9): p. 2668-72.

356. Steinbrink, K., et al., *Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells*. J Immunol, 1997. 159(10): p. 4772-80.
357. Guba, S.C., et al., *Regulation of interleukin 3 gene induction in normal human T cells*. J Clin Invest, 1989. 84(6): p. 1701-6.
358. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*. Annu Rev Immunol, 1998. 16: p. 111-35.
359. Johnson, S., et al., *Selected Toll-like receptor ligands and viruses promote helper-independent cytotoxic T cell priming by upregulating CD40L on dendritic cells*. Immunity, 2009. 30(2): p. 218-27.
360. Pinchuk, L.M., et al., *Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation*. J Immunol, 1996. 157(10): p. 4363-70.
361. Kuwajima, S., et al., *Interleukin 15-dependent crosstalk between conventional and plasmacytoid dendritic cells is essential for CpG-induced immune activation*. Nat Immunol, 2006. 7(7): p. 740-6.
362. Rodriguez-Fernandez, J.L. and A.L. Corbi, *Adhesion molecules in human dendritic cells*. Curr Opin Investig Drugs, 2005. 6(11): p. 1103-11.
363. Richards, J., et al., *Integrated genomic and proteomic analysis of signaling pathways in dendritic cell differentiation and maturation*. Ann N Y Acad Sci, 2002. 975: p. 91-100.
364. Pereira, S.R., et al., *Changes in the proteomic profile during differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells stimulated with granulocyte macrophage colony stimulating factor/interleukin-4 and lipopolysaccharide*. Proteomics, 2005. 5(5): p. 1186-98.
365. Dietz, A.B., et al., *Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 275(3): p. 731-8.
366. Messmer, D., B. Messmer, and N. Chiorazzi, *The global transcriptional maturation program and stimuli-specific gene expression profiles of human myeloid dendritic cells*. Int Immunol, 2003. 15(4): p. 491-503.
367. Gundacker, N.C., et al., *Cytoplasmic proteome and secretome profiles of differently stimulated human dendritic cells*. J Proteome Res, 2009. 8(6): p. 2799-811.
368. Puig-Kroger, A., et al., *Maturation-dependent expression and function of the CD49d integrin on monocyte-derived human dendritic cells*. J Immunol, 2000. 165(8): p. 4338-45.
369. Watarai, H., et al., *Plasma membrane-focused proteomics: dramatic changes in surface expression during the maturation of human dendritic cells*. Proteomics, 2005. 5(15): p. 4001-11.

370. Hugues, S., et al., *Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity*. Nat Immunol, 2004. 5(12): p. 1235-42.
371. Montoya, M.C., et al., *Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs*. Nat Immunol, 2002. 3(2): p. 159-68.
372. Lebedeva, T., M.L. Dustin, and Y. Sykulev, *ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation*. Curr Opin Immunol, 2005. 17(3): p. 251-8.
373. Mittelbrunn, M., et al., *Imaging of plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells*. Blood, 2009. 113(1): p. 75-84.
374. Krug, A., et al., *Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells*. J Exp Med, 2003. 197(7): p. 899-906.
375. Lonial, S., et al., *Regulation of alloimmune responses by dendritic cell subsets*. Exp Hematol, 2008. 36(10): p. 1309-17.
376. Rogge, L., et al., *The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs*. J Immunol, 1998. 161(12): p. 6567-74.
377. Morelli, A.E., et al., *Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation*. Blood, 2001. 98(5): p. 1512-23.
378. Koch, F., et al., *High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10*. J Exp Med, 1996. 184(2): p. 741-6.
379. Tominaga, K., et al., *IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells*. Int Immunol, 2000. 12(2): p. 151-60.
380. Otani, T., et al., *Identification of IFN-gamma-producing cells in IL-12/IL-18-treated mice*. Cell Immunol, 1999. 198(2): p. 111-9.
381. Hunter, C.A., *New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions*. Nat Rev Immunol, 2005. 5(7): p. 521-31.
382. Kuniyoshi, J.S., et al., *Dendritic cell secretion of IL-15 is induced by recombinant huCD40LT and augments the stimulation of antigen-specific cytolytic T cells*. Cell Immunol, 1999. 193(1): p. 48-58.
383. Jonuleit, H., et al., *Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells*. J Immunol, 1997. 158(6): p. 2610-5.
384. Mattei, F., et al., *IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation*. J Immunol, 2001. 167(3): p. 1179-87.
385. Aste-Amezaga, M., et al., *Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10*. J Immunol, 1998. 160(12): p. 5936-44.

