

# INDUCCIÓN DE RESPUESTA INMUNE PRIMARIA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS DE RATA.

Manuel de la Mata, Silvia G. Correa, Clelia M. Riera, Pablo Iribarren \*

Inmunología. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas.  
Universidad Nacional de Córdoba.

## Resumen

En el presente trabajo se generaron células dendríticas (DC) a partir de precursores de médula ósea de ratas en presencia de GM-CSF e IL-4. Bajo estas condiciones experimentales obtuvimos gran número de DC maduras con típica morfología dendrítica y con elevada expresión de moléculas MHC clase II. También se aislaron DC de bazo de ratas mediante una técnica basada en propiedades características de estas células. La pureza de las DC fue superior al 90 % de acuerdo a la morfología y la expresión de moléculas MHC clase II. Posteriormente se estudió la capacidad de inducir respuesta inmune primaria contra ovoalbúmina (OVA) de DC derivadas de médula ósea, DC esplénicas inmaduras y DC esplénicas cultivadas 24h en presencia de GM-CSF (maduras), incubadas con OVA. Tanto las DC de bazo como las de médula ósea fueron capaces de inducir respuestas de hipersensibilidad tipo demorada (DTH) positivas. Las DC maduras de bazo mostraron una capacidad de inducir respuesta inmune primaria mayor que las DC inmaduras, ya que mostraron valores más altos de DTH ( $p < 0,05$ ). Esta diferencia correlacionó con una mayor expresión de moléculas del MHC clase II por parte de las DC maduras

**Palabras claves:** células dendríticas, rata, inmunidad, tolerancia.

## Abstract

In this work we generated dendritic cells (DC) from rat bone marrow cultures stimulated with GM-CSF and IL-4. After 10 days of culture, we obtained numerous mature DC showing morphological characteristics of DC and high levels of MHC class II molecules. Also, we isolated DC from rat spleen on the bases of their differential adherence and low-

density properties. The purity of these cells was  $> 90 \%$  according to morphology and MHC class II expression. To evaluate the capacity of bone marrow DC, immature spleen DC or spleen DC cultured 24h with GM-CSF (mature spleen DC), to elicit an immune response to ovalbumin (OVA), DC were loaded with this antigen and transferred to normal rats. Both bone marrow and spleen DC induced delayed type hypersensitivity responses (DTH). However, mature DC from spleen induced a stronger immune response against OVA with the highest DTH values ( $p < 0,05$ ). These differences in the induction of the immune response correlated with higher expression of MHC class II molecules on mature DC.

**Key words:** dendritic cells, rats, immunity, tolerance.

## Introducción

En 1868 Langerhans describió por primera vez células con morfología dendrítica en la piel y en 1973, Steinman y Cohn identificaron células dendríticas (DC) en bazo de ratones, y realizaron experimentos que asociaron a estas células con una fuerte actividad estimuladora de la respuesta inmune primaria (1).

Las DC se encuentran universalmente distribuidas en el organismo pero su número con relación a las demás células es muy escaso, llegando en la mayoría de los casos a una proporción entre 0,1 y 1 % de las células totales (2).

A pesar de su escaso número las DC son las células presentadoras de antígeno más potentes, con una capacidad casi exclusiva de activar linfocitos T vírgenes (3).

Esta capacidad funcional estaría relacio-

nada con una elevada expresión constitutiva de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, y de las moléculas CD80, CD86 y CD40, las cuales son fundamentales en la presentación antigénica para los linfocitos T (2, 3).

Uno de los conceptos más importantes en la inmunobiología de las DC es que, en los tejidos periféricos ellas existen como células *inmaduras* (con alta capacidad endocítica y de procesamiento antigénico) y que luego de un estímulo apropiado inician el proceso de *maduración* (desarrollo de una alta capacidad estimuladora) que aseguraría la coordinación temporal y espacial de la inducción de la respuesta inmune primaria (3, 4). Sin embargo, en distintos sistemas experimentales se ha observado que las DC participan de los mecanismos de tolerancia central y periférica (5). En la actualidad se ha intentado asociar distintas características de la DC, tales como estado de maduración, subpoblaciones, etc., con la capacidad diferencial de inducción de inmunidad o tolerancia (5, 6). No obstante, todavía no están bien definidas las características apropiadas de las DC para la inducción de inmunidad o tolerancia cuando se las administra *in vivo* (7).

