



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Análisis de la expresión y funcionalidad del Halo Purinérgico
(CD39/CD73) en Células Dendríticas Plasmacitoides humanas de
sangre periférica”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. SORELY ADELINA SOSA LUIS

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de Tesis:

Dr. Honorio Torres Aguilar

Dra. María Carmen Sánchez Torres

Ciudad de México

MARZO, 2023.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por el apoyo
725045 brindado para el desarrollo de este proyecto.

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
1. MARCO TEÓRICO	11
1.1 CÉLULAS DENDRÍTICAS Y SU PAPEL EN LA RESPUESTA INMUNE	11
1.2 CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMACITOIDES (pDC).....	17
1.2.1 ORIGEN Y DESARROLLO DE LAS pDC.....	18
1.2.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FUNCIONALES DE LAS pDC.....	20
1.3 PLASTICIDAD DE LAS pDC Y SU PAPEL EN TOLERANCIA E INMUNIDAD... ..	25
1.4 MECANISMOS DE REGULACION EN pDC.....	26
1.5 HALO PURINÉRGICO CD39/CD73 COMO MECANISMO DE REGULACIÓN... ..	28
1.6 ANTECEDENTES DIRECTOS.....	33
1.7 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
1.8 JUSTIFICACIÓN.....	35
1.9 HIPÓTESIS.....	36
2. OBJETIVOS.....	36
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	36
2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3. ASPECOS METODOLÓGICOS	37
3.1 DISEÑO DE TÉCNICAS DE RECOLECCION DE INFORMACION.....	37
3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	37
3.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	37
3.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	37
3.2.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.....	38
3.3 TIPO DE ESTUDIO.....	38
3.4 TÉCNICAS DE ANÁLISIS.....	38
3.4.1 Obtención de muestra.....	38
3.4.2 Purificación de PBMC.....	38
3.4.3 Aislamiento de pDC y linfocitos T CD4⁺.....	39
3.4.4 Análisis fenotípico e identificación de CD73 y su coexpresión con CD39 en pDC.....	39

3.4.5	Identificación de CD73 en pDC por microscopia de fluorescencia.	39
3.4.6	Estimulación de pDC con R848 (agonista TLR-7).	40
3.4.7	Cuantificación de IFN- α	41
3.4.8	Cuantificación de adenosina.....	41
3.4.9	Proliferación y activación de linfocitos T.	41
3.4.10	Análisis estadístico.	42
4.	RESULTADOS	43
5.	DISCUSIÓN.....	76
6.	CONCLUSIONES.....	80
7.	PERPECTIVAS.....	82
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	83
9.	ANEXOS.....	92
9.1	CONSENTIMIENTO INFORMADO	92
9.2	DATOS LABORATORIALES (BIOMETRÍA HEMÁTICA).....	93
9.3	MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA (CONTROL CD73+) EN MSC Y PBMC	94
9.4	ARTÍCULOS PUBLICADOS	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Clasificación original de DC y la nueva clasificación basada en la secuenciación de RNA y factores de transcripción.....	13
Fig. 2 Modelo actual propuesto para hematopoyesis de pDC y cDC.....	19
Fig. 3 Morfología de los subtipos de DCs.....	20
Fig. 4 Vía de activación de pDC en respuesta a ácidos nucleicos.	23
Fig. 5 Mecanismo de "halo purinérgico para la generación de adenosina a partir de ATP.	30
Fig. 6 Expresión BDCA-2+ en pDC aisladas de una separación magnética.....	44
Fig. 7 Expresión BDCA-2+ en pDC aisladas de doble separación magnética.	44
Fig. 8 Dos poblaciones de células BDCA-2+.	45
Fig. 9 Análisis de expresión de BDCA-2 en subpoblaciones de pDC.....	47
Fig. 10 Frecuencia de CD123 en subpoblaciones de pDC.....	49
Fig. 11 Frecuencia y expresión de CD123 en subpoblaciones.....	49
Fig. 12 Frecuencia de CD40 en subpoblaciones de pDC.....	50
Fig. 13 Frecuencia y expresión de CD40 en subpoblaciones de pDC.....	51
Fig. 14 Frecuencia y expresión de CD4 y CD33 en subpoblaciones de pDC.....	53
Fig. 15 Co-expresión de CD4 y CD33 en subpoblaciones de pDC en diferentes niveles de CD40.	54
Fig. 16 Frecuencia de CD4 y CD33 en subpoblaciones de pDC en los diferentes niveles de CD40.	56
Fig. 17 Establecimiento de la población de pDC.....	57
Fig. 18 Expresión de CD39 en pDC.....	58
Fig. 19 Expresión extracelular de CD73 en pDC.....	59
Fig. 20 Presencia del halo purinérgico en pDC.....	59
Fig. 21 Expresión intracelular de CD73 en pDC.....	60
Fig. 22 Expresión intracelular y extracelular de CD73 en pDC.....	60
Fig. 23 Expresión intracelular y extracelular de CD73 en pDC por microscopia de fluorescencia.....	62
Fig. 24 Análisis cuantitativo de la expresión intracelular y extracelular de CD73 en pDC por microscopia de fluorescencia.	63
Fig. 25 Expresión de CD40 en pDC tras la activación con R848.....	65

Fig. 26 Determinación de la concentración de IFN- α en pDC.	66
Fig. 27 Expresión de CD39 y CD73 en pDC activadas.	68
Fig. 28 Co-expresión de CD39 y CD73 en pDC activadas.	69
Fig. 29 Cinética de expresión de CD73 en pDC estimuladas con R848.....	70
Fig. 30 Cuantificación de la concentración de adenosina.	71
Fig. 31 Histogramas de la proliferación de linfocitos T CD4+ cocultivados con pDC.	73
Fig. 32 Proliferación de linfocitos T CD4+ cocultivados con pDC.....	73
Fig. 33 Expresión de CD25 en linfocitos T CD4+ cocultivados con pDC.....	74
Fig. 34 Expresión del halo purinérgico (CD39/CD73) en pDC humanas de sangre periférica.	81
Fig. 35 Expresión de CD73 en MSC y PBMC.	94

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Clasificación de DC marcadores y factores de transcripción.	15
--	----

ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

<p>Ab: (del inglés: <i>Antibody</i>)</p> <p>ADO: Adenosina</p> <p>ADP: (Del inglés: <i>Adenosine diphosphate</i>)</p> <p>AMP: (Del inglés: <i>Adenosine monophosphate</i>)</p> <p>ATP: (Del inglés: <i>Adenosine triphosphate</i>)</p> <p>BDCA-2: (Del inglés: <i>Blood Dendritic Cell Antigen-2</i>)</p> <p>BDCA-4: (Del inglés: <i>Blood Dendritic Cell Antigen-4</i>)</p> <p>cAMP: (Del inglés: <i>Cyclic Adenosine monophosphate</i>)</p> <p>CD: (Del inglés: <i>Cluster of Differentiation</i>)</p> <p>cDC: (Del inglés: <i>Conventional Dendritic Cells</i>)</p> <p>CFSE: (Del inglés: <i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>)</p> <p>CL: Células de Langerhans</p> <p>APC: (Del inglés: <i>Antigen presenting cells</i>)</p> <p>DC's: (Del inglés: <i>Dendritic cells</i>)</p> <p>DNA: (Del inglés: <i>Deoxyribonucleic acid</i>)</p> <p>DS: Desviación estándar.</p> <p>EAI: Enfermedades autoinmunes.</p> <p>FITC: (Del inglés: <i>Fluorescein IsoThioCyanate</i>)</p> <p>HLA-DR: (Del inglés: <i>Human Leukocyte Antigen-DR</i>)</p> <p>IC: Inmunocomplejo</p> <p>ICOSL: (Del inglés: <i>Inducible T Cell Costimulator Ligand</i>)</p> <p>IDC: (Del inglés: <i>Interstitial Dendritic Cell</i>)</p>	<p>IDO: Indolamina 2,3-dioxigenasa.</p> <p>IFN I: Interferón tipo 1</p> <p>IFN α/β: Interferón alfa/beta</p> <p>IL: Interleucina</p> <p>IMF: Intensidad media de fluorescencia.</p> <p>LB: Linfocito B</p> <p>LT: Linfocito T</p> <p>LTC: Linfocito T citotóxico</p> <p>Tregs: (Del inglés: <i>regulatory T cells</i>)</p> <p>mAb: (Del inglés: <i>Monoclonal Antibody</i>)</p> <p>mDC/cDC: (Del inglés: <i>Myeloid Dendritic Cell/conventional Dendritic cell</i>)</p> <p>MHC I: (Del inglés: <i>Major Histocompatibility Complex type I</i>)</p> <p>MHC II: (Del inglés: <i>Major Histocompatibility Complex type II</i>)</p> <p>ODN: Oligodeoxiribonucleotidos.</p> <p>PB: (Del inglés: <i>Pacific Blue</i>)</p> <p>PBMC: (Del inglés: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>)</p> <p>pDC: (Del inglés: <i>Plasmacytoid Dendritic Cells</i>)</p> <p>PDL1: (Del inglés: <i>Programmed Death-ligand 1</i>)</p> <p>PE: (Del inglés: <i>Phycoerythrin</i>)</p> <p>LES: Lupus Eritematoso Sistémico.</p> <p>TLR: (Del inglés: <i>Toll-like Receptors</i>)</p>
---	--

PALABRAS CLAVE

Células dendríticas plasmacitoides.

Respuesta inmune antiviral.

Halo purinérgico.

Adenosina.

Inmunomodulador

Respuesta alogénica

CONTACTO

Sorely Adelina Sosa Luis

Av. Universidad s/n. Cinco Señores

CP 68120, Oaxaca.

Tel: 044 951 290 7277

email: sorely.sosa@cinvestav.mx

minna.leluiso22@gmail.com

RESUMEN

Las células dendríticas plasmacitoides (pDC) son un tipo de Células Dendríticas (DC) especializadas en la respuesta inmune antiviral. El reconocimiento de ácidos nucleicos (ssRNA y DNA CpG) mediante TLR-7 y TLR-9 en la pDC, estimula su activación, producción y secreción de IFN- α . Por otra parte, algunos de los mecanismos de tolerancia en estas células son a través de IDO, PD-L1, ICOSL, TRAIL, Granzimas y TGF- β , descritos principalmente en microambientes tumorales, sin embargo, la expresión y funcionalidad inmunomoduladora del “halo purinérgico” (CD39/CD73) en pDC bajo condiciones homeostáticas y de activación no ha sido evaluada. El halo purinérgico es un mecanismo inmunorregulador descrito principalmente en linfocitos T reguladores (Tregs). Está conformado por las ectoenzimas CD39 y CD73 cuya actividad consecutiva cataliza la conversión de ATP a adenosina. Esta última actúa sobre sus receptores (A1, A2A, A2B y A3). La unión de adenosina al receptor A2A en linfocitos T induce anergia; en Tregs incrementa su capacidad inmunosupresora y en células presentadoras de antígeno favorece sus funciones tolerogénicas.

Los resultados de este trabajo, mostraron que el análisis de pDC de sangre periférica, se observan dos poblaciones celulares. La población de menor complejidad (CD33-) definida como pDC y la de mayor complejidad (CD33+) como AS-DC. El análisis del halo purinérgico en pDC recién purificadas mostró expresión de CD39, mientras que CD73 tuvo una mínima o nula expresión extracelular, pero con presencia intracelular. Ambas enzimas mostraron un incremento significativo tras su activación con un agonista de TLR-7. El análisis de la funcionalidad enzimática de CD73 en presencia de ATP exógeno reveló un incremento en la concentración de adenosina, cuya actividad fue revertida cuando se bloqueó la actividad de CD73 con un anticuerpo neutralizante. Así mismo, el bloqueo de CD73 en pDC activadas favoreció un incremento en la capacidad estimuladora de las pDC al inducir una mayor proliferación y activación de linfocitos T CD4+. En conjunto, los resultados de este proyecto, demuestran por primera vez, la expresión funcional del halo purinérgico (CD39/CD73) y su participación en la capacidad inmunomoduladora de pDC humanas de sangre periférica.

ABSTRACT

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are a kind of Dendritic Cells (DC) specialized in the antiviral immune response. Recognizing nucleic acids (ssRNA and CpG DNA) through TLR-7 and TLR-9 in pDC stimulates their activation, production, and IFN- α secretion. On the other hand, some of the tolerance mechanisms in these cells are through IDO, PD-L1, ICOSL, TRAIL, Granzymes, and TGF- β , described mainly in tumor microenvironments. However, the expression and immunomodulatory functionality of the “purinergic halo” (CD39/CD73) in pDC under homeostatic and activation conditions have not been evaluated. The purinergic halo is an immunoregulatory mechanism described mainly in regulatory T cells (Tregs). It comprises the ectoenzymes CD39 and CD73, whose consecutive activity catalyzes the conversion of ATP to adenosine. The latter acts on its receptors (A1, A2A, A2B, and A3). The adenosine binding to the A2A receptor on T cells induces anergy on Tregs, increases their immunosuppressive capacity and on antigen-presenting cells, and favors their tolerogenic functions.

The results of this work showed that the analysis of pDC from peripheral blood revealed two cell populations. The lower complexity (CD33-) was defined as pDC, and the higher complexity (CD33+) as AS-DC. The Purinergic halo analysis on freshly purified pDC showed CD39 expression, whereas CD73 had minimal or no extracellular expression but an intracellular presence. Both enzymes showed a significant increase after pDC activation with a TLR-7 agonist. The evaluation of CD73 enzymatic functionality in the presence of exogenous ATP revealed an increase in adenosine concentration, whose activity was reversed when CD73 activity was blocked with a neutralizing antibody. Likewise, CD73 blocking in activated pDCs favored increased pDC stimulatory capacity by inducing a superior proliferation and activation of CD4+ T lymphocytes. Taken together, the results of this project demonstrate, for the first time, the functional expression of the purinergic halo (CD39/CD73) and its participation in the immunomodulatory capacity of human pDC from peripheral blood.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 CÉLULAS DENDRÍTICAS Y SU PAPEL EN LA RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune es un mecanismo de defensa contra agentes extraños y patógenos primordialmente. Sin embargo, también tiene la capacidad de reconocer lo propio de lo extraño y con ello mantener una homeostasis en el organismo. Dentro de este amplio sistema que para su mayor comprensión se ha clasificado en inmunidad innata y adquirida participan múltiples factores solubles, proteínas y varios tipos celulares los cuales poseen distintas funciones dentro de los que encontramos células polimorfonucleares, linfocitos, monocitos, y células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés). Dentro de las APC, se han descrito como más eficaces en este proceso a algunos tipos de células dendríticas.

Las células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) son APC profesionales derivadas de médula ósea por progenitores principalmente mieloides. Las DCs se localizan en sangre periférica, órganos linfoides y tejidos; son únicas por su capacidad para activar linfocitos T (LT) vírgenes para iniciar y modular los distintos tipos de respuesta inmune contra un amplio rango de agentes patógenos y no patógenos debido a la expresión en su superficie de receptores de reconocimiento de patrón (PRR, por sus siglas en inglés) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) y patrones moleculares asociados a daño (DAMP, por sus siglas en inglés), son la conexión de la respuesta inmune innata y adaptativa; no solo son los principales iniciadores de la respuesta inmune sino también los responsables en el mantenimiento de tolerancia a antígenos propios e inocuos del ambiente (14, 23). La capacidad de estas células para generar diversos tipos de respuesta inmune ha sido atribuida a los diferentes subtipos de DC (2). Los diversos subtipos de DC han sido clasificados de acuerdo a su ontogenia, funcionalidad y marcadores fenotípicos que las distinguen (23)

Anteriormente se habían agrupado a las DC en migratorias y residentes de tejido linfóide o no linfóide (14, 17, 20); otra clasificación es con base a su localización y

funcionalidad, en esta se dividían en las localizadas en sangre/tejido linfoide y las residentes de tejido cutáneo (38). En sangre y tejido linfoide encontramos a las cDC (célula dendrítica convencional) y las pDC (células dendríticas plasmacitoides). Las cDC a su vez se subdividen en dos grupos las cDC1 (CD141) que participan primordialmente en la respuesta contra patógenos intracelulares y cDC2 (CD1c) que su respuesta es dirigida contra patógenos intra y extracelulares. Otro grupo descrito son la moDC (células dendríticas derivadas de monocitos) las cuales se ha establecido que tienen baja capacidad de migración hacia zonas enriquecidas de LT (20, 23, 38, 49). Dentro de las localizadas en tejido cutáneo se encuentra las LC (células de Langerhans) residentes de la epidermis y las DC CD14⁺, localizadas en la dermis, otro grupo son las IDC (células dendríticas intersticiales) que como su nombre lo dice localizadas en los intersticios (38, 49).