386. Wirtz, S., et al., *EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation*. J Immunol, 2005. 174(5): p. 2814-24.
387. Paliard, X., et al., *Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones*. J Immunol, 1988. 141(3): p. 849-55.
388. Kronin, V., D. Vremec, and K. Shortman, *Does the IL-2 receptor alpha chain induced on dendritic cells have a biological function?* Int Immunol, 1998. 10(2): p. 237-40.
389. Sanarico, N., et al., *Human monocyte-derived dendritic cells differentiated in the presence of IL-2 produce proinflammatory cytokines and prime Th1 immune response*. J Leukoc Biol, 2006. 80(3): p. 555-62.
390. Mnasria, K., et al., *Anti-CD25 antibodies affect cytokine synthesis pattern of human dendritic cells and decrease their ability to prime allogeneic CD4+ T cells*. J Leukoc Biol, 2008. 84(2): p. 460-7.
391. Panelli, M.C., et al., *Gene-expression profiling of the response of peripheral blood mononuclear cells and melanoma metastases to systemic IL-2 administration*. Genome Biol, 2002. 3(7): p. RESEARCH0035.
392. Whittington, R. and D. Faulds, *Interleukin-2. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in patients with cancer*. Drugs, 1993. 46(3): p. 446-514.
393. Piscitelli, S.C., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of subcutaneous interleukin-2 in HIV-infected patients*. Pharmacotherapy, 1996. 16(5): p. 754-9.
394. Rossi, L., et al., *Inflammatory protein profile during systemic high dose interleukin-2 administration*. Proteomics, 2006. 6(2): p. 709-20.
395. Deehan, D.J., et al., *In vivo cytokine production and recombinant interleukin 2 immunotherapy: an insight into the possible mechanisms underlying clinical responses*. Br J Cancer, 1994. 69(6): p. 1130-5.
396. Panelli, M.C., et al., *Forecasting the cytokine storm following systemic interleukin (IL)-2 administration*. J Transl Med, 2004. 2(1): p. 17.
397. Spanknebel, K., et al., *Initial clinical response predicts outcome and is associated with dose schedule in metastatic melanoma and renal cell carcinoma patients treated with high-dose interleukin 2*. Ann Surg Oncol, 2005. 12(5): p. 381-90.
398. Beadling, C. and K.A. Smith, *DNA array analysis of interleukin-2-regulated immediate/early genes*. Med Immunol, 2002. 1(1): p. 2.
399. Kovanen, P.E., et al., *Global analysis of IL-2 target genes: identification of chromosomal clusters of expressed genes*. Int Immunol, 2005. 17(8): p. 1009-21.

400. Driesen, J., A. Popov, and J.L. Schultze, *CD25 as an immune regulatory molecule expressed on myeloid dendritic cells*. Immunobiology, 2008. 213(9-10): p. 849-58.
401. Mnasria, K., et al., *Anti CD25 treatment of human dendritic cells modulates both their cytokine synthesis profiles and their capacity to activate allogeneic CD4 T cells: a potential tolerogenic effect*. Int Immunopharmacol, 2008. 8(3): p. 414-22.
402. Mnasria, K., et al., *Anti-CD25 antibodies decrease the ability of human dendritic cells to prime allogeneic CD4 T cells*. Transplant Proc, 2009. 41(2): p. 695-7.
403. Steppan, S., et al., *Reduced secondary cytokine induction by BAY 50-4798, a high-affinity receptor-specific interleukin-2 analog*. J Interferon Cytokine Res, 2006. 26(3): p. 171-8.
404. Steppan, S., et al., *Genome wide expression profiling of human peripheral blood mononuclear cells stimulated with BAY 50-4798, a novel T cell selective interleukin-2 analog*. J Immunother, 2007. 30(2): p. 150-68.
405. Fierro, A., et al., *Dendritic cells and the mode of action of anticalcineurinic drugs: an integrating hypothesis*. Nephrol Dial Transplant, 2003. 18(3): p. 467-8; discussion 469-70.
406. Barten, M.J., et al., *Affects of immunosuppression on circulating dendritic cells: an adjunct to therapeutic drug monitoring after heart transplantation*. Int Immunopharmacol, 2006. 6(13-14): p. 2011-7.
407. Querec, T., et al., *Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity*. J Exp Med, 2006. 203(2): p. 413-24.
408. Pulendran, B., *Division of labor and cooperation between dendritic cells*. Nat Immunol, 2006. 7(7): p. 699-700.
409. Allan, R.S., et al., *Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming*. Immunity, 2006. 25(1): p. 153-62.
410. Megjugorac, N.J., et al., *Image-based study of interferogenic interactions between plasmacytoid dendritic cells and HSV-infected monocyte-derived*
411. Lou, Y., et al., *Plasmacytoid dendritic cells synergize with myeloid dendritic cells in the induction of antigen-specific antitumor immune responses*. J Immunol, 2007. 178(3): p. 1534-41.
412. Allenspach, E.J., et al., *Migratory and lymphoid-resident dendritic cells cooperate to efficiently prime naive CD4 T cells*. Immunity, 2008. 29(5): p. 795-806.