En este trabajo aislamos DC esplénicas de rata y obtuvimos mediante cultivos de médula ósea DC mieloides con el objeto de comparar sus capacidades de inducción de la respuesta inmune primaria.

## Materiales y Métodos

### Animales

Se trabajó con ratas Wistar exocriadas de ambos sexos, de 2-3 meses de edad.

Los estudios se hicieron a partir de bazo y médula ósea.

### Células dendríticas de médula ósea

Se obtuvieron DC mediante cultivos de médula ósea de 9 a 11 días de duración en presencia de Factor Estimulador de Colonias Granulocito-Macrofágicas recombinante de ratón (rGM-CSF, Sigma) e Interleuquina-4 recombinante de rata (IL-4, Biosource International) (8).

Se realizó el seguimiento de los cultivos por microscopía de contraste de fase y por microscopía de los preparados por citocentrífuga. Adicionalmente se realizó microscopía electrónica de transmisión.

### Células dendríticas de bazo

Los animales dadores fueron sacrificados por dislocación cervical. El procedimiento fue adaptado del realizado por Correa y col. (9). Se aislaron DC esplénicas combinando digestión con colagenasa B (Boehringer Mannheim), adherencia diferencial al poliestireno durante 16 h y centrifugación en un gradiente de metrizamida (Sigma).

Opcionalmente las DC obtenidas se cultivaron durante 24 h a 37° C en presencia de GM-CSF. Se denominó DC *maduras* a las células cultivadas por 24 h extra, e *inmaduras* a las que no fueron cultivadas. Se realizó el seguimiento de los cultivos por microscopía de contraste de fase y por microscopía de los preparados hechos con citocentrífuga. Adicionalmente se realizó microscopía electrónica de transmisión.

### Estudios fenotípicos.

Con las DC obtenidas, se realizó inmunofluorescencia directa con el anticuerpo monoclonal OX-6 anti-MHC clase II conjugado a FITC (Serotec) y medición en un citómetro de flujo Cytoron Absolute (Ortho Diagnostic System). Además se realizó inmunoperoxidasa en preparados de citocentrífuga con el anticuerpo monoclonal OX-6 (Serotec) y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa. La reacción se realizó con diaminobencidina (DAB) (Sigma).

### Inducción de respuesta inmune primaria

Tanto las DC purificadas de bazo como las obtenidas de médula ósea, fueron incubadas por 3 horas a 37° C con el antígeno ovoalbúmina (OVA) a una concentración de 20 µg/ml. Las DC fueron lavadas dos veces con PBS e inyectadas por vía intradérmica en las patas posteriores de ratas singeneicas en un volumen de 50-100 µl conteniendo 3 x 10<sup>5</sup> células en cada pata, de acuerdo con el procedimiento descrito por Inaba y col. (10). Como

control positivo, algunas ratas fueron inmunizadas en forma intradérmica con 5 mg de OVA emulsificada en coadyuvante de Freund completo (CFA, Sigma). La prueba de hipersensibilidad de tipo demorada (DTH) se realizó 6 días posteriores a la inducción de la respuesta inmune primaria. El control negativo se realizó estudiando la respuesta de DTH en ratas normales.

### Prueba cutánea de hipersensibilidad de tipo demorada

La técnica se realizó inyectando 100  $\mu$ l de OVA (1mg/ml en PBS) en la pata posterior izquierda. La hinchazón plantar se evaluó a las 24 horas después de la inyección del antígeno y se midió con un calibre. El resultado de la prueba se obtuvo utilizando la siguiente fórmula:  $C = Z \times 10$ , donde Z es la diferencia en mm entre las medidas de la pata izquierda antes y después de la inyección del antígeno. La prueba fue considerada positiva con un valor de C igual o mayor a 3 (9).