La clasificación de las DC ha sido controversial ya que los grupos de investigación las clasifican de acuerdo a la expresión de algunos marcadores de interés para ellos. Por lo cual, en la actualidad se ha establecido una clasificación de DC más específica de acuerdo a su ontogenia, factores de transcripción y el análisis de secuenciación de RNA unicelular (2, 23, 61). Con lo cual han establecido los grupos de DC encontradas en sangre periférica independiente de las localizadas en tejido cutáneo.

Los diversos subtipos de DC en el humano se describen en la *Figura. 1 y Tabla 1*.

Cada subtipo de DC se desarrolla bajo el control de un repertorio de factores de transcripción involucrados en diferentes niveles mostrados en la *Tabla 1* al igual que el principal regulador para su desarrollo y diferenciación es Flt3L. La mayoría de las DC provienen de precursor hematopoyético. Sin embargo, se ha demostrado que los monocitos comparte un perfil transcripcional similar con algunos grupos de DC, no obstante no se ha evidenciado que en sangre periférica puedan diferenciarse los monocitos a DC (*Fig 1*). Las células dendríticas derivadas de monocitos (moDC) comparten marcadores e superficie con las cDC2 y se ha visto que dentro de estas DC hay un subgrupo que tiene como precursor monocitos CD14⁺ (14, 38, 61). Se describen las DC más estudiados acorde a sus funciones.

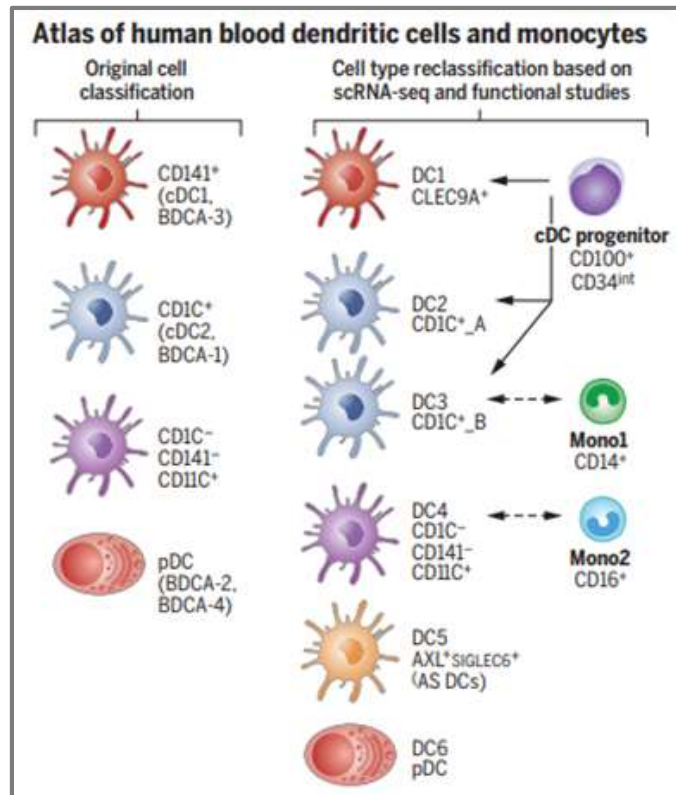


Fig. 1 Clasificación original de DC y la nueva clasificación basada en la secuenciación de RNA y factores de transcripción.

Se establecen 6 subtipos de DC. Se estableció que las DC se generan del progenitor común de células dendríticas. Nuevo grupo DC5 descrito con características fenotípicas igual a DC6, pero capacidad funcional diferente.

CLASIFICACIÓN	FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DIFERENCIALES	MARCADORES CONVENCIONALES	MARCADORES ADICIONALES	SUBGRUPOS
cDC1 (DC1)	ID2	CD141/BDCA-3 CD11c	CLEC9A	DC2
	IRF8		CADM1	
	BATF3		XCR1	CD2
			BTLA	FCεR1
			CD26	CLEC10A
			CD226	
			CD13	
			CD33	
				CD5

cDC2 (DC2 y DC3)	ID2	CD1c/BDCA-1	SIRPA	DC3 S100A9 S100A8 VCAN LYZ ANXA1 CD14
	ZEB2	CD11b	ILT1	
	IRF4	CD11c	DCIR	
	Notch2	CD4	CD13	
			CD33	
		CD163		
		CD172		
Monocito no clásico (DC4)	FTL	CD16	SLAN DC?	
	SERPINA1	CD11c		
	LST1	CX3CR1		
	AIF1	+/-SLAN		
pre-DC (DC5)			AXL	
	ZEB2		SIGLEC6	
	IRF4	CD123	CXCR1	
	KLF4	CD303/BDCA-2	CD169	
			CD22	
		CD33		
pDC's (DC6)	E2-2		FCεR1	
	ZEB	CD123	ILT3	
	IRF8	CD303/BDCA-2	ILT7	
	IRF4	CD304/BDCA-4	DR6	
	IRF7			
	GZMB			
mo-DC			SIRPA	
	MAFB	CD11c	CD206	
	KLF4	CD1a	DC-SIGN/CD209	
			S100A8	
		S100A9		
Células de Langerhans	ID2	CD207	EpCAM TROP2	
	RUNX3	CD1a		
		CD1c		
		CD11c		
		E-caderina		
DC intersticial		CD11c	Sirpa	
		CD1a	CD11b	

CD209

CD163

Tabla 1. Clasificación de DC marcadores y factores de transcripción.

Todos los subtipos presentan HLA-DR+.

- **cDC1**

También denominadas células dendríticas mieloides tipo 1, marcador fenotípico CD141⁺ (BDCA-3), posee TLR-1,2,3,6 y 8, reconocen y procesan microorganismos intracelulares primordialmente, realizan presentación cruzada de antígeno favoreciendo la activación y respuesta de LT CD8⁺, producen IL-12 e IFN- λ , generan primordialmente respuesta de LT Th1 y Th2 (20, 38, 61).

- **cDC2**

Células dendríticas convencionales o mieloides tipo 2, marcador fenotípico CD1c⁺ (BDCA-1), esta población de DC es más abundante que las cDC1, posee TLR 1,2,3,4,5,6,7 y 8. Participa en respuesta contra patógenos intra y extracelulares, parásitos, hongos y alérgenos. Favorecen activación de LT CD4⁺ generando respuestas Th1, Th2 y Th17. Producen IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 así como también la producción de IL-10 y TGF- β con lo cual favorece la respuesta de Tregs (2, 14, 23, 49, 61).

- **pDC**

Células dendríticas plasmacitoides reciben este nombre debido a su característica morfológica similar a una célula plasmática y su ausencia de dendritas que hace diferir morfológicamente a las cDC. Son de origen de la vía central mieloides/linfoide por la cual ambos rasgos pueden expresarse. Representan un pequeño subgrupo de DC. Sus marcadores fenotípicos son CD123, CD303 (BDCA-2) y CD304 (BDCA-4). Expresan TLR-7 y TLR-9 primordialmente por lo cual dirigen respuesta inmune contra virus. Expresan también TLR-2, 6 y 8. Son las principales productoras de IFN- α . Favorecen activación y respuesta de LT CD8 y CD4. Son APC menos

eficientes que la cDC sin embargo poseen HLA-DR y moléculas coestimuladoras y una vez activadas mejora esta capacidad funcional (2, 14, 38, 49, 61).

- **AS-DC**

Entre los progenitores CD34⁺ y las DC maduras se encuentran las AS-DC que son precursores de las DC sin embargo no expresan el fenotipo completo de las DC maduras. Una peculiaridad de esta población es que expresan marcadores fenotípicos de las pDCs CD123 y BDCA-2 pero a pesar de ello se ha establecido que las AS-DC no son un subtipo de pDC ya que no tienen la misma capacidad funcional de la pDC y son más potentes APC una vez que se desarrollan a cDC2, la morfología es otro rasgo para diferenciarlas, de igual manera la AS-DC expresa otros marcadores fenotípicos únicos como Axl y Siglec6, además de expresan BDCA-3 y CD33. Las AS-DC producen altos niveles de IL-8 (2, 14, 61).

- **Células de Langerhans (LC)**

Se localizan en la epidermis y representan del 3 - 5 % de las células epidermales. Como marcador fenotípico poseen CD207 (Langerina) que es una lectina tipo C. La langerina está involucrada en la formación de los gránulos de Birbeck intraplasmáticos. Poseen baja expresión de HLA-DR por lo cual se ha relacionado a propiedades homeostáticas, mantienen la integridad epidermal y al mantenimiento de Tregs. A diferencia de las DCs las LC no solo son de origen hematopoyético sino que se autorenewan en su localización a partir de precursores epidermales esto quiere decir que se desarrollan independientemente de Flt3-Flt3L y requieren señalización de IL-34 a través de CSF-1R para su desarrollo. Poseen TLR- 1, 2, 3 y 6 y genera respuestas tipo Th1, Th2 y Th17 (38, 49).

Otras DC que no enfatizaremos pero que se han descrito son las IDC (células dendríticas intersticiales) estas se localizan en el intersticio y dermis. Otras células que han recibido el nombre DC pero no tienen la función de DC son las DC foliculares estas son de origen mesenquimal y se localizan en el centro germinal, folículos linfáticos, el bazo y tejido linfático de las mucosas en un microambiente que permite la generación de LB de memoria. No cumplen las mismas funciones que la

DCs profesionales ya que las foliculares no tienen la capacidad de capturar y procesar antígeno, carecen de HLA-DR. Su función de estas células es captar antígenos en sus dendritas en forma de complejo inmune y promover la activación de LB y el mantenimiento de las células plasmáticas (44).

En resumen, las DC son APC profesionales y están especializadas en llevar a cabo respuesta inmune dirigida a patógenos tanto intracelulares como extracelulares. Existen varios subtipos de DC que se han clasificado de acuerdo a sus características de localización, factores de transcripción, ontogenia y funcionalidad. En particular, el subgrupo de las pDC dirige respuestas inmunes antivirales debido a su alta expresión de TLR-7 y TLR-9 que reconocen ácidos nucleicos y por ende la alta producción y secreción de IFN- α . A diferencia de los demás subgrupos de DC y precisamente por estas características, también se ha involucrado a las pDC en la fisiopatología de varias enfermedades autoinmunes tales como psoriasis y lupus eritematoso sistémico (LES), en las cuales se encuentra la presencia de autoanticuerpos anti-ADN y antígenos nucleares, así como el incremento de IFN- α asociados a su patología. Lo anterior, hace a las pDC, un factor relevante a estudiar en cuanto a su relación en la pérdida de tolerancia a autoantígenos en estas enfermedades, así como en la investigación de los mecanismos inmunomoduladores que posean estas células.

1.2 CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMACITOIDES (pDC)

Las pDC fueron descritas por primera vez en 1958 por los patólogos Lennert K. y Remmele W. como un tipo de células con morfología de célula plasmática localizada en el área de LT en tejido linfoide y denominaron a esta “célula plasmacitoide” o “LT plasmacitoide” por su expresión de CD4 (3, 57, 58, 59). Posteriormente Facchetti encontró varios marcadores mielomonocíticos en los LT plasmacitoides y sugiriendo el término “monocitos plasmacitoides”. Para estudios posteriores se utilizó un precursor de células dendríticas para describir este tipo celular con resultados positivos de diferenciación se le asignó el nombre de “células dendríticas

plasmacitoide (pDC)". En 1970 se demostró en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) que había un tipo celular que producía más cantidades de IFN-I que otras al exponerlas a virus, estas no eran LB, LT, natural killers (NK), monocito ni macrófagos por lo tanto fueron denominadas "células productoras de IFN-I" (IPC, por sus siglas en inglés). Fue hasta el año de 1999 en el que se demuestra que las IPC son las células dendríticas plasmacitoides (54, 58, 59).

1.2.1 ORIGEN Y DESARROLLO DE LAS pDC

Al igual que las cDC, las pDC provienen de médula ósea, sin embargo, su origen ha sido controversial, ya que pueden derivarse de progenitores mieloides o linfoides. Se han establecido rutas claramente definidas hacia la producción de CDP (Del inglés, *common DC precursor*), así como también, se ha encontrado que la pDC contienen RAG-1 para los rearrreglos del gen DJ de la cadena pesada de la inmunoglobulina, lo que sugiere su origen linfoide (14, 53, 57, 58, 59), sin embargo se demostró que una pequeña fracción pDC generadas a partir de CMP (Del inglés, *common myeloid progenitor*) también expresan RAG-1 (53, 58). Esto sugiere que los progenitores de células linfoides, mieloides y dendríticas comprometidas pueden compartir características, ya que derivan del progenitor activador multipotente linfoide (LMPP), por esta razón, las pDC derivadas de CDP pueden tener características de linaje mioide y linfoide *Fig. 2* (14, 53).

IKAROS y PU.1 (regulan Flt3 y Ftl3L), HIF1 α (factor inducible de hipoxia 1 α) y NAB2 (proteína 2 de unión a RNA poliadenilato nuclear) (48, 57).

1.2.2 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y FUNCIONALES DE LAS pDC.

- Morfología

Algo característico de las pDC que las diferencia de las AS-DC y cDC es su morfología (*Fig. 3*). La pDC posee una forma redondeada, con un núcleo arriñonado excéntrico, citoplasma basofílico y una zona pálida correspondiente a la zona del Golgi (acroplasma), contiene retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado y gran cantidad de mitocondrias lo que sugiere su función potencial para producción de citocinas (3, 58, 59). La pDC presentan un diámetro de 8 - 10 μm , son más pequeñas que los monocitos y más grandes que los linfocitos (59).

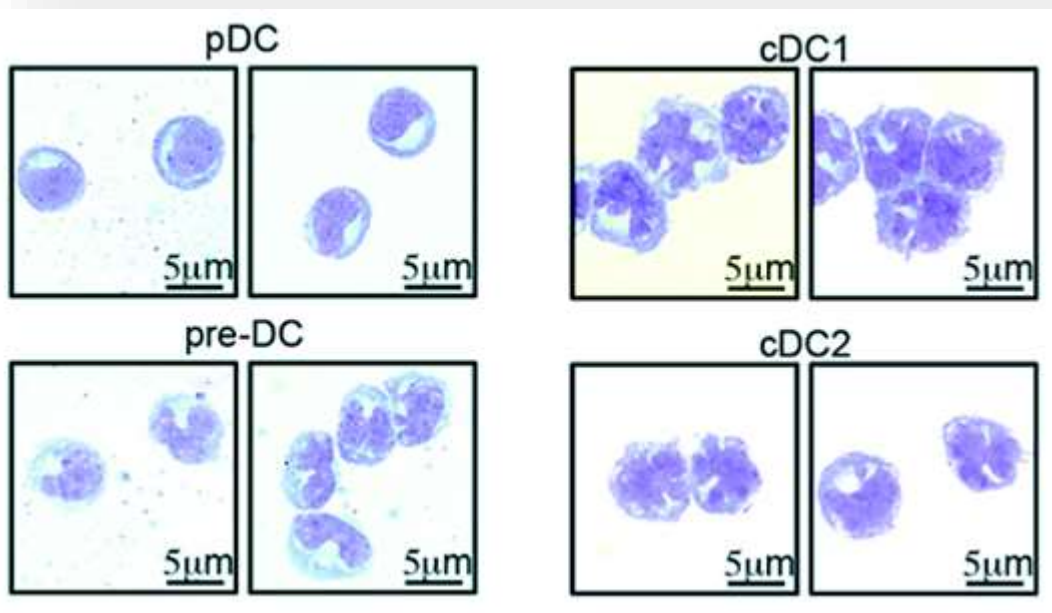


Fig. 3 Morfología de los subtipos de DCs.