413. Piccioli, D., et al., *Human plasmacytoid dendritic cells are unresponsive to bacterial stimulation and require a novel type of cooperation with myeloid dendritic cells for maturation*. *Blood*, 2009. 113(18): p. 4232-9.
414. Yoneyama, H., et al., *Pivotal role of dendritic cell-derived CXCL10 in the retention of T helper cell 1 lymphocytes in secondary lymph nodes*. *J Exp Med*, 2002. 195(10): p. 1257-66.





PUBLICACIONES



## PUBLICACIONES

Publicaciones resultantes de la etapa predoctoral:

AUTORES (p.o. de firma) : N. Izquierdo\*, M. Naranjo\*, M.A Hernández, J. Cos, L. Massuet, J. Martínez-Picado, F.E Borràs (\*: first authorship shared)  
TITULO: " Leukocyte Reduction Filters: an alternative source of Peripheral Blood Mononuclears Cells"  
REVISTA/LIBRO: Inmunología Vol.: 22 Pag.: 255-262 (Jul-Sep., 2003).

AUTORES (p.o. de firma) : M. Bofill, Erola Almirall, ArthurMcQuaid, Ruth Peña, Raul Ruiz Hernández, Mar Naranjo, Ruiz Lidia, Bonaventura Clotet, Francesc E. Borràs Serres  
TITULO: " Differential expression of the cytokine receptors for human interleukin (IL)-12 and IL-18 on lymphocytes of both CD45RA+ and CD45RO+ phenotype from tonsils, cord and adult peripheral blood"  
REVISTA/LIBRO: Clinical Experimental Immunology Vol: 138 Pag: 460-465 (24 Sep., 2004). PMID: 15544623

AUTORES (p.o. de firma) : M. Naranjo-Gómez, M.A. Fernández, M. Bofill, R. Singh, C.V. Navarrete, R. Pujol-Borrell and F.E. Borràs  
TITULO: "Primary Alloproliferative Th1 Response Induced by Immature Plasmacytoid Dendritic Cells in Collaboration with Myeloid DCs"  
REVISTA/LIBRO: American Journal of Transplantation Vol.: 5 Pag.: 2838-2848 (11 Aug., 2005). PMID: 16302996

AUTORES (p.o. de firma) : Naranjo-Gómez M., Climent N., Harold O., Bofill M., Gatell J., Gallart T., Pujol-Borrell R., Borràs FE.  
TITULO: "Tacrolimus treatment of Plasmacytoid Dendritic Cells inhibits CpG-induced TNF alpha secretion"  
REVISTA/LIBRO: Immunology Vol.: 119(4) Pag:488-98 (2006 Dec). PMID: 16930148

AUTORES (p.o. de firma) : Dominguez-Soto A, Aragonese-Fenoll L, Martin-Gayo E, Martinez-Prats L, Colmenares M, Naranjo-Gomez M., Borràs FE, Munoz P, Zubiara M, Toribio ML, Delgado R, Corbi AL.  
TITULO: "The DC-SIGN-related lectin LSECtin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells".  
REVISTA/LIBRO: Blood. 2007 Jun 15;109(12):5337-45. PMID: 17339424