### Estudios estadísticos

Se calcularon desviaciones estándar en la media. Las diferencias significativas entre los valores de problemas y los controles se establecieron mediante el test de Student. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados significativos.

### Resultados

En este trabajo obtuvimos DC derivadas de médula ósea de linaje mielóide por medio de cultivos de médula ósea de rata en presencia de GM-CSF e IL-4 de acuerdo al procedimiento de Talmor y col. (8). Bajo estas condiciones experimentales obtuvimos gran número de DC maduras con típica morfología dendrítica y con elevada expresión de moléculas MHC clase II (Figura 1A y C).

Por otro lado, aislamos DC esplénicas en base a sus propiedades de adherencia diferencial y baja densidad. La pureza de las DC fue superior al 90 % de acuerdo a la morfología y la expresión de MHC clase II (Figura 1B y D).

Estudios de microscopía electrónica de transmisión revelaron detalles ultraestructurales típicos de DC como por ejemplo su bajo contenido de lisosomas y abundante citoplasma con prolongaciones dendríticas de la membrana (Figura 1E).

Posteriormente se inyectaron ratas normales con DC incubadas con OVA. La respuesta de DTH fue medida 6 días después de la inyección. En los animales inmunizados con OVA se obtuvo una respuesta de DTH positiva (datos no presentados). Tanto las DC de bazo como las de médula ósea fueron capaces de inducir DTH positivas ( $p$  vs. control negativo  $< 0,01$ ) (Fig. 2). Sin embargo, la respuesta inmune primaria inducida por las DC maduras de bazo fue mayor que la obtenida con las DC inmaduras, observándose valores de DTH más elevados ( $p$  DC maduras vs. DC inmaduras  $< 0,05$ ) (Fig. 2). Esta diferencia se correlacionó con una mayor expresión de moléculas MHC clase II por parte de las DC maduras (Fig. 3).