Tinción Wright-Giemsa (52).

- Marcadores fenotípicos

Las DC poseen marcadores exclusivos en su superficie que establecen su fenotipo para poderlas definir y clasificarlas. Los marcadores que las definen como pDC son: CD123 que es el receptor de IL-3 (indispensable para la supervivencia de la pDC); BDCA-2 (CD303) un receptor lectina tipo C, BDCA-4 (CD304/Neurofilina) e ILT7 (CD85) transcrito 7 tipo inmunoglobulina, también poseen otros marcadores como CD4, CD68, HLA-DR, ILT3, CD45RA, FcγRII activan a las pDC por su unión con su ligando y CD2 que es una molécula de adhesión celular la cual distingue dos tipos de pDC una con CD2^{high} la cual expresa lisozimas y mostraría capacidad catalítica en este subtipo de pDC. Las pDC expresan dos proteínas intracelulares la Granzima B y CD2AP (proteína asociada a CD2) que regula actina y promueve la migración de pDC a ganglios linfáticos durante la inflamación (3, 36, 48, 53, 57, 58).

Las pDC carecen de marcadores fenotípicos de otros linajes como CD3 (LT), CD14 (monocitos), CD16, CD19 (LB), CD56 (NK), TCR y CD11c⁻ por cual se ha establecido que las pDC poseen un fenotipo Lin⁻. Al igual las pDC carecen de la expresión de marcadores de origen mieloide (CD13 y CD33), y de CD11b (cDC) (57, 58).

Adicionalmente, se han descrito muchas otras moléculas en las pDC, necesarias para interactuar con otras células. Para interactuar con LT, las pDC requieren de la expresión de CD40, LLT1, CD86, TRAIL, ICOSL, PD-L1 y OX40L; con los LB requieren de CD40, CD40L, CD70, CD11a y CD31; para la transmigración de las pDC es necesaria la expresión de LFA-1 (antígeno 1 asociado a la función linfocitaria), CD62L, ChemR23 (receptor de quemerina) y CD31 para su interacción con el endotelio. Para su interacción con las NKT, las pDC requieren de OX40L (CD252); y de LLT1, GITRL e ICAM-1 para la interacción con células NK. Para la comunicación con cDC, las pDC utilizan NOTCH-L; y la interacción con células tumorales está mediada a través de ILT7 (36).

- Funciones

Las pDC se desarrollan en médula ósea y se encuentran en sangre, ganglios linfáticos en el área de LT y en tejidos periféricos. Representan alrededor del 0.2 – 0.5% de los PBMC (59, 62). Sin embargo, a pesar de representar una pequeña población de DC, las pDC son las principales células productoras de IFN-I cuando son estimuladas por virus o componentes virales. Por lo anterior, tienen un rol importante relevante en la respuesta inmune innata y adaptativa (3, 7, 9, 48). Las pDC también producen IFN-III (IL-28 a/b e IL-29) igualmente denominado IFN- λ . La activación de pDC y consecutiva secreción de IFN-I esta mediada por TLR-7 y TLR-9, que a diferencia de los otros subtipos de DC, las pDC tienen una alta expresión de TLR-7 que reconoce ssRNA y TLR-9 el cual reconoce motivos CpG DNA virales por tal motivo están involucradas en la respuesta inmune antiviral. Estos receptores están localizados en los compartimentos endosomales y no solo sensan componentes de los virus sino también bacterianos, células muertas (ácidos nucleicos propios). Las pDC presentan escasamente TLR-2, 6 y 8. Estos TLR no son los únicos PRR expresados en la pDC también poseen receptores RIG-I (reconoce ácidos nucleicos en citoplasma), NLR (receptores tipo NOD), lectinas tipo C, cGAS-STING (principal sensor de ácidos nucleicos citosólicos), estos receptores internos requieren la internalización de los ácidos nucleicos lo cuales se llevan a cabo por endocitosis, fagocitosis o autofagia; y receptores Fc (3, 9, 36, 57, 62).

Los TLR-7/9 no solo reconocen DNA/RNA virales, también reconocen los ácidos nucleicos propios como los derivados de la apoptosis o los de la Netosis. La Netosis es la liberación de trampas extracelulares de los neutrófilos (NET's) como un mecanismo de defensa contra microorganismos patógenos, estas NET's contienen ácidos nucleicos, péptidos antimicrobianos como LL-37 los cuales forma inmunocomplejos (DNA/LL-37), estos inmunocomplejos también son formados con anticuerpos (Ac's) anti-DNA o anti-LL37. Los inmunocomplejos son reconocidos por las pDC mediante endocitosis (DNA/LL-37) que son translocados hacia los compartimentos endocíticos de pDC por un proceso que involucra el ataque de LL-37 a proteoglicanos en la membrana celular mediada por balsas lipídicas o a través de los Fc γ RIIA (Ac's-DNA/LL-37) que posteriormente son endocitados y dirigidos hacia los endosomas (17, 53). En los endosomas, los ácidos nucleicos propios son

reconocidos por TLR-7 y TLR-9 conllevando a la activación de la pDC por la activación de la vía de MyD88-IRF7, llevando así a la producción de IFN-I (3, 57, 59). Las pDC tienen una alta expresión constitutiva del factor de transcripción IRF7 y esto es uno de los mecanismos que dotan a las pDC de su potencial para la rápida producción de IFN-I (3, 57). La vía de MyD88 también activa al complejo proteico NF- κ B y la vía MAPK para la producción de citocinas inflamatorias, quimiocinas y moléculas coestimuladoras (9, 59). También se han descrito que la pDC presenta varias moléculas inhibitoras que regulan la producción de IFN-I como BDCA-2, ILT7, Fc ϵ RI α , Nkp44 las cuales interfieren con la señalización de TLR-7 y TLR-9 (Fig. 4) (3, 59).

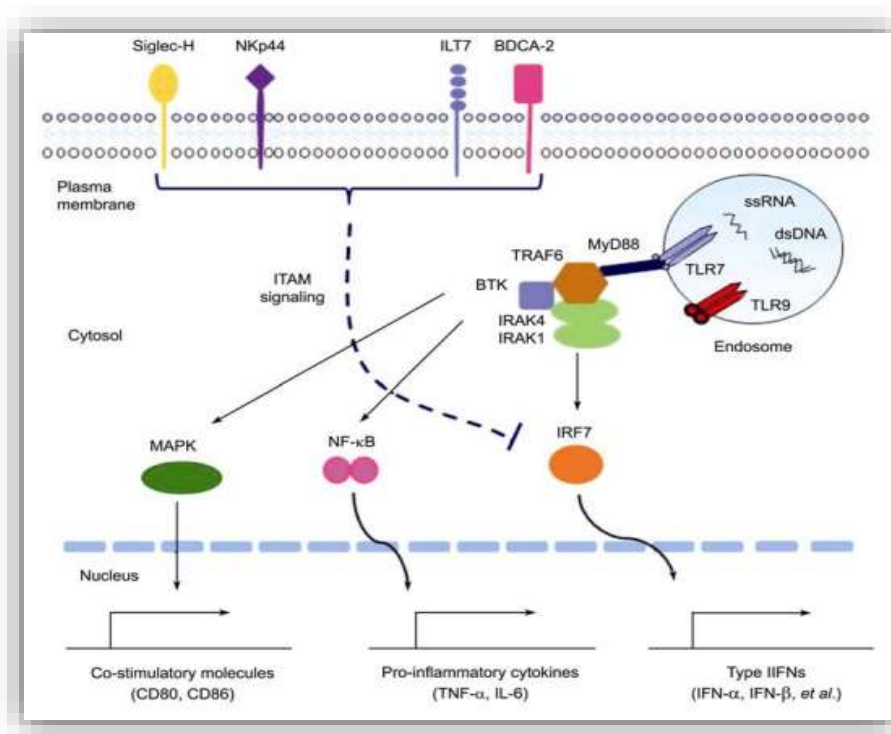


Fig. 4 Vía de activación de pDC en respuesta a ácidos nucleicos.

La exposición a ácidos nucleicos transloca TLR-7 y TLR-9 a los endosomas para que se lleve a cabo el reconocimiento de ssRNA o dsDNA que conduce a cambios conformacionales en los TLRs y conducen a la activación de MyD88. Se forma un complejo de señalización multiproteico que incluye a MyD88, BTK, TRAF6, IRAK1 e IRAK4, este complejo activa las MAPK's y los factores transcripcionales NF- κ B e IRF7. Los factores de transcripción se translocan al núcleo e inician la transcripción de IFN-I, citocinas proinflamatorias y moléculas coestimuladoras, sin embargo, la pDC expresa algunos receptores reguladores en su superficie como BDCA-2, ILT7, Nkp44 y Siglec-H los cuales inhiben la producción de IFN-I a través de la vía de señalización ITAM (9, 59).

Las pDC pueden madurar por vías distintas a la señalización de TLR, tales como la unión de los receptores similares a dominios de oligomerización de unión a nucleótidos, gen I inducible por ácido retinoico, gen 5 asociado a diferenciación de melanoma, activador dependiente de DNA de factores reguladores de interferón, receptores lectina tipo C, CD40L y receptores de citocinas y quimiocinas (28).

El IFN-I producido por las pDC es una citocina pleiotrópica que tiene diversas funciones como incrementar la citotoxicidad de las células NK, favorecer la maduración de las mDC al inducir el incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras y MHC-II, diferenciación de monocitos, diferenciación de LB a células plasmáticas productoras de anticuerpos, promueve respuesta de linfocitos Th1, estimula a la misma pDC y mDC al mecanismo de presentación cruzada para favorecer la activación de LT CD8 y favorecen la inducción de NET's en los neutrófilos (3).

Como es bien descrito la función primordial de las pDC es la respuesta inmune antiviral inhibiendo la replicación viral. IFN-I induce señales a través del receptor de IFN activando la transcripción de genes para producir PKR (proteína cinasa de serina/Treonina) la cual bloquea la transcripción y traducción vírica; la 2' 5' oligoadenilato sintetasa y la RNasa L18 y L19 que promueven la degradación del RNA vírico confiriendo a las células mayor resistencia generando el "estado antivírico" (3). Sin embargo, también efectúa mecanismos de defensa contra bacterias, hongos y parásitos. Se ha demostrado que la pDC reconoce bacterias Gram positivas y Gram negativas y responden con una sobrerregulación de IFN y moléculas coestimuladoras, las pDC interactúan directamente con LB a inducir IL-10 en respuesta a *S. aureus*. El papel de las pDC en infecciones fúngicas es indirecto produciendo IFN-I y TNF- α y directo a través de la secreción de calprotectina y lactoferrina capaz de quelar cationes divalentes necesarios para el crecimiento del hongo. Recientemente se ha descrito que las pDC en presencia de *A. fumigatus* secreta "trampas extracelulares de pDC" (pET's) formados por DNA y la histona citrulinada H3, estas pET's tienen una estructura similar a las NET's.

Estas pET's se ensamblan con péptidos antimicrobianos que conducen a muerte de los microorganismos que no pueden fagocitar (32).

La función primordial de las pDC esta mediada por la producción de IFN-I, sin embargo, también posee capacidad de célula presentadora de antígeno, la cual no es igual a la de las cDC, pero es mayor a comparación de los LB (28). Esta función como APC en las pDC se favorece mayoritariamente una vez activadas con poly I:C, DNA u oligodeoxinucleotidos (ODNs) ya que aumenta su expresión de moléculas coestimuladoras, HLA-DR e incrementa su capacidad migratoria, todo esto mejorando su función para activar LT vírgenes eficientemente y por ende dar respuestas de proliferación, favoreciendo una polarización de LT a Th2 y Th1, por lo tanto las pDC maduras adquieren función de APC e inducen inmunidad específica de antígeno (4, 28, 30). Las principales citocinas y moléculas que median la migración de la pDCs sitios de inflamación y nódulos linfáticos son CD62L, CCR2, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR3 y CXCR4. Así mismo, las pDC también migran en respuesta a receptores ChemR23, adenosina, C3a y C5a, estos últimos, liberados en los sitios de inflamación (4, 57).

1.3 PLASTICIDAD DE LAS pDC Y SU PAPEL EN TOLERANCIA E INMUNIDAD.

De igual manera a lo descrito en cDC sobre la plasticidad y su capacidad de efectuar respuestas inmunogénicas y tolerogénicas, las pDC también se comportan de la misma manera mostrando una gran plasticidad funcional, orientando la inmunidad hacia múltiples perfiles dependiendo de las señales circulantes. Si bien dentro del rol inmunogénico de pDC se ha descrito primordialmente la producción de IFN-I por activación de los TLR-7/9, estas pDC de igual manera poseen capacidades como APC presentando antígenos a las LT CD4⁺ pero dependiendo de su estado de maduración y del microambiente pueden generar una respuesta de activación (Inmunogénica) o de tolerancia. En casos de activación alternativa o sin estímulo las pDCs expresan Indolamina 2-3 dioxigenasa (IDO), PD-L1, TRAIL, OX40L, ICOSL y Granzima B, lo cuales promueven tolerancia a tumores, aloantígenos y

antígenos inofensivos. Por lo tanto, se ha establecido que las pDC son potentes inductores de Tregs (7, 57).

Así mismo, debido a su plasticidad funcional y capacidad inmunomoduladora, también se ha relacionado ampliamente a las pDC en la fisiopatogenia de algunas enfermedades autoinmunes asociadas a la presencia de autoanticuerpos anti-ADN y anti-nucleares, así como a una alta concentración de IFN-I circulante. Dichas enfermedades incluyen al Lupus Eritematoso Sistémico y Psoriasis, en las cuales se les relaciona debido a la presencia de una intensa activación de pDC con autoantígenos tales como inmunocomplejos con ácidos nucleicos propios o bien por NET's, generando estos una alta producción y secreción de IFN-I potenciando una activación sostenida e induciendo la pérdida de tolerancia y mecanismos de regulación.

Por otra parte, las pDC desempeñan un papel fundamental en la inmunidad antitumoral a través de su capacidad para la presentación cruzada de antígenos tumorales a los LT e inducir una respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, bajo condiciones de un ambiente tumoral, se ha descrito mayormente el rol tolerogénico de las pDC al contribuir a la progresión del mismo, debido a la producción y liberación de moléculas pro-apoptóticas como Granzima B. Por lo anterior, se ha relacionado la infiltración de pDC con un mal pronóstico en tumores. Las pDC que migran al microambiente tumoral posteriormente promueven una polarización de LT a Th2 proinflamatorios y Tregs, al igual inducen un perfil inmune regulatorio a través de la expresión de ICOSL y OX40L, esto por la frecuente secreción de IL-5, IL-13 e IL-10 en el microambiente tumoral. El mecanismo que suprime la producción de IFN-I y de la capacidad Inmunogénica de la pDC en el tumor es mediante las citocinas TGF- β y TNF- α derivadas de las células tumorales (3, 17, 30).

1.4 MECANISMOS DE REGULACION EN pDC.

La participación de las pDC en el sistema inmune innato incluye la existencia de varios mecanismos para discriminar entre la presencia de ácidos nucleicos exógenos derivados de patógenos para activarse, de los ácidos nucleicos propios para evitar su activación. Dichos mecanismos incluyen la localización subcelular de TLR-7 y TLR-9 en vesículas endosomales, las altas concentraciones de DNAsa y RNAsa en el ambiente extracelular, las metilaciones que contribuyen a cubrir los motivos CpG del DNA propio y la concentración de estímulo requerida para activar a los TLRs de las pDC (57, 59). Por lo tanto, a continuación, se profundizará en aquellos mecanismos de inducción de tolerancia que se activan una vez que los mecanismos mencionados han sido superados. Los principales mediadores para la función tolerogénica de las pDC que se han descrito, han sido bajo microambientes tumorales y sonIDO, PD-L1, TRAIL, OX40L, ICOSL y Granzima B.