AUTORES (p.o. de firma) : Izquierdo-Useros N, Blanco J, Erkizia I, Fernandez-Figueras MT, Borràs FE, Naranjo-Gomez M., Bofill M, Ruiz L, Clotet B, Martínez-Picado J.  
TITULO: "Maturation of Blood Derived Dendritic Cells Enhances HIV-1 Capture and Transmission".  
REVISTA/LIBRO: Journal of Virology, July 2007, p. 7559-7570. PMID: 17475656

AUTORES (p.o. de firma) : Mar Naranjo-Gómez, Harold Oliva, Nuria Climent, Marco A. Fernández, Marta Ruiz-Riol, Margarita Bofill, José M. Gatell, Teresa Gallart, Ricardo Pujol-Borrell and Francesc E. Borràs  
TITULO: "Expression and function of the IL-2 receptor in activated human plasmacytoid dendritic cells".  
REVISTA/LIBRO: Eur. J. Immunol. 2007. 37: 1764-1772. PMID: 17523134

AUTORES (p.o. de firma) : Begoña Pérez-Cabezas, Mar Naranjo-Gómez, Marco A. Fernández, Juan R. Grífols, Ricardo Pujol-Borrell, Francesc E. Borràs  
TITULO: "Reduced numbers of plasmacytoid dendritic cells in aged blood donors".  
REVISTA/LIBRO: Experimental Gerontology 42 (2007) 1033-1038. PMID: 17606348

AUTORES (p.o. de firma) : Izquierdo-Useros N\*, Naranjo-Gómez M\*, Archer J, Hatch SC, Erkizia I, Blanco J, Borràs FE, Puertas MC, Connor JH, Fernández-Figueras MT, Moore L, Clotet B, Gummuluru S, Martinez-Picado J. (\*: first authorship shared)  
TITULO: "Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway"  
REVISTA/LIBRO: Blood, 2009 Mar 19;113(12):2732-41. PMID: 18945959



# AGRADECIMIENTOS





## AGRADECIMIENTOS

Hay tanto por lo que tengo que agradecer..... que no sé ni por dónde empezar. Pues, por dónde, por el principio.

Al Dr. Ricardo Pujol-Borrell, por brindarme la posibilidad de escribir este capítulo de mi vida. Por permitir el inicio y desarrollo de este gran reto profesional y personal. Por las críticas constructivas y por su conocimiento científico.

*A tu Francesc, perquè de tu ho he après TOT. No sé si tindrè paraules suficients per agrair-te TOT el que has fet i continues lliutant. Primerament, per oferir-me l'oportunitat d'emprende junts aquest gran viatge. Gràcies a la Neus Ruiz, la Marta Cabezón i la Sònia Borrell per pensar en mi i fer-me conèixer la possibilitat d'aquesta gran oportunitat. Perquè malgrat alguns errors, has seguit confiant en mi. Per la teva paciència. Pel teu ENTUSIASME i IL·LUSIÓ i perquè m'has ensenyat les claus d'aquesta professió. Per poder parlar amb tu. Per la teva capacitat i eficiència, em desbordes!!! També m'has ensenyat valors tan importants a la vida com la humilitat i l'elegància. A les dones de la teva vida, a la Laura i la Carlota. Ja saps com penso i el que em costen les paraules, jo sóc més de fets: espero haver estat a l'alçada!!!*

Me gustaría mencionar a todos los compañeros que he tenido y que de cada uno de ellos he aprendido lo mejor. Por todos los "maestrillos" (lo de maestrillo, por el dicho: "cada maestrillo con su librillo") porque sois grandes sabios. Porque me habéis enseñado mucho, he aprendido lo que no está escrito. Y eso, en definitiva, es lo que cuenta.

*A la súper Rose (Faner), la primera persona que vaig conèixer en el lab. Per tots els moments (sobretot, en la campana de fluxe laminar), per la teva disposició a explicar conceptes de bio molecular i també el teu assessorament i logística en els temes informàtics.*