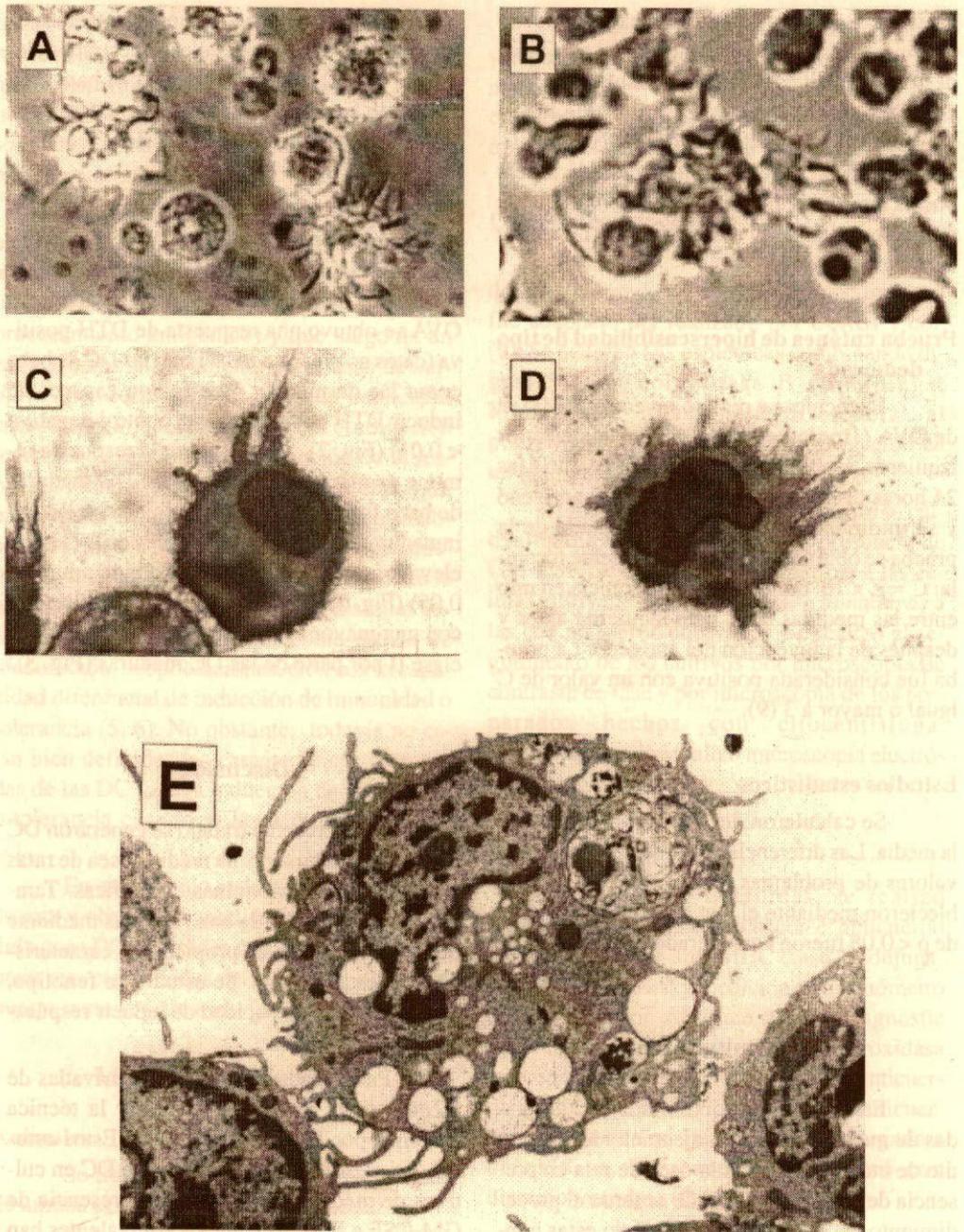
### Discusión

En el presente trabajo se generaron DC a partir de precursores de médula ósea de ratas en presencia de citoquinas específicas. También se aislaron DC de bazo de ratas mediante una técnica basada en propiedades características de estas células. Se estudió su fenotipo, morfología y su capacidad de inducir respuesta inmune primaria.

Para la obtención de DC derivadas de médula ósea, se logró reproducir la técnica descrita por Talmor M. y col. (8). Estos autores obtienen altos rendimientos de DC en cultivos de médula ósea de rata en presencia de GM-CSF e IL-4. Resultados equivalentes han sido obtenidos en ratón y humanos en condiciones similares de cultivo (4).

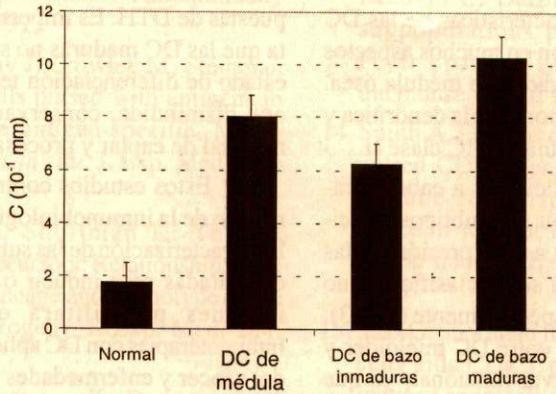
Las DC obtenidas a partir de médula ósea, mostraron el fenotipo y la morfología característicos de DC. Se observaron células de gran tamaño con morfología típica de DC y altamente positivas para la expresión de moléculas del MHC clase II.