IDO es una enzima intracelular que cataliza la degradación del triptófano el cual es un aminoácido esencial para la supervivencia y procesos celulares. La degradación del triptófano conlleva a la producción de quinurenina y otros metabolitos. La depleción de triptófano induce arresto del ciclo celular de LT e incremento de sus apoptosis. La quinurenina y los demás metabolitos del triptófano son tóxicos para los LT, la quinurenina activa la transcripción de AhR (receptor de hidrocarburos de arilo) el cual induce la diferenciación y expansión de LT efectores a LTR (10, 15, 24, 39).

ICOSL tiene un rol importante en la interacción pDC/LT y participa en la polarización de LT CD4⁺ a Tregs productores de IL-10, favorece la amplificación y capacidad inmunosupresora de Tregs (18, 35), o la producción de TGF- β e IL-6 promueve la actividad y polarización de LTR y Th17 concomitantemente.

TRAIL, PD-L1 y Granzima B son factores inmunorreguladores que dotan a las pDC con capacidad citotóxica que inducen apoptosis en células blanco y suprime la proliferación celular (25, 57).

A pesar de que se conocen algunas moléculas en las pDC involucradas en sus propiedades de inmunoregulación, aún existe un vacío en la identificación de los mecanismos particulares mediados por cada uno de los factores mencionados.

Además, como se ha mencionado, están principalmente descritos en procesos tumorales. Por lo anterior, prevalece la necesidad de identificar y describir la participación de moléculas y sus mecanismos que pudiesen estar participando en la inmunomodulación de las pDC bajo condiciones homeostáticas o de activación bajo ambientes inflamatorios. Un mecanismo de regulación que se ha descrito en Tregs y que es factible de analizar por su amplia distribución en células del sistema inmune es el halo purinérgico, el cual está conformado por las ectoenzimas CD39/CD73.

1.5 HALO PURINÉRGICO CD39/CD73 COMO MECANISMO DE REGULACIÓN

Los Tregs (CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺) son una subpoblación de LT cuya función es la regulación e inhibición de la respuesta inmune. Los mecanismo de inmunosupresión e inducción de tolerancia de estas células son la producción y secreción de citocinas antiinflamatorias como IL-10, TGF- β e IL-35; la eliminación de células blanco a través de Granzima y perforina, la expresión de moléculas de superficie como CTLA-4 y disrupción metabólica a través de la catálisis de ATP y generación de adenosina (5, 16, 33).

El ATP es un metabolito esencial para la vida, en condiciones normales se localiza de manera intracelular. Sin embargo, el ATP puede ser liberado en altas concentraciones a partir de células malignas, daño celular, estrés celular e hipoxia. Este ATP extracelular es un DAMP que modula el microambiente inflamatorio mediante señales purinérgicas. El ATP se une a receptores purinérgicos (P2XR y P2YR). Para regular las altas concentraciones extracelulares, el ATP se hidroliza para generar adenosina, la cual posee efectos de supresión. Este mecanismo está a cargo de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 (*Fig 5*) (1, 12, 23).

La ectoenzima CD39 (ecto-nucleosido trifosfato difosfohidrolasa o E-NTPDasa 1), se localiza en la membrana celular con dos dominios transmembranales esenciales (N-terminal y C-terminal) para mantener la actividad catalítica y especificidad de sustrato (11, 16, 22). Se encuentra expresado en Tregs, LB, monocitos, LT

CD4⁺/CD8⁺ y NK. Inicialmente esta molécula fue descrita como un marcador de activación de LB, sin embargo, en la actualidad se ha relacionado mayormente a un rol de inmunosupresión. La principal función de CD39 es hidrolizar ATP hasta convertirlo en AMP (6, 33, 37).

La ectoenzima CD73 (ecto 5´nucleotidasa o Ecto 5´NTasa), es una proteína GPI localizada en la membrana celular. Posee 3 dominios N-terminal, C-terminal (sitio catalítico) y alfa hélice que une los dominios. La homodimerización de CD73, así como la unión de 2 iones zinc son necesarios para la actividad catalítica. Se encuentra expresada de forma extracelular de 1 – 5% de los Tregs, pero tiene una mayor presencia de manera intracelular. CD73 también se expresa en LB, LT CD4⁺/CD8⁺, NK, endoteliales y células mesenquimales. Esta molécula es altamente inducida por TGF- β , IL-6, IFN-I, ácido retinoico y la forma activa de la vitamina D (1, 5, 6, 11, 22, 41). La función de CD73 es catalizar la reacción terminal que consiste en hidrolizar AMP a Adenosina y fosfato inorgánico. CD73 también existe de forma soluble con una actividad similar a su forma unida (12, 16, 21, 33). Se han descrito incluso otras funciones para CD73 además de la eliminación de ATP, ya que puede participar como molécula coestimuladora para LT y su expresión en células endoteliales puede mediar la unión de linfocitos al endotelio (11).

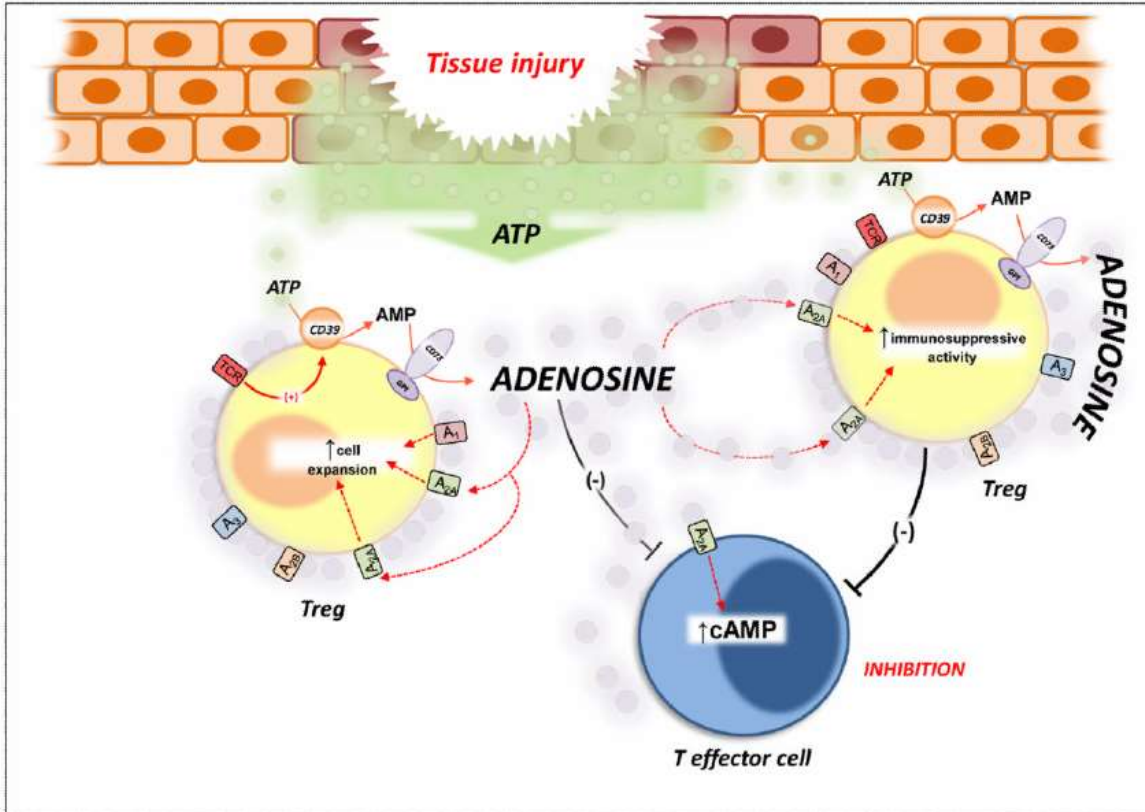


Fig. 5 Mecanismo de "halo purinérgico para la generación de adenosina a partir de ATP.

El ATP liberado al espacio extracelular por daño celular es reconocido e hidrolizado por CD39 para generar AMP, esta molécula es reconocida por CD73 para convertirla en Adenosina. La adenosina es reconocida por los receptores de adenosina (A2a) expresados en LT efectoras y Tregs. La unión adenosina-A2a en LT incrementa las concentraciones de cAMP el cual favorece cambios en la señalización celular inhibiendo la proliferación y funcionalidad de estas células. En Tregs incrementa su capacidad inmunosupresora (6).

Conjuntamente la expresión de CD39 y CD73 se le denomina "halo purinérgico" y se requiere la acción de las ectoenzimas para poder catalizar la conversión del ATP extracelular a adenosina (ADO). Debido a su reducido tiempo de vida media (solo segundos) la adenosina producida tiene un efecto local al ser reconocida por las células circundantes a través de sus receptores [ADORA (A1, A2a, A2b y A3)], los cuales están presentes en varias células como los Tregs y LT. La activación del receptor A2a en LT produce una serie de respuestas que han sido categorizadas como inmunosupresoras (16, 37). En LT efectoras aumenta el cAMP que es un segundo mensajero el cual induce a la activación de proteína cinasa A (PKA) que regula negativamente la activación, proliferación y la producción de IL-2 (Fig. 5). La

señal inducida por PKA bloquea la interacción entre proteínas y la actividad enzimática de diferentes cinasas (ej. la inactivación de Lck), cuyo efecto mantiene inactivo el complejo NF- κ B, afecta vía de las MAPK y fosfolipasas (37). Estos mecanismos son los que conllevan a la inmunosupresión y están mediados por la participación del halo purinérgico, cuyo efector principal es la generación de adenosina, al actuar sobre sus células blanco que expresa receptores de adenosina.

De forma general, la interacción ADO/ADORA (principalmente A2a y A2b) favorece el incremento de cAMP intracelular, que, por una parte, regula la expresión de CD39 extracelular en Tregs (56) y la activación de PKA. Este efecto está involucrado en diferentes vías de señalización favoreciendo el incremento de la capacidad inmunosupresora de los Treg, la inducción de anergia e inhibición de la proliferación de LT y la polarización de DC a fenotipo inmunosupresor (55). Estudios en DC de modelos murinos y derivadas de monocitos humanos han reportado que la señalización de ADO/ADORA induce un fenotipo tolerogénico de DC, ya que hay disminución en la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-12 y TNF- α , pero un incremento de citocinas anti-inflamatorias (IL-10, TGF- β e IDO) y de factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (26, 42). Además se ha reportado que esta DC con características tolerogénicas suprimen y son deficientes en la activación de linfocitos CD8⁺ (13, 26). Lo anterior mencionado deja un panorama claro de la importancia de ADO en los mecanismos de regulación. En resumen, la ADO extracelular es producida principalmente por el mecanismo del halo purinérgico (CD39/CD73) y se ha demostrado la importancia de este mecanismo en Tregs (56), ahora bien, todo este sistema purinérgico (halo purinérgico, ADO y ADORA) al ser un mecanismo de regulación, sus alteraciones podría estar implicadas en la fisiopatología de algunos trastornos inmunitarios en donde los mecanismos inmunoreguladores estén alterados; como las enfermedades autoinmunes.

Un punto relevante a considerar es que diferentes células pueden tener una expresión variable de CD39 y CD73. Esta expresión diferencial entre células podría ser un factor que influya en la funcionalidad e impacto del halo purinérgico bajo

diferentes condiciones tales como inflamación crónica, tumores, alergias y enfermedades autoinmunes en las cuales participan distintas células.

Knight y colaboradores reportaron el rol del halo purinérgico (CD39/CD73) en la protección contra LES en un modelo murino. Los datos sugieren que la deleción de estas ectonucleotidasas se relacionan con los signos clínicos de la autoinmunidad del LES, tales como la esplenomegalia, niveles altos de anticuerpos anti-ribonucleoproteínas (anti-RNP), expansión de LB, liberación de NET's y niveles altos de DNA libre (27). Por otra parte, la conversión de ATP a ADO por el halo purinérgico en Tregs ha mostrado estar implicada en enfermedades como esclerosis múltiple, artritis y psoriasis. En Psoriasis los Tregs son funcionalmente deficientes en la supresión de la proliferación de LT efectores y se ha observado que un factor relevante para esta circunstancia son las diferencias en frecuencia y expresión de CD39/CD73 en Tregs de individuos sanos y pacientes con psoriasis. Por otro parte, no hubo correlación entre la severidad de la enfermedad y la expresión del halo purinérgico; sin embargo, estos datos sugieren que la menor expresión del halo purinérgico pudo ser un factor en el desarrollo de esta enfermedad (21). Sería importante investigar la relación que pudiese tener la expresión y la funcionalidad del halo purinérgico en otros tipos celulares y como estos podrían estar directamente involucrados en procesos de inmunomodulación en cada célula.

Recientemente Von Glehn et. al evidenciaron la expresión de CD73 en pDC de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple. Estas pDCs fueron puestas en contacto con las células de mieloma múltiple y su análisis reveló la expresión de CD73. Este efecto es descrito bajo un ambiente tumoral y puede deberse al ambiente antiinflamatorio que se genera. A la par, los autores evaluaron su capacidad enzimática a través de la cuantificación de adenosina, para atribuirle el rol a CD73, bloquearon la molécula y observaron una disminución de su concentración (62). Dada las circunstancias del objetivo de este último trabajo, que fue realizado nuevamente bajo un ambiente tumoral y bajo un proceso de selección de pDC de médula ósea que podría incluir la contaminación de AS-DC al no cumplir con los estándares actuales de caracterización fenotípica; en este trabajo se

estableció como objetivo fundamental, la evaluación de la expresión de ambas ectoenzimas del halo purinérgico (CD39/CD73) en pDC de sangre periférica en donadores sanos, con la finalidad de valorar su funcionalidad en un ambiente homeostático y tras su activación. Lo anterior, hacia una perspectiva de evaluar el comportamiento de este mecanismo inmunorregulador en pDC, en procesos patológicos en donde estas células estén involucradas tales como las enfermedades autoinmunes.

1.6 ANTECEDENTES DIRECTOS

Como parte de la línea de investigación de procesos inmunopatológicos involucrados en las enfermedades autoinmunes, en el laboratorio en donde se realizó este proyecto, se ha abordado la participación de las DC y sus características fenotípicas y funcionales que le confieren propiedades tolerogénicas. Como parte de esta línea, se ha hecho el análisis de DC tolerogénicas generadas *in vitro* a partir de monocitos humanos diferenciados en presencia de diferentes combinaciones de citocinas inmunosupresoras (IL-10, IL-10/TGF- β e IL-10/IL-6). El análisis de la expresión genética diferencial y evaluación funcional de algunas moléculas en estas células, reveló la sobreexpresión de varios genes involucrados en su capacidad tolerogénica. Uno de estos genes validados a nivel de proteína fue la ectoenzima CD39, cuya expresión correlacionó con una mayor producción de adenosina en las células dendríticas tolerogénicas producidas en la presencia de IL-10/TGF- β (60).

Estos resultados dieron pauta para evaluar la expresión de CD39 en DC humanas y su probable participación en el balance inmunomodulador de estas células. Por lo anterior, se evaluó y se demostró por primera vez, la expresión de CD39 en pDC humanas de sangre periférica de individuos sanos. Así mismo, al estar estas células involucradas en la fisiopatogenia de varias enfermedades autoinmunes, posteriormente se realizó un análisis comparativo entre individuos sanos y pacientes con LES, pareado en edad y género. Los resultados de este estudio revelaron que la expresión de CD39 es homogénea, fluctuando en una frecuencia

del 20% en pDC de personas sanas; mientras que, en los pacientes con LES, se encontraron dos grupos de pacientes: uno con una expresión de CD39 en pDC similar a los individuos sanos y otro grupo que poseía una mayor expresión de la proteína. Aunque no fue posible evaluar la probable correlación de la expresión de CD39 en pDC con parámetros clínicos de los pacientes, el comportamiento observado pudo haber estado relacionado con el estado de activación de la enfermedad.