*Per descomptat, al grup "dels ratolins". Me acogisteis como una más, sentí formar parte de esta gran Familia. Al Jorge, por todo su conocimiento y por transmitir esas ganas de trabajar. Por demostrarme la importancia de la lectura de trabajos científicos. Inculcándome el valor que tiene el trabajo bibliográfico y la cultura del esfuerzo (Ésa, que en los tiempos que corren, está en peligro de extinción). Porque has sabido subirme cuando he estado a bajo. A Mari Carmen, "per ser tan formigueta". Porque aunque no sea así el dicho "por tu poco ruido y muchas nueces", por la discreción que te caracteriza; tú sí que eres "apañá". A la Raquel, pel teu "buen hacer" y el teu "saber estar". M'has transmès pau i serenitat (tot i confesar-me que en algunes ocasions eres un sac de nervis). Per la teva comprensió i per aquelles xerradetes que hem mantingut, gràcies pel recolzament. A Rosa, por enseñarme que a pesar de lo dura que pueda ser la vida siempre tienes una sonrisa. También a tus "niños", Juan y Guillem; así como a tu hermana Begoña. Y como no, a aquellos que han emprendido nuevos caminos: Auro, como no mencionar a Aurora, por descubrirme *Muchachito Bombo Infierno*. He pasado tan buenos momentos..... has amenizado tantas veladas: tus sesiones karaoke (navidad 2003), show-woman (navidad 2005), París 2006 (también amb la Raquel), la Vall de Vianya y ..... un largo etcétera. Pero tampoco olvido tu ayuda incondicional en trabajos de los cuales la experiencia de una experta en modelos murinos era imprescindible (te acuerdas?). Als Xavis, Pastor i Clemente. A las "nuevas" generaciones: J. Carrascal, Silvia e Irma. Ese aire fresco que te ayuda a mantener la ilusión del primer día.*

*Y a los capitanes de este Gran grupo. A la Dra. Marta Vives, pels seus consells. Ella millor que ningú m'ha ensenyat a relativitzar i a tenir present que és el més important. Pels mails de suport en moments durs. I per la seva frase marca enregistrada: "que tope!!!". També al Dr. Joan Verdaguer, un clar exemple de superació.*

A la experiencia de los más veteranos, Pilar, Roger, M<sup>a</sup> Jesús y Lidia. Al ala oeste del laboratorio: Edurne y Marta Ruiz. Edurne por tu empeño y perseverancia. A ti Marta, por tu energía, trabajo y disciplina (*tititiriri riririri.....*). Gracias por ser "tan flamenca". También a aquellos que encontrándose lejos de su país se sintieron como en casa y aportaron su granito de arena: Kolko y a la familia brasileña Cristina, Luciano y Henrique.

A las chicas; sí, sí a vosotras: Marga (por tu trabajo e implicación), Silvia (*la meva cirereta. Per preocupar-te sempre per saber com estic*), Olga (*de tu he après l'organització en el treball*), Pepi (*per la teva eficiència*) y Yolanda (por resolver mis dudas). Por vuestro compañerismo y solidaridad. También a la nueva fusión: Justi, Albert, Cris y Eva. A todos vosotros: Álex, Laura, Amanda y Aroa. *Ha estat un plaer.*

A Marco, cuánto debo agradecerte!!! Sin tu trabajo, el mío no hubiera sido posible (mi segunda mitad). Por los centenares de sortings realizados. Por esa lucha de conseguir siempre un poco más y mejor. Por tu disposición y voluntad. Por tu diplomacia y saber estar. Porque has sabido mantener la ilusión. También a Gerard y a la súper unidad de citometría.

A la nueva generación DC TEAM. *A la Bego, per la seva seguretat i tenir tan clar el que vol. Per agafar les "noves riendas" i organitzar-se com ningú.* A la Patry, por enfrentarse a nuevos retos. *A la Dàlia per la seva capacitat de treball. Com ja t'he dit en més d'una ocasió: no tinc paraules (de debò, que no les tinc). També per mantenir-me al dia en els moments en els que no he pogut estar, fent-me sentir ENCARA viva. Per saber escoltar i per voler millorar cada dia.*

A la gente de Irsi. Sí, Nuria, por tu exigencia personal y el cuidar tanto los detalles. Por algunas sesiones maratonianas en P3. Me has enseñado a disfrutar al máximo esta profesión y como en más de una ocasión has comentado: otra Ciencia es posible. A Itziar, por su voluntad y disponibilidad, nunca tiene un NO por respuesta. A M<sup>a</sup> Teresa, Judith, M<sup>a</sup> José y Gerard. Al Dr. Javier Martínez-Picado, por su contribución científica de tan alto nivel. Al Dr. Julià Blanco *per aportar nous punts de vista. Per fer palesa la importància d'equips multidisciplinars.* A la Dra. Marga Bofill, *per l'eterna col·laboració.* A la Ruth Peña, Gemma Coma i Raúl. De todos he aprendido un sinfín de cosas.