La obtención de DC de bazo, estuvo basada en una técnica adaptada de la descrita

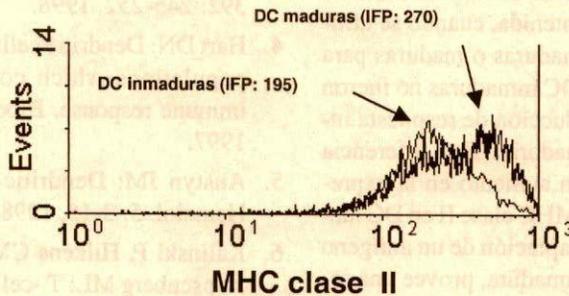


**Figura 1.** Características morfológicas y fenotípicas de DC obtenidas de médula ósea y bazo. A: Microscopía de contraste de fase de cultivos de DC de médula ósea. 400 X. B: Microscopía de contraste de fase de cultivos de DC purificadas de bazo. 400 X. C: Inmunoperoxidasa revelando la expresión de moléculas MHC clase II en DC de médula ósea. 1000 X. D: Inmunoperoxidasa revelando la expresión de moléculas MHC clase II en DC de bazo. 1000 X. E: Microscopía electrónica de transmisión de DC de bazo. 5000 X.

INDUCCIÓN DE RESPUESTA INMUNE PRIMARIA POR DC



**Figura 2.** Respuesta inmune mediada por células contra OVA en ratas inyectadas con DC de médula ósea y con DC de bazo en distintos estados de madurez. Las DC fueron incubadas con 20 µg de OVA y luego inyectadas en ratas normales. La respuesta de DTH fué medida luego de 6 días de la inyección. Como control negativo se realizó el estudio de la respuesta de DTH contra OVA en animales no tratados (Normal). El error fue expresado como error estándar promedio (ESM).



**Figura 3.** Expresión de moléculas MHC clase II en DC de bazo maduras e inmaduras mediante citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia promedio (IFP) está indicada para cada población celular.

originalmente por Steinman y col. (1), en la cual se identificó a las DC por sus características morfológicas luego de una adherencia a superficies plásticas. Las características de las DC obtenidas de bazo, fueron en muchos aspectos similares a las DC derivadas de médula ósea. Las DC mostraron una morfología dendrítica y alta expresión de moléculas MHC clase II.

Varios estudios llevados a cabo en ratón, han permitido definir dos subtipos principales de DC y en base a la expresión de las moléculas CD8 y Mac-1 se las clasificó como *linfoides* y *mieloides* respectivamente (11-13). La distinción propuesta entre DC mieloides y linfoides es crítica a nivel funcional, ya que sugiere la existencia de dos tipos de DC con capacidades diferentes: DC mieloides, inductoras de inmunidad y DC linfoides, reguladoras de la respuesta inmune o inductoras de tolerancia (2, 3, 14-16).

En este trabajo, se realizó el estudio de la capacidad funcional de las DC. Las mismas fueron incubadas con el antígeno OVA, e inyectadas en animales receptores normales. Tanto las DC derivadas de médula ósea como las purificadas de bazo, fueron capaces de inducir respuesta inmune primaria. Sin embargo pudieron apreciarse diferencias en la intensidad de la respuesta inmune obtenida, cuando se utilizaron DC de bazo inmaduras o maduras para la inmunización. Las DC inmaduras no fueron tan eficientes en la inducción de respuesta inmune como las DC maduras. Esta diferencia se correlacionó con un aumento en la expresión de moléculas del MHC clase II en DC maduras. Se sabe que la captación de un antígeno por parte de una DC inmadura, provee una señal de maduración, por la cual declina su capacidad de captar antígenos y aumenta sus capacidades de migrar a los órganos linfáticos secundarios y estimular linfocitos T (3). El aumento observado en la expresión de MHC clase II muestra que durante las 24 hs de cultivo, las DC de bazo maduran y aumentan su capacidad de presentar antígenos. Debido a su capacidad reducida de captar antígenos, podría esperarse que las DC maduras indujeran una menor respuesta de DTH que las DC inmaduras, porque a pesar de su alta capacidad estimuladora no dispondrían de antígeno para procesar y presentar. Sin embargo es posible que las DC maduras, compensen la redu-

cida capacidad de captación antigénica, con una mayor eficiencia en la presentación lo que justificaría las diferencias observadas en las respuestas de DTH. Es importante tener en cuenta que las DC maduras no se encuentran en un estado de diferenciación terminal y que, aunque disminuida, conservan cierta capacidad residual de captar y procesar antígenos.