Recientemente, se describió la expresión y actividad de CD73 en pDC de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple bajo un ambiente antitumoral (62). Dichos resultados fueron controversiales debido a que el método de purificación de pDC no cumplió con los estándares actuales y dicho análisis pudo haber estado afectado por la presencia de AS-DC que se encuentran más representadas en médula ósea.

Dadas las evidencias actuales, y la relevancia del halo purinérgico (CD39/CD73) como mecanismo inmunoregulador en múltiples células del sistema inmune, prevalece la necesidad de evaluar su expresión y funcionalidad en pDCs humanas.

1.7 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las DC son células presentadoras de antígeno con alta plasticidad para poder modular tanto respuestas inmunes tolerogénicas como inmunogénicas. En la actualidad, se han descrito diversos mecanismos que participan en la modulación de estas respuestas. Sin embargo, las DC están conformadas por varias subpoblaciones dentro de las cuales el objeto de estudio de este proyecto son las pDC. Las pDC están especializadas en la respuesta inmune antiviral con la producción de altas cantidades de IFN-I sin embargo esta misma característica las ha involucrado en el desarrollo de varias patologías en los que se sugiere una posible alteración en sus mecanismos de regulación. Existen diversos mecanismos de regulación tales como IDO, IL-10, TGF- β y la producción de adenosina que se han descrito en otras células del sistema inmune como en los Tregs principalmente. En particular, la generación de adenosina a partir de ATP se da a través del halo

purinérgico (CD39/CD73), inhibiendo la proliferación de LT. Este último mecanismo no se ha sido descrito en las pDC. En un trabajo previo de nuestro laboratorio se demostró por primera la expresión en pDC de una de las ectoenzimas del halo purinérgico (CD39) y se puso en evidencia su expresión diferencial en pDC de sangre periférica de pacientes con LES, Por lo tanto prevalece la necesidad de evaluar la expresión y funcionalidad de ambas moléculas del halo purinérgico para catalizar la conversión de ATP a adenosina en pDCs de sangre periférica, así como su contribución en las capacidades inmunomoduladoras sobre LT de estas células.

1.8 JUSTIFICACIÓN

Las pDC están involucradas en la respuesta inmune antiviral debido a su alta expresión de TLR-7 y TLR-9 que reconocen ssRNA y dsDNA (CpG) respectivamente y alta secreción de IFN- α . Por otra parte estas mismas características favorecen su participación en la pérdida de tolerancia a autoantígenos en algunas enfermedades autoinmunes. A pesar del amplio conocimiento de moléculas que participan en la función inmunomoduladora de las pDC, aún persisten vacíos funcionales que podrían ser descritos.

Recientemente, bajo un método de purificación de células de médula ósea que podría incluir la presencia de AS-DC, se reportó la expresión de CD73 y su capacidad para producir adenosina en pDC de pacientes con mieloma múltiple.

Antecedentes directos en nuestro laboratorio puso en evidencia una mayor expresión de CD39 en DC derivadas de monocitos con función tolerogénica y se describió la expresión de CD39 en pDC obtenidas de donadores sanos y pacientes con LES.

Dado que el halo purinérgico (CD39/CD73) es un mecanismo de inmunosupresión descrito en células T reguladoras (Tregs) y se distribuye ampliamente en células del sistema inmune, surge la necesidad de analizar su expresión y funcionalidad con el

fin de determinar su contribución en la actividad inmunomoduladora de las pDCs humanas de sangre periférica.

1.9 HIPÓTESIS.

El halo purinérgico (CD39/CD73) se expresa y participa en la actividad inmunomoduladora de las pDCs humanas de sangre periférica.

2. OBJETIVOS.

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Analizar la expresión y funcionalidad del halo purinérgico (CD39/CD73) en la actividad inmunomoduladora en pDC humanas de sangre periférica.

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Analizar la presencia de CD73 y su coexpresión con CD39 en pDC de donadores sanos.
2. Evaluar la expresión de las moléculas CD39/CD73 en pDC tras su activación con un agonista de TLR-7 (R848).
3. Cuantificar la producción de adenosina como producto de la actividad enzimática del halo purinérgico en pDC.
4. Evaluar la contribución del halo purinérgico en la actividad inmunomoduladora de las pDC.

3. ASPECOS METODOLÓGICOS

3.1 DISEÑO DE TECNICAS DE RECOLECCION DE INFORMACION.

Para el desarrollo de este trabajo se realizó una revisión bibliográfica, análisis experimental, observación y deducción.

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.

Debido a que no se trata de un estudio epidemiológico, sino descriptivo y observacional, el número de individuos analizados estuvo limitado a la descripción reproducible de los fenómenos analizados en células humanas:

Población:

- 19 donadores sanos

Muestra: 200 ml de sangre total periférica con EDTA.

50 ml de sangre total periférica con Heparina.

3.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Personas sanas, sin manifestaciones clínicas de alguna enfermedad autoinmune, ni alguna otra enfermedad inflamatoria asociada al momento de la toma de muestra.
- Valores de Proteína C Reactiva (PCR) $\leq 0,3$ mg/dL.
- Parámetros normales en un estudio de Biometría Hemática Completa.
- Autorización mediante la firma del consentimiento informado.

3.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Individuos con afecciones, neoplasias u otra enfermedad crónica o que cuenten con antecedentes familiares de alguna enfermedad autoinmune.
- Valores de Proteína C Reactiva (PCR) superiores $\geq 0,3$ mg/dL.
- Parámetros alterados en un estudio de Biometría Hemática Completa.
- Personas que no autoricen su participación en el estudio.

3.2.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

Toda complicación técnica y metodológica que impida garantizar la conservación y procesamiento de las muestras o toda condición experimental que revele la presencia de alguna inflamación subclínica que impida la interpretación de los resultados.

3.3 TIPO DE ESTUDIO.

Observacional, Descriptivo, Analítico, Experimental, Evaluativo y Transversal.

3.4 TÉCNICAS DE ANÁLISIS

3.4.1 Obtención de muestra.

Se obtuvieron 200 ml de sangre periférica con anticoagulante (EDTA) de 17 donadores para aislamiento de pDC y 50 ml de sangre periférica con anticoagulante (Heparina) de 2 donadores para aislamiento de linfocitos T. Las muestras obtenidas fueron bajo consentimiento informado y autorización de los donadores sanos voluntarios (*Anexo 10.1*). Se realizaron biometrías hemáticas (*Anexo 10.2*) y proteína C reactiva para descartar procesos inflamatorios en los donadores de muestras.

3.4.2 Purificación de PBMC.

Las PBMC se obtuvieron de sangre periférica por un gradiente de densidad Ficoll (1,077 g/l, Lymphoprep), este se sometió a centrifugación (320g / 30min / T° ambiente). Después de la centrifugación, las PBMC se localizaron en la interface por encima de los eritrocitos.

Se realizaron lavados a las PBMC con D-PBS 1x (Dulbecco's PBS, Caisson Labs) para remover el exceso de Ficoll, esto sometiendo a centrifugación (300g / 10min / T° ambiente). El número de células y la viabilidad fueron evaluados con Azul de Tripano (0.4%, Sigma).

3.4.3 Aislamiento de pDC y linfocitos T CD4⁺.

Para el aislamiento de pDC se realizó la separación magnética por sistema MACS (Magnetic Cell Sorting) con selección positiva, las PBMC se marcaron con el kit de anticuerpo asociado a microesferas magnéticas [CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) MicroBead Kit human, Miltenyi Biotec].

Los linfocitos CD4⁺ fueron aislados de PBMC con el sistema MACS por selección negativa (CD4⁺ T Cell Isolation Kit human, Miltenyi Biotec). Al finalizar la separación se realizó conteo celular y se evaluó la viabilidad de las células con azul de tripano 0.4%.

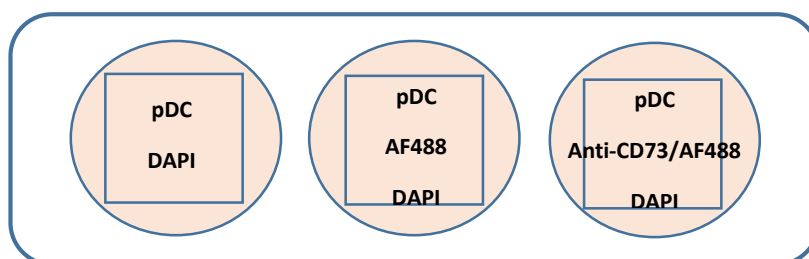
3.4.4 Análisis fenotípico e identificación de CD73 y su coexpresión con CD39 en pDC.

Las pDC aisladas se marcaron con 7-AAD para evaluar viabilidad, para su análisis fenotípico se marcaron con mAb de linaje BDCA-2/FITC (clona IS5-21F5, Miltenyi Biotec), CD123/Alexa Fluor 700 (clone 6H6, BioLegend) y CD4/VioBlue (clone REA623, Miltenyi Biotec); CD33/APC (clone REA775, Miltenyi Biotec) para pre-DC; para evaluar maduración y activación con CD40/PE (clona HB14, Miltenyi Biotec); y el marcador de interés CD73/Pacific Blue (clona AD2, BioLegend) para evaluar su co-expresión con CD39/APC (clona REA739, Miltenyi Biotec) del Halo Purinérgico por citometría de flujo (MACSQuant 10, Miltenyi Biotec). El marcaje de las pDC con los anticuerpos se realizó en Buffer FACS (azida de sodio 1% y plasma descomplementado 10% en D-PBS), 15 min/4°C/oscuridad. Se fijaron las células con buffer de fijación (paraformaldehído 2% en D-PBS), conservándose en frío y protegidos de la luz hasta su análisis. Los datos fueron analizados en el software FlowJo Tree Star (BD).

3.4.5 Identificación de CD73 en pDC por microscopia de fluorescencia.

En placa de 24 pozos se depositaron cubreobjetos (10x10 mm) previamente tratados con alcohol etílico al 70%, en la placa se agregó D-PBS, posterior a 15 minutos fue retirado, colocamos 10 µl de Poly-L-Lysine 0.01% (Sigma) sobre cada cubreobjeto para favorecer la adherencia de las células. Una vez seco los cubreobjetos, irradiamos la placa con UV/15 min. 2x10⁴ pDCs resuspendidas en 300

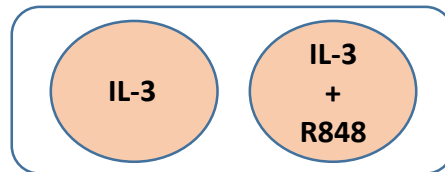
µl medio de cultivo RPMI 1640 (Corning) suplementado (10% FBS, 2mM L-glutamina, 1mM piruvato de sodio, 10mM aminoácidos no esenciales, 1% antibiótico/antimicótico and 2-β mercaptoetanol 50nM) fueron colocados en cada pozo con cubreobjetos. Incubamos 1h/37°C/5% CO₂. Retiramos medio de cultivo y agregamos 300 µl de buffer de fijación (paraformaldehído 4% en D-PBS) 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con D-PBS agregando posteriormente buffer de bloqueo (plasma descomplementado 10% en D-PBS) 1h temperatura ambiente. Para la tinción intracelular se permeabilizaron las células con Tritón X-100 0.1% 10 minutos, se lavaron los pozos y posteriormente se agregó buffer de bloqueo. Para el marcaje se añadió el anticuerpo primario Anti-CD73 (Clona 7G2, Abcam) en una relación 1:50 y posteriormente el anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 (marca) en relación 1:400 en buffer de tinción (albumina 1% en D-PBS) ase incubo toda la noche. Se realizaron lavados para retirar el exceso de anticuerpo y los cubreobjetos fueron colocados en portaobjetos con 3 µl de solución de montaje Fluoroshield con DAPI (Sigma). Se cubrió con esmalte las orillas y se conservó a -20°C. En el microscopio de fluorescencia Observer.Z1 (Zeiss) se realizó la captura de las imágenes en 5 puntos de cada cubreobjetos (4 extremos y el centro). El análisis de las imágenes se realizó en el software Fiji ImageJ.



3.4.6 Estimulación de pDC con R848 (agonista TLR-7).

Las pDC (2×10^4 células) fueron resuspendidas en medio de cultivo RPMI1640 (Corning) suplementado (10% FBS, 2mM L-glutamina, 1mM piruvato de sodio, 10mM aminoácidos no esenciales, 1% antibiótico/antimicótico and 2-β mercaptoetanol 50nM) en placa de 96 pozos. Para inducir la activación de las pDCs, estas fueron pulsadas con R848 (2.5 µg/ml, Invivogen). Para favorecer la

sobrevivencia de las pDC en todos los tratamientos se agregó IL-3 (10 ng/ml, Miltenyi Biotec). Estimulación se realizó incubando 24 h / 37 ° C / 5% CO₂.



Las pDC sin estimulación o recién purificadas, las pDC con IL-3 y las pDC estimuladas fueron recolectadas para su análisis por citometría de flujo (CD40, CD39 and CD73).

3.4.7 Cuantificación de IFN- α .

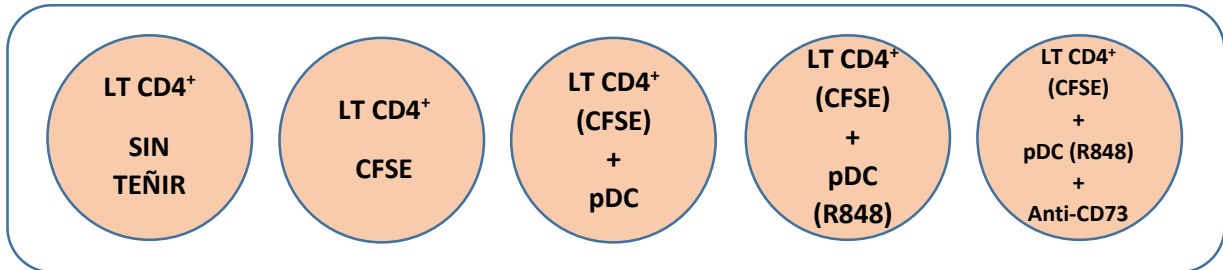
Después de 24 horas de estimulación de las pDC en cultivo, el sobrenadante fue recolectado y almacenado a -20°C hasta la detección de IFN- α (Invitrogen) por ELISA de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

3.4.8 Cuantificación de adenosina.

Para evaluar la actividad enzimática del halo purinérgico, el primer paso fue la determinación del punto máximo de expresión de CD73 en las pDC estimuladas con R848 por medio de una cinética. Ya establecido el tiempo óptimo de mayor expresión de CD73, 5×10^4 pDCs se sometieron a dos condiciones, en ausencia y presencia de anticuerpo neutralizante anti-CD73 (10 μ g/ml, Clona 7G2, Abcam) en medio de cultivo incubando 1h/37°C/5%CO₂, terminado el tiempo de incubación se realizó lavado para eliminar el exceso de anticuerpo y posteriormente se adiciono ATP (100 μ M, Sigma) a pDC resuspendidas en medio de cultivo suplementado sin 2- β mercaptoetanol incubando 1h/37°C/5%CO₂ para la generación de adenosina. Los sobrenadantes fueron recolectados para realizar el ensayo de detección de adenosina (Cell Biolabs) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La cuantificación de adenosina fue determinada por fluorometría (Synergy™ HTX).

3.4.9 Proliferación y activación de linfocitos T.

Linfocitos T CD4⁺ aislados de las PBMC fueron teñidos con CFSE (10 μ M, Invitrogen) para evaluar proliferación por el método de dilución de CFSE por citometría de flujo. Para la reacción leucocitaria se co-cultivaron linfocitos T teñidos con pDC alogénicas sin estimular, estimuladas con R848 y estimuladas con tratamiento de anticuerpo neutralizante anti-CD73, en una relación 1:5 [pDC (20,000: linfocitos T (100,000)] incubando por 5 días/37°C/5%CO₂.



Para analizar el estado de activación de los linfocitos T, posterior al cocultivo las células fueron recolectadas y marcadas con CD25/PE (clona 2A3, BD Bioscience) para su análisis por citometría de flujo (LSRFortessa™, BD Biosciences).

3.4.10 Análisis estadístico.

- * Estadística descriptiva mediante análisis de frecuencias, promedio y desviación estándar para variables cuantitativas.
- * Test de normalidad de Shapiro-Wilk y prueba de rango con signo de pares emparejados de Wilcoxon para datos no paramétricos.
- * Para analizar y graficar fue usado el software GraphPad Prism 7.0.

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento de células dendríticas plasmacitoides humanas de sangre periférica.

Posterior a la separación magnética, la viabilidad y conteo de las células se realizó con el fin de determinar el número de células a teñir con anticuerpos fenotípicos para su análisis por citometría de flujo.

4.1.1 La separación magnética doble incrementa la pureza de las pDC obtenidas, sin afectar su viabilidad.

Para el aislamiento de las pDC se realizó la separación magnética por selección positiva con BDCA-4. Además, considerando que posterior a la caracterización fenotípica se realizarían ensayos funcionales, se decidió realizar una simple y una doble separación magnética para evaluar las diferencias en el incremento de pureza de estas células. El análisis se llevó a cabo por citometría de flujo en el MACSQuant 10 (Miltenyi Biotec), los datos obtenidos en formato mqd se analizaron en Flowjo software. Se evaluó el marcador fenotípico en pDC BDCA-2.

- Resultados de una separación magnética

El análisis de un total de 10 aislamientos de pDC utilizando solo una separación magnética selección positiva revelaron la obtención de una población claramente definida como células BDCA-2⁺ con un porcentaje promedio del 55.59 % (± 19.4) con una MFI de 8.9 (± 2.8). (*Fig. 6*) Estos resultados indicaron que una sola purificación es suficiente para aislar las células para el análisis fenotípico (CD40, CD39 y CD73), pero pusieron de manifiesto la necesidad de incrementar la pureza para la realización de ensayos funcionales.

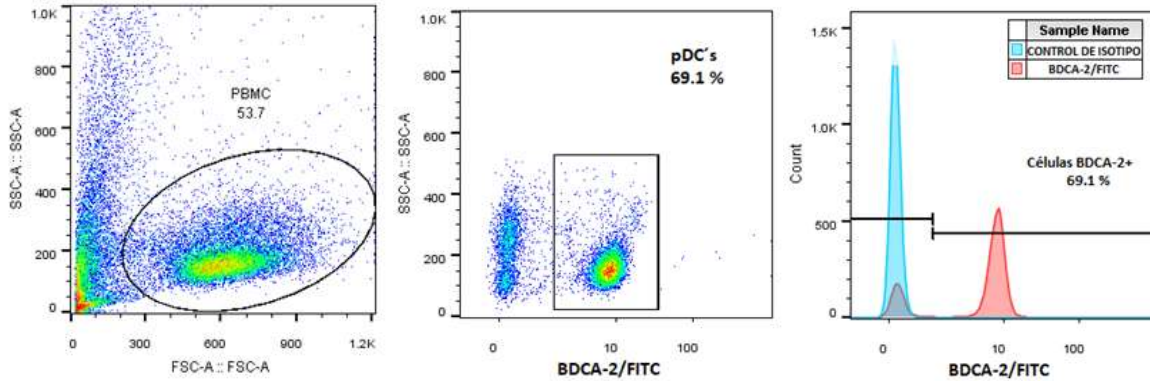


Fig. 6 Expresión BDCA-2+ en pDC aisladas de una separación magnética.

Dot plot e histogramas representativos de 10 experimentos.

Considerando que el número de pDC en sangre periférica es relativamente bajo (0.2 % de las PBMC), se complica la obtención de una población con alta pureza, y enfocándose hacia el objetivo de incrementar la pureza para posteriores ensayos funcionales, se optó por realizar una segunda separación celular magnética positiva.

- Resultados de la doble separación magnética.

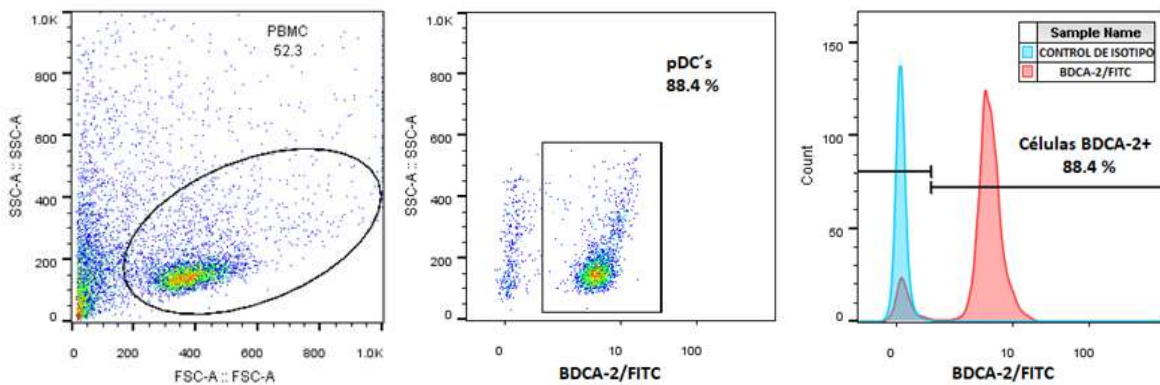


Fig. 7 Expresión BDCA-2+ en pDC aisladas de doble separación magnética.

Dot plot e histogramas representativos de 4 experimentos.

El análisis de 4 aislamientos de pDC realizando una doble separación se obtuvo en promedio un porcentaje de células BDCA-2+ de 88.12% (± 2.02) y una MFI de 6.29

(± 2.61). (Fig. 7) Estos resultados indican que se obtiene un incremento en la pureza y es óptima para los ensayos funcionales posteriores.

Con la finalidad de evaluar el efecto sobre la viabilidad de uno o dos procedimientos de separación magnética, se evaluó este parámetro por el método de exclusión con azul de tripano, revelando una viabilidad de $99.0\% \pm 1$ por separación simple y de 99.0 ± 3 en los procesos de separación doble, sin diferencias significativas entre ambos métodos.

4.1.2 El análisis de tamaño y complejidad de las pDC purificadas de sangre periférica revela la presencia de dos poblaciones BDCA-2+.

En las pDC obtenidas por una simple y doble separación se observó un fenómeno reproducible, la presencia de dos poblaciones de células BDCA-2+ (pDC), una de menor complejidad “pDC A” y otra de mayor complejidad “pDC B” (Fig. 8). El porcentaje promedio correspondiente a pDC A es 96.5% y para pDC B 3.5% de células BDCA-2+, y respecto a la expresión promedio de BDCA-2 en la población de menor complejidad 8.65 (± 5.14) y en la población de mayor complejidad 12.59 (± 6.77). Los resultados indican una mayor expresión de BDCA-2 en las pDC de mayor complejidad. Además, la subpoblación de mayor complejidad se ha denotado mayormente definida en algunos experimentos lo que sugiere que la presencia de esta población varía entre los diferentes individuos.

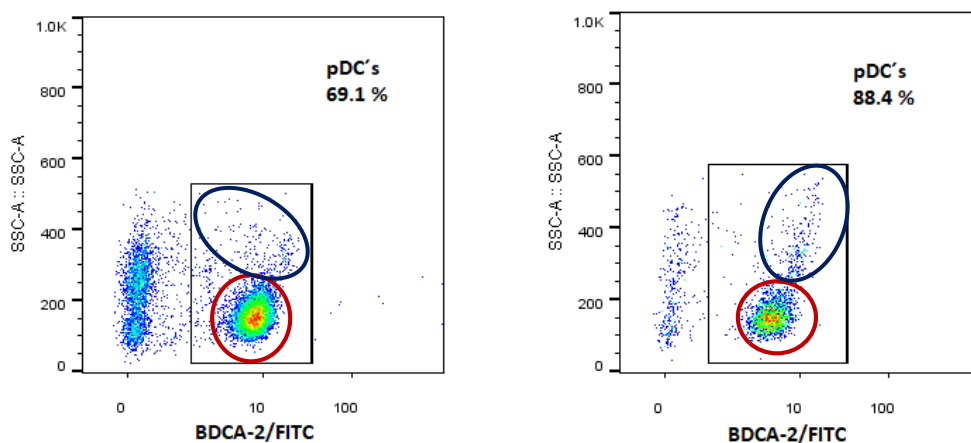


Fig. 8 Dos poblaciones de células BDCA-2+.

De acuerdo a la expresión de BDCA-2 se forman dos poblaciones una de menor complejidad (rojo) y otra de mayor complejidad (azul).

Esta apreciación de las subpoblaciones dio pie a realizar un análisis y establecer si las subpoblaciones se deben a: diferente estado de maduración en las pDC o a la presencia de pDC y AS-DC. Las AS-DC comparten algunos marcadores fenotípicos con las pDC (BDCA-2⁺, BDCA-4⁺ y CD123⁺), a pesar de ello hay marcadores diferenciales en ellas, las pDC presenta mayoritariamente CD4⁺ y las AS-DC son CD33⁺. Por lo tanto, se analizaron estas subpoblaciones en detalle para caracterizarlas y tomar en cuenta los resultados para el análisis de los marcadores de interés (CD39/CD73) de este proyecto.

4.1.3 Las subpoblaciones de células BDCA-2⁺ corresponden a diferentes tipos celulares pDC y AS-DC.

Para la caracterización fenotípica de las subpoblaciones se realizaron separaciones magnéticas simples con BDCA-4. Se establecieron las subpoblaciones basadas en el tamaño y complejidad en las células BDCA-2⁺. Los resultados representativos de 3 experimentos se muestran a continuación. El análisis se realizó en el citómetro FACS Aria III (BD) y se analizaron los formatos fcs en Flowjo software.

Se definen y seleccionan las subpoblaciones BDCA-2⁺ de acuerdo al tamaño y complejidad.

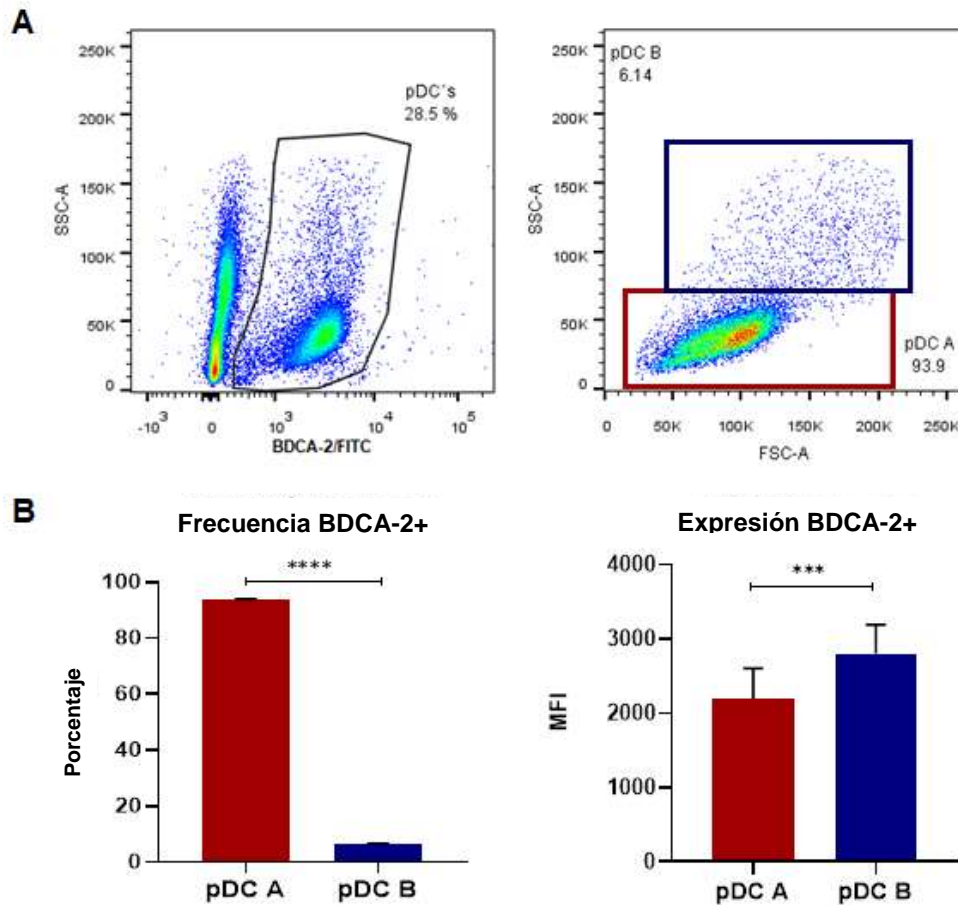


Fig. 9 Análisis de expresión de BDCA-2 en subpoblaciones de pDC.

Se define la población de células BDCA-2⁺ de acuerdo a su tamaño y complejidad, se establecen dos subpoblaciones, una de menor complejidad "pDC A" y otra de mayor complejidad "pDC B" (A). La subpoblación pDC A (rojo) muestra un mayor enriquecimiento del número de células BDCA-2⁺, sin embargo, la subpoblación pDC B (azul) tiene una mayor expresión de la molécula BDCA-2 (B).

En promedio relativo a la frecuencia de BDCA-2⁺, se obtuvo 93.63% (± 0.30) para pDC A y 6.39% (± 0.30) para pDC B, con un valor de $p=1.62 \times 10^{-5}$ ($p < 0.05$ diferencia significativa) Con estos resultados se estableció que la población de menor complejidad esta mayormente enriquecida de células BDCA-2⁺. Sin embargo, la expresión de este marcador mostro una expresión mayor en la subpoblación pDC B. Los datos del promedio de expresión son MFI 2194 (± 407.3) para pDC A y 2769.6 (± 385.5) para pDC B, no hubo diferencia significativa $p=0.007$. A pesar que pDC A esta mayormente enriquecida por células BDCA-2, hay mayor expresión de esta molécula en pDC B.

- **Resultados del análisis de CD123 en las subpoblaciones de pDC.**

CD123 es un marcador fenotípico de pDC, sin embargo, también está presente en células inmaduras como es el caso de AS-DC, por lo tanto, se evaluó este marcador para establecer la población de pDC y tomando en cuenta lo anterior, determinar las diferencias de expresión de CD123 en las subpoblaciones de células BDCA-2.

Se establecieron los controles para CD123 en pDC A y pDC B (*Fig. 10A*), se observó en los *dot plots* que no hay diferencias entre las subpoblaciones en lo respectivo a la frecuencia de CD123 (*Fig. 10B*). De los 3 experimentos realizados, en promedio se obtuvo 97.66% (± 1.88) para pDC A y 96.11% (± 0.85) para pDC B; tampoco hubo diferencia significativa estadística, $p=0.42$. En lo que refiere a la expresión de este marcador, no hubo diferencia significativa estadística $p=0.079$; en promedio se obtuvo una MFI de 588.33 (± 124.61) para pDC A y 1516.66 (± 368.05) para pDC B; sin embargo, se observa una tendencia de mayor expresión de CD123 en la subpoblación de mayor complejidad pDC B (*Fig. 11*).

Ya definida la población fenotípica pDC (BDCA-2+ y CD123+), se analizó el marcador CD40 en estas células. Para el proyecto solo se analizó este marcador para evaluar el estado de maduración de las subpoblaciones de pDC.

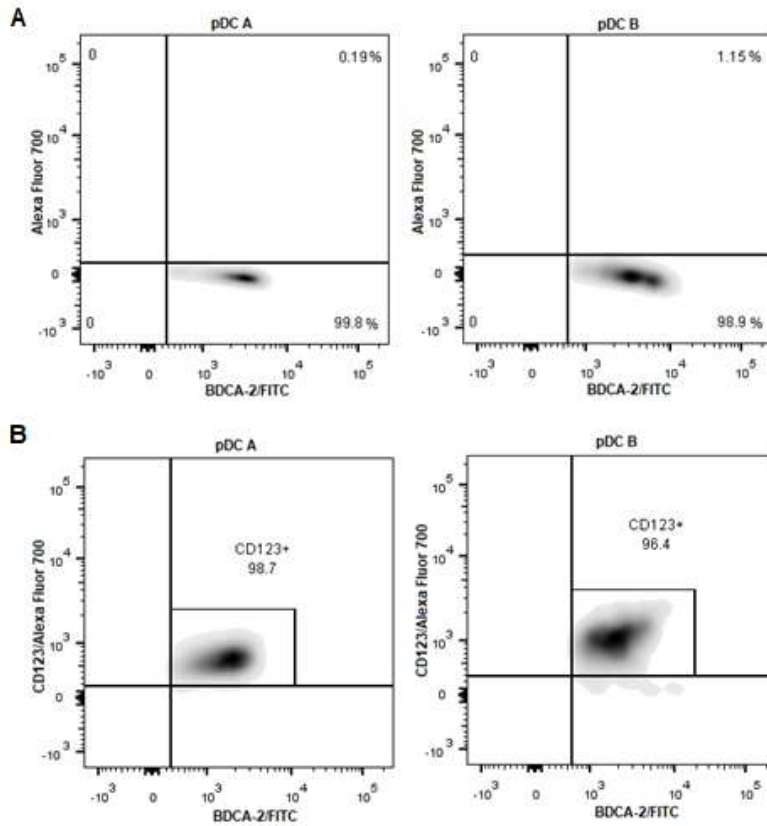


Fig. 10 Frecuencia de CD123 en subpoblaciones de pDC.

A) Dot plots control para CD123 en BDCA-2+ en pDC A y pDC B. B) Células positivas para CD123 en pDC A y pDC B, aproximadamente más del 96 % de las células son CD123+ en ambas subpoblaciones. n=3.

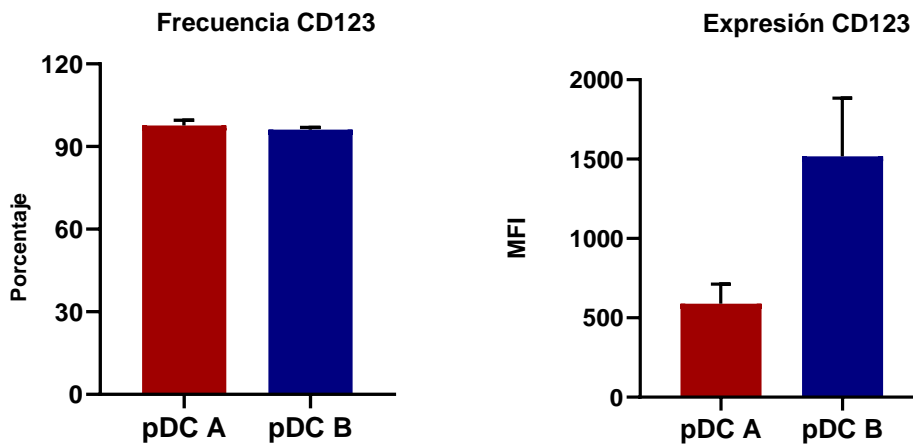


Fig. 11 Frecuencia y expresión de CD123 en subpoblaciones.

La subpoblación pDC A (rojo) y pDC B (azul) no mostraron diferencias en lo respectivo a la frecuencia de CD123+ (grafica izquierda). Relativo a la expresión, no hubo diferencia significativa entre las subpoblaciones, pero se observa una tendencia de mayor expresión de CD123 en la subpoblación pDC B (grafica derecha). n=3.

- **Resultados del análisis de CD40 en las subpoblaciones**

Una de las hipótesis que se establecieron en este proyecto para determinar la posible explicación de las subpoblaciones de pDC, fue que estas subpoblaciones se observan porque las pDC presentan un estado de maduración diferente. Como sabemos durante su trayecto las pDC reciben estímulos que favorecen su maduración lo cual podría generar cambios en su morfología y por ende cambios en tamaño y complejidad.

Para evaluar el estado de maduración evaluamos CD40 en la subpoblación de pDC (BDCA-2+ y CD123+).

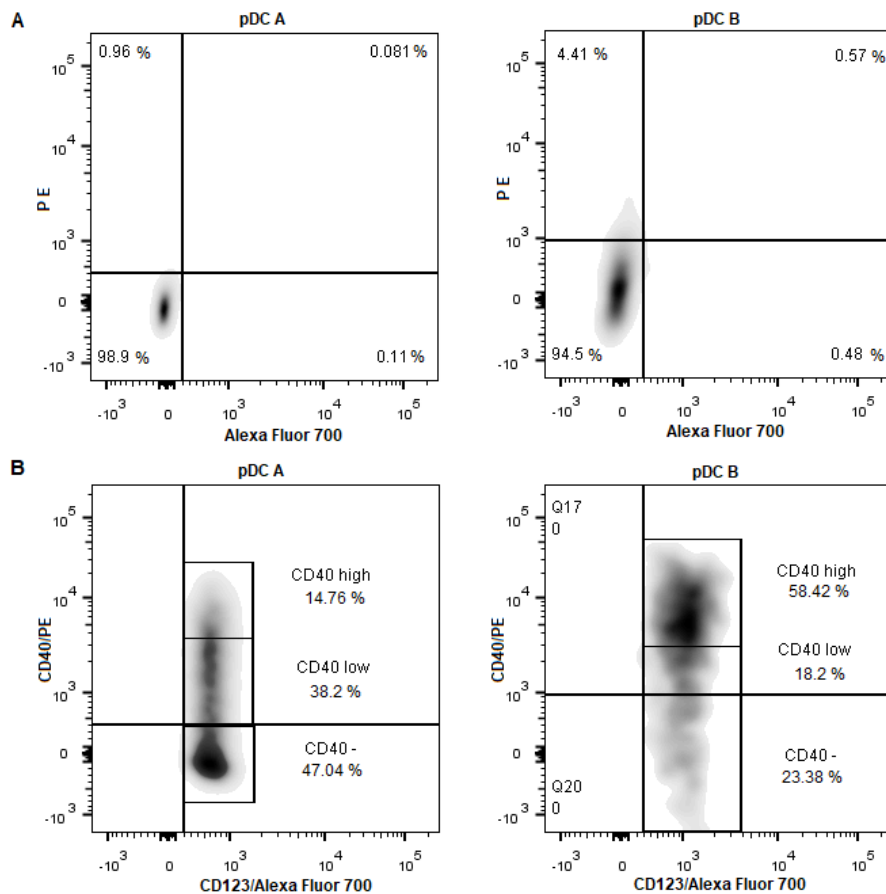


Fig. 12 Frecuencia de CD40 en subpoblaciones de pDC.

A) Dot plots control para CD40 y CD123 en pDC A (izquierda) y pDC B (derecha). B) Dot plots de la frecuencia de CD40 en pDC A y pDC B. La presencia de CD40 fue mayor en la subpoblación pDC A. Se observó diferentes niveles de frecuencia de CD40 en ambas subpoblaciones, por lo tanto, se establecieron los grupos CD40⁻, CD40^{low} y CD40^{high}. n=3.

Para el análisis de CD40 se establecieron los controles para las subpoblaciones pDC A y pDC B (*Fig.12A*). Como se aprecia en los *dot plots* representativos (*Fig.12B*) la presencia de CD40 es mayor en la subpoblación pDC B. Los resultados de la frecuencia de CD40 en promedio se obtuvo 41.47% (± 17.85) para pDC A y 67.11% (± 26.37) para pDC B. No hubo diferencia significativa $p=0.05$ ($p < 0.05$ diferencia significativa). En lo referente a la expresión de CD40 en promedio se obtuvo una MFI de 1102.66 (± 708.63) para pDC A y 6817.66 (± 4353.04) para pDC B, $p=0.13$. A pesar de que no hay diferencia significativa, se observa una tendencia de mayor expresión de CD40 en la subpoblación de mayor complejidad (*Fig. 13*).

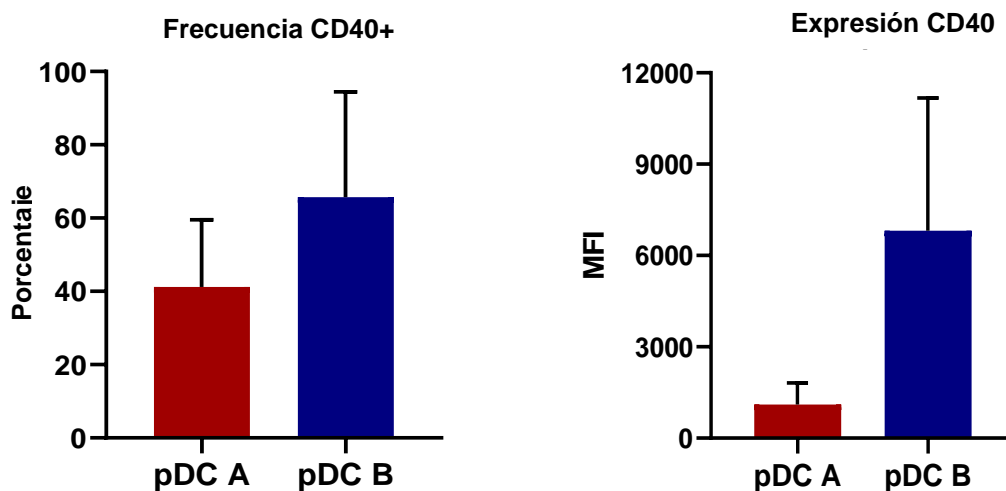


Fig. 13 Frecuencia y expresión de CD40 en subpoblaciones de pDC.

Se observa que entre las subpoblaciones pDC A (rojo) y pDC B (azul) hay una mayor frecuencia de CD40 en pDC B (gráfico izquierdo). Relativo a la expresión de CD40, no hubo diferencia significativa entre las subpoblaciones, pero se observa una tendencia de mayor expresión de este marcador en la subpoblación pDC B (gráfico derecho). $n=3$.

Por otra parte, de los experimentos realizados se evidenció que había diferentes niveles de expresión de CD40 en ambas pDC A y pDC B, por ello se establecieron los grupos de células CD40 negativo (CD40-), CD40low y CD40high (*Fig. 12B*). Los resultados de frecuencia de estos grupos CD40 en pDC A son de 58.39% (17.62) para CD40-, 29.53% (± 15.44) para CD40low y 11.88% (± 2.85) para CD40high; mientras que los resultados en la subpoblación pDC B son 32.89% (± 26.37) para

CD40-, 21.26% (± 11.99) CD40low y 45.80% (± 17.28) CD40high. Cabe mencionar que el grupo de CD40- se encuentra mas enriquecido en la subpoblacion pDC A, caso contrario en pDC B el grupo mas enriquecido es CD40 high.

Con los resultados obtenidos, se sugiere que la subpoblacion pDC B de mayor complejidad pudiese tener un mayor estado de maduracion, sin embargo aun falta valorar la segunda hipotesis pDC vs AS-DC, para esto se evaluaron los marcadores CD4 y CD33 en las subpoblaciones, ademas de considerarse los diferentes niveles de CD40 para este mismo.

- **Resultados del analisis de CD4 (pDC) y CD33 (AS-DC) en subpoblaciones de pDC.**

En los diferente niveles de CD40 (CD40-, CD40low y CD40high) en pDC A y pDC B se analizaron los marcadores CD4 y CD33 para evaluar la hipotesis de pDC vs AS-DC. CD4 se expresa en pDC y CD33 se expresa en otros tipos de DC como AS-DC pero ausente en pDC.

En el analisis general de subpoblaciones se obtuvo en promedio de frecuencia de CD4, 83.06% (± 4.27) para pDC A y 47.24% (± 25.70) para pDC B, no se observo diferencia significativa $p=0.10$ ($p < 0.05$ diferencia significativa). En cuanto a la expresi3n de este marcador se obtuvo en promedio MFI 964.33 (± 357) para pDC A y 1104.33 (± 843.42), de igual manera no hay diferencia significativa $p=0.67$, pero se observ3 una tendencia que pDC A son principalmente c3lulas CD4+ aunque hay una mayor expresi3n de este marcador en pDC B (*Fig. 14A*). En el an3lisis general de CD33 en las subpoblaciones, se obtuvo en promedio de frecuencia 23.96% (± 21.47) para pDC A y 61.76% (± 21.04) para pDC B, $p=0.50$. Relativo a la expresi3n de CD33 en promedio se obtuvo MFI 245.9 (± 292.80) para pDC A y 4196 (± 4184.75) para pDC B, $p=0.22$, no hay diferencia significativa sin embargo se aprecia una tendencia de mayor expresi3n de CD33 en pDC B (*Fig. 14B*). Cabe mencionar que de 3 donadores sanos analizados, dos donadores se comportaron de manera similar en cuanto a la expresi3n de CD33, y el otro donador reporto datos diferente a los dos primeros, esto condujo a una dispersi3n de los datos muy amplia.

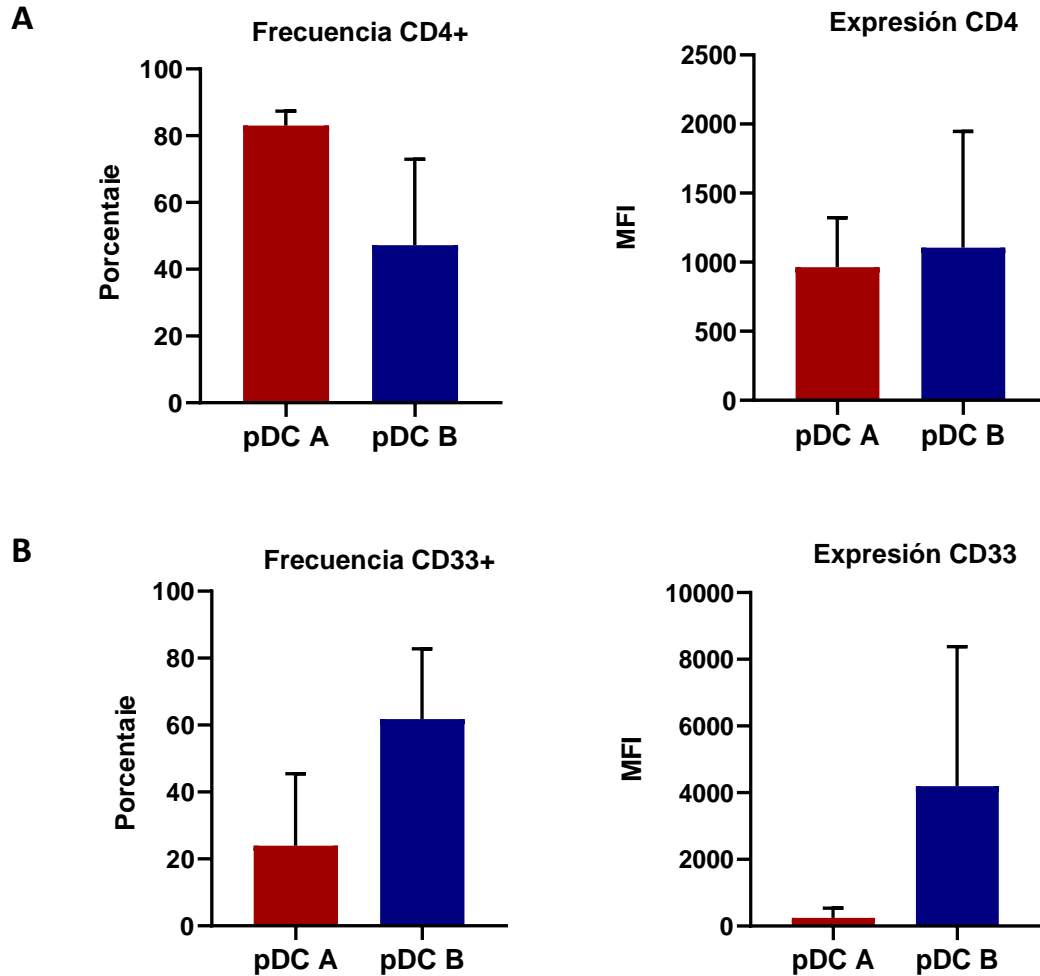


Fig. 14 Frecuencia y expresión de CD4 y CD33 en subpoblaciones de pDC.