A todos los que han hecho posible las magníficas colaboraciones. Al Joan Cos i la Laura Ocaña. *A la Teresa Gallart per la seva saviesa i a tot el seu equip*, tampoco os olvido Harold y Núria Climent. Al Dr. Àngel Corbí. A todos de corazón, muchas gracias.

*Al Dr. Manel Juan, pel teu suport incondicional. Per que tu, millor que ningú, ha sapigut transmetre'm aquest amor per la Ciència. Per la teva dedicació en el treball. Pels savis consells.*

A la Dra. María José Herrero por todas las sesiones matutinas; esto sí que es empezar bien el día. A la Dra. Eva Martínez-Cáceres por luchar porque las cosas salgan bien y al Dr. Eduard Palou por estar dispuesto a echar siempre un cable. Gracias por formar un gran equipo.

A los residentes de la Unidad (Fran, Estíbaliz, Iñaki y Ana) y de otros servicios.

Agradecer al equipo de Neurología, en especial a la Dra. Cristina Ramo y Laia Grau, ese ímpetu para iniciar un gran reto. Un proyecto nuevo lleno de motivaciones y satisfacciones.

A compañeros y amigos de otras líneas de investigación: a l'Anna Martínez i l'Eva; al Pedro y todos los de Onco, a la Sònia y la Marian; al grup del Dr. Mañé, a la Eli Pedrosa i la Vio. Al grup d'en Pere-Joan i la Isabel: Olga, Cris, Evelyn y Neus. A la Teresa Gasull i la Jovita.

Al grupo de la Autònoma: a la Dra. Dolores Jaraquemada, Mercè Martí, Manuela, Inaki, Pepe.... no quisiera dejarme a nadie. *També a l'Albert Guirao, Ernesto Castaño i Carlota Sanromà pel suport en temes burocràtics.*

A todos los que he encontrado por el Camino dando a conocer a nivel internacional la Inmunología española. Por el intercambio de conocimientos y experiencias compartidas: María Mittelbrunn, Dr. Carlos Ardavín, Ana Urzainqui, Dra. Elena y a Marta, al entusiasmo de la Dra. María Montoya.

A la Dra. Laurence Zitvogel, por aceptar mi estancia en su laboratorio (Institut Gustave Roussy, Francia). En especial, a la Dra. Nathalie Chaput por mostrarme algunos de los secretos del mundo de los exosomas y así aprender cantidad de cosas, aquéllas que no están escritas en los libros. A ti, Sophie Viaud por tu amabilidad y porque fuiste la artífice de todo mi aprendizaje. Por tu apoyo y la buena relación que mantenemos. Porque a pesar de ser una estancia breve fue muy intensa. También a Carla Ortiz y José-Miguel, lo hicieron todo más fácil. Y a todos los que conocí en el Cole de la Cité (Pascual, Diego, Marina, Esti, Ana, Pato...).

Continuando con lo estrictamente científico, a toda la gente de los distintos servicios del Hospital: Farmacia, Bioquímica, Hematología (Dr. Jordi Juncà y José-Tomás Navarro), Unidad de Esterilización, Radioterapia, en especial al Dr. Juan Cardenal y a Ernest, por su colaboración en la irradiación de células.

Todos habéis hecho que ESTO fuera posible.

Pero no puedo quedarme aquí. Siento la necesidad de plasmar por escrito ese sentimiento de agradecimiento al eje central de mi vida: el ámbito personal y familiar; por TODO los que hacéis por mí.

*A tot un equip clínic. En especial, a la Dra. Montse Batlle (per escoltar-me en tot moment) i la Susana Vives (por su profesionalismo). Per entendre'm tal i com jo sóc. Per saber-me donar en cada moment el que necessitava. També a la Miriam i al Xavi Grau. Así como a la Dra. Planas, por mostrar tanto interés.*

A la familia Rojo-Pérez. A ti Ana, porque nunca dejas de sorprenderme. Por tu afán de creer que otro MUNDO es posible. Porque a pesar de los kilómetros de distancia, te he sentido muy cerca. Por estar en todo momento. *A la familia Pérez-Simó. A tu, Gemma, per les teves virtuds, comprensió i el teu respecte. Per fer-me riure, pels moments de distensió viscuts juntament amb la Noe. A la teva mare, Nati, perquè és la Sol-lidaritat en Persona. Perquè ha trobat moments per donar suport a la family, perquè quan els meus estan bé, joestic bé.* A la familia Barranco-García. A la Natalia y el Ricky, por ser un reflejo de tanto amor. Porque me habéis demostrado que los valores tradicionales no están reñidos con una visión progresista de la vida. A tus hermanos y a tu madre, por el apoyo moral. A todos vosotros, por compartir toda una vida.