Estos estudios contribuyen al conocimiento de la inmunobiología básica de las DC. La caracterización de las subpoblaciones de DC capacitadas para inducir o regular respuestas inmunes posibilitará el desarrollo de inmunoterapias con DC aplicadas al tratamiento del cáncer y enfermedades infecciosas.

### Bibliografía

1. Steinman RM, Cohn ZA: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med.* 137: 1142-1161, 1973.
2. Steinman RM, Pack M, Inaba K: Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev.* 156: 25-37, 1997.
3. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252, 1998.
4. Hart DN: Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90: 3245- 3287, 1997.
5. Austyn JM: Dendritic cells. *Curr. Opin. Hematol.* 5: 3-15, 1998.
6. Kalinski P, Hilkens CMU, Wierenga EA, Kapsenberg ML: T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today* 20: 561-567, 1999.
7. Huang FP, Platt N, Wykes M, Major JR, Powell TJ, Jenkins CD, MacPherson GG: A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* 191: 435-444, 2000.
8. Talmor M, Mirza A, Turley S, Mellman I, Hoffman LA, Steinman RM: Generation of large numbers of immature and mature dendritic cells from rat bone marrow cultures. *Eur. J. Immunol.* 28: 811-817, 1998.

9. Correa S, Riera C, Iribarren P: Participation of peritoneal dendritic cells in the induction of autoimmune prostatitis. *J. Autoimmunity* 10: 107-113, 1997.
10. Inaba K., Metlay J, Crowley M, Steinman R: Dendritic cells pulsed with antigens *in vitro* can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells *in situ*. *J. Exp. Med.* 172: 631-640, 1990.
11. Wu L, Li CL, Shortman K: Thymic dendritic cell precursors: Relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J. Exp. Med.* 184: 903-911, 1996.
12. Vremec D, Shortman K: Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs- Cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen and lymph nodes. *J Immunol.* 159: 565-573, 1997
13. Anjuère F, Martín P, Ferrero I, López Fraga M, Martínez del Hoyo G, Wright N, Ardavín C: Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* 93: 590-598, 1999.
14. Smith A, Fazekas de St, Groth B: Antigen-pulsed CD8a<sup>+</sup> dendritic cells generate an immune response after subcutaneous injection without homing to the draining lymph node. *J. Exp. Med.* 189: 593-598, 1999
15. Suss G, Shortman K: A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 183: 1789-1796, 1996.
16. Kronin V, Winkel K, Suss G, Kelso A, Heath W, Kirberg J, von Boehmer H, Shortman K: A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production. *J Immunol.* 157: 3819-3827, 1996.

### Abstract

Several experimental studies refer to the relationship between chronic stress, cholesterol levels and variation in diastolic blood pressure. Our objective is to establish a significant statistical correlation between stress factors, hypertension and hypercholesterolemia in the studied people. 146 agents were tested among teachers and others employees from the National University of Rio Cuarto, who voluntarily went clinical control, reporting data such as arterial pressure, cholesterolaemia, pathologic records, an standardized survey was done considering potentially stress factors, grouped in four different types of stress: (1) psychodimentary, (2) pure psychic, (3) laboral, (4) psicofamiliar, giving each of them a value whose addition gave a stress potential factor. The results show that 45.89% of the people studied have hypercholesterolemia (higher 200 mg.% with a mean 237.09 ± 29.97) being significantly higher ( $P < 0.001$ ) in the group of employees older than 40 years old. 7.33 % of the people showed high arterial pressure, and the 90.90 % of this people have hypercholes-