A) Frecuencia de CD4 en pDC A (rojo) y pDC B (azul), observamos una tendencia de mayor presencia de CD4 en pDC A (grafico izquierdo), sin embargo, no hubo diferencias en la expresión de CD4 en las subpoblaciones (grafico derecho). B) Frecuencia de CD33 en las subpoblaciones pDC A y pDC B (grafico izquierdo) y expresión de este marcador (grafico derecho), en ambos gráficos observamos que hay una tendencia de mayor frecuencia y expresión de CD33 en pDC B, sin embargo no hubo diferencia estadística significativa. $n=3$.

Por otra parte, se analizó la frecuencia de CD4 y CD33 en los diferentes niveles de CD40 en las subpoblaciones, donde se apreció que la mayor frecuencia de CD4 corresponde a la subpoblación pDC A y que la mayor frecuencia de CD33 se evidencia en pDC B, esto independientemente del nivel de CD40 (Fig. 15).

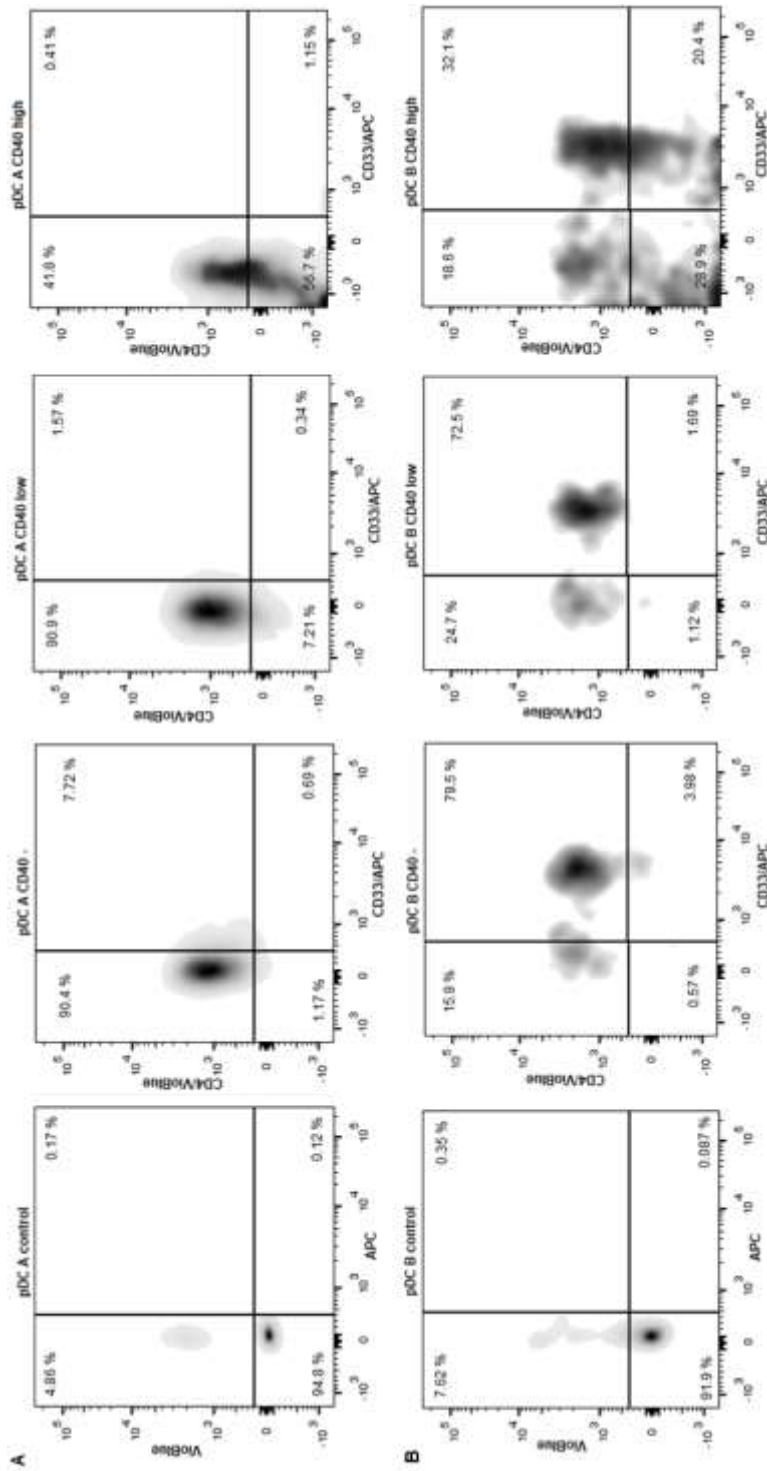


Fig. 15 Co-expresión de CD4 y CD33 en subpoblaciones de pDC en diferentes niveles de CD40.

A) Dot plots control y de frecuencia de CD4 y CD33 de la subpoblación pDC A en CD40⁻, CD40^{low} y CD40^{high}. Observamos que las células de esta subpoblación son en su mayoría CD4⁺ con poca presencia de co-expresión de CD33. B) Dot plots control y de frecuencia de CD4 y CD33 de la subpoblación pDC B en CD40⁻, CD40^{low} y CD40^{high}. A diferencia de la subpoblación pDC A, en pDC B observamos que esta subpoblación posee una mayor presencia de CD33. Sin embargo también hay una co-expresión elevada de CD4. n=3.

Los resultados que se obtuvieron para la frecuencia de CD4 en CD40- son en promedio 91.66% (± 1.76) para pDC A y 78.71% (± 8.60) para pDC B, $p=0.12$; en CD40low 85.96% (± 3.76) para pDC A y 68.17% (± 21.37) para pDC B, $p=0.22$; y en CD40high 45.33% (± 21.57) pDC A y 22.09% (± 18.08) pDC B, $p=0.22$. Por otro lado los resultados promedio de la frecuencia de CD33 en CD40- son 30.70% (± 21.75) para pDC A y 76.69% (± 16.87) para pDC B, $p=0.07$; en CD40low 14.16% (± 16.01) pDC A y 71.46% (± 11.05) pDC B, $p=0.009$; y en CD40high 9.58% (± 12.20) pDC A y 47.69% (± 20.01) pDC B, $p=0.035$. Como se describió anteriormente, en el caso del análisis del marcador CD33 dos donadores se comportaron de manera similar, sin embargo, el tercer donador muestra datos que se traducen a una amplia dispersión de datos, a pesar de esto se puede observar que la tendencia de frecuencia de CD33 es mayor en pDC B (*Fig. 16*).

De acuerdo a los datos obtenidos de CD4 y CD33 en los diferentes niveles de CD40, se observó que la subpoblación pDC A CD40- son mayoritariamente CD4, mientras que las CD40low/high muestran mayor presencia de CD33. Por otro parte en la subpoblación pDC B se observó una presencia similar de la molécula CD4 a pDC A, pero en pDC B hay menor frecuencia, caso contrario a CD33, que, independientemente de los diferentes niveles de CD40 se observa la presencia permanente de CD33 en pDC B en comparación a pDC A (*Fig. 15 y 16*).

Con estos resultados se sugiere que la subpoblación de pDC de mayor complejidad (pDC B) corresponde a las AS-DCs, que como hemos visto, comparten marcadores fenotípicos con las pDC, la diferencia es que las AS-DCs son células CD33+. Otra característica que las diferencia es su funcionalidad, ya que AS-DC no producen IFN- α .

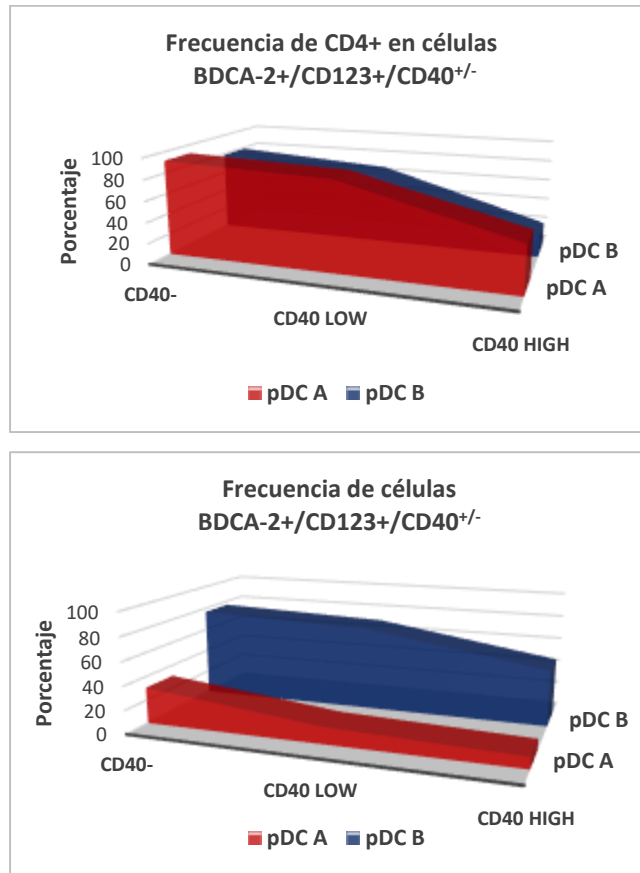


Fig. 16 Frecuencia de CD4 y CD33 en subpoblaciones de pDC en los diferentes niveles de CD40.

La frecuencia de CD4 es similar entre pDC A (rojo) y pDC B (azul), no se observó diferencia significativa, pero la presencia de este marcador es ligeramente mayor en pDC A, por otro lado de acuerdo a los niveles de CD40, se observa que las subpoblaciones de pDC's CD40- presentan una mayor frecuencia de CD4 (grafico superior). La frecuencia de CD33 fue marcadamente mayor en la subpoblación pDC B que en pDC A independientemente de los niveles de CD40 (grafico inferior). n=3.

A la par se sugiere que las diferencias en la tendencia de expresión de CD40 en las subpoblaciones se deba a las diferencias celulares pDC/AS-DC; sin embargo, no se descarta que pudiese existir presencia de pDC con diferente estado de maduración.

Para el establecimiento de nuestra población de pDC (Fig. 17), tras la doble separación se validó la viabilidad de las células con 7AAD. Se analizaron en células vivas (7AAD-) los marcadores fenotípicos BDCA-2, CD123, CD4 y CD33. Considerando el fenotipo pDC BDCA-2+/CD123+/CD4+/CD33-. Se descartan los análisis futuros en la población correspondiente a las AS-DC ya que representa un poco porcentaje de las células purificadas, en promedio 11.40% (± 7.9).

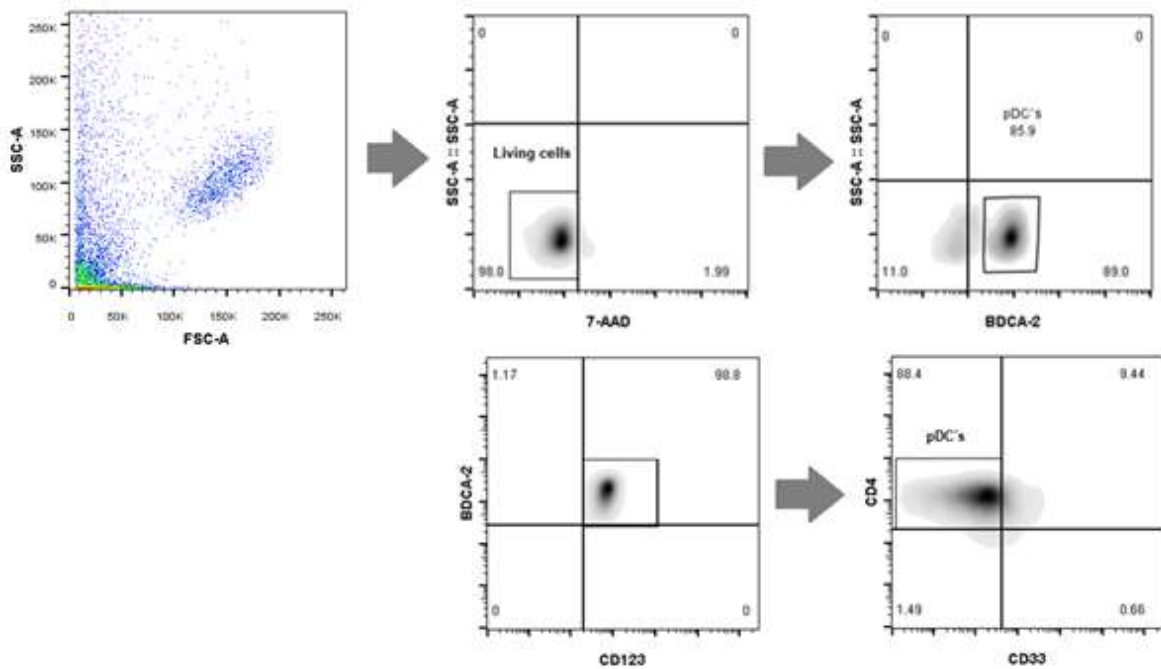


Fig. 17 Establecimiento de la población de pDC.

Realizada la doble separación por análisis de citometría de flujo se establece la población pDCs en las células vivas (7-AAD-) como se observa en los density plot el fenotipo establecido es BDCA-2+/CD123+/CD4+/CD33-. n=3.

Ya establecida la población de pDC, se analizó la presencia del halo purinérgico CD39/CD73 en estas células.

4.2 La ectonucleotidasa CD39 se expresa extracelularmente en un grupo de pDC mientras que CD73 se encuentra en el espacio intracelular de estas células.

Durante el proceso de hidrolisis del ATP hasta la formación de adenosina, dos moléculas son relevantes para llevar a cabo este proceso CD39 y CD73. El rol de CD39 es importante en un primer paso ya que media la hidrolisis del ATP hasta la formación de AMP. Por ello en pDC recién purificadas se analizó la expresión de esta molécula.

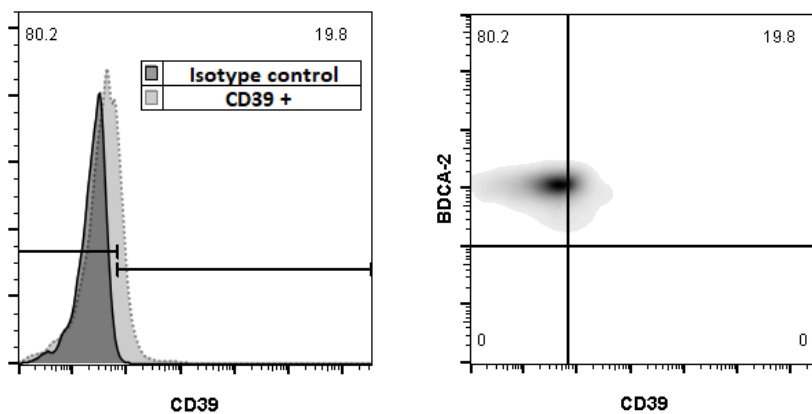


Fig 18 Expresión de CD39 en pDC.

Se establecieron los controles para el marcador CD39 en pDC (histograma izquierdo). Se observa expresión de CD39 en pDC (dot plot izquierdo). n=13.

Como se observa en la *Fig. 18*, se evidenció la presencia de CD39 en pDC. Obteniéndose en promedio de n=13 una frecuencia de 14.0% (± 12.5) (*Fig. 20*) y una expresión (MFI) 1.053 ± 0.50 . Una vez determinada la presencia de esta primera molécula del halo purinérgico se procedió a la búsqueda de la molécula clave en la generación de adenosina.

CD73 forma parte esencial del halo purinérgico ya que media el último paso, genera adenosina a partir del AMP procedente de la fosfohidrolisis de ATP por parte de CD39, la adenosina que se produce por la acción de CD39 y CD73 tiene un papel importante en la regulación inmune. Por la importancia funcional de esta molécula se evaluó la expresión