*A la Sara i l'Anna Rovira. Perquè sou molt més que companyes de Facultat. A la Sara, per la seva empatia i a l'Anna pel seu optimisme i l'alegria que la caracteritza. Per fer de Masnou, el meu poble d'acollida. Per tots els moments compartits, que en són molts.*

*A la familia Fanlo-Torrecilla. A tu Maria, per la sensibilitat. Perquè has estat font de coneixement de móns totalment desconeguts per a mi. Per tots els teus recursos personals i la teva visió del Món i la Vida. Perquè ets un mirall on reflexar-me. Perquè sempre ens quedarà Dahab. Als teus avis, els més savis. Als teus pares, Manel i Montse. Als teus germans, Balú, Iván (també la Mimi) i el Rubi (el gran Rubén, tot i ser el petit de la casa). Gràcies per viure els Colors blanc-i-blaus com els viviu, per transmetre el valor de la fidelitat i la identitat. Gràcies per fer-me sentir una més de la família.*

*A la Berta, per haver plasmat gràficament el que volia transmetre amb la portada d'aquesta tesis.*

*A la Gemma Fernández, per ensenyar-me el proverbi "si caus set vegades, aixeca-te'n vuit" que tantes vegades m'ha servit en el terreny laboral i personal. A la Meri, per totes les vetllades, per lo bé que ho hem passat plegades. A l'Anna Ventura, per saber escoltar i a l'Eva Blanco.*

*A l'Àngela i a en Jordi. Al nen, l'Isaac. Al Jose i al Marc. A tots els amics de Masnou-Allella-Teià.*

Y como no, a la familia. A esa gran familia de la que estoy más que orgullosa.

A mi familia extremeña. Por intentar sobrellevar los golpes duros que la vida nos ha puesto en mitad del sendero.

A mi familia conquense. A mis tíos, Pili y Pedro. También a mi tío Dioni, por todo su cariño y por ser el vivo ejemplo, que si uno trabaja duro en la vida, todo es posible. Y a mi tía Celia por estar SIEMPRE y poder compartir uno de los momentos más duros de mi vida. A mis primas, Raquel y Marta, porque son un amor: me siento tan querida!!!

Y a quienes más que agradecerles, les dedico este trabajo, por su apoyo y por su ejemplo de comprensión: a mis padres y hermano. Porque no me queda vida para devolverles TODO lo que han hecho y hacen por mí.

Tete, por armarte de paciencia conmigo. Por dejarme "expansionar" cuando más lo he necesitado. Porque aunque tú no lo creas, eres también un gran maestro.

Mami, y a ti..... porque madre no hay más que una, por ser tan buena madre. Seguro que hay muchas madres buenas pero ninguna mejor que la mía.

Por todos los grandes valores que me has transmitido y de los cuales he aprendido. Ésos que me están sirviendo para superar los caminos escarpados que tiene la vida:

sacrificio, valor al que muchos, sabemos que no están dispuestos

humildad y educación

fuerza, coraje y valentía

por tener muy claro tus prioridades: los de casa, SOMOS los primeros

por tu sentido de amistad, por cuidar a l@s que te cuidan: a la Pili por su comprensión y saber estar en todo momento; a la Conchi, porque para ti ha sido más que un gran apoyo y a la Marga por sus consejos. A Javier y a Dámaris, por preocuparse de nosotros. A la Fina y Mari Díaz, por estar a nuestro lado. Y a todos los que forman esa Gran Familia, Col·legi Sant Andreu de Natzaret.

Un montón de cualidades que nos has inculcado desde pequeños y que hacen que sea como soy porque está claro que eres el mejor modelo a seguir.

Y que decir de mi padre. Del que he aprendido mucho en los dos últimos años y medio. Porque me enseñaste, con creces, cómo superarme. Pero es más, desde AHÍ donde sé que estás, sigues mostrándome el Camino.

Y pese a todas las circunstancias, como canta Freddy Mercurie en "show must go on", La Vida continúa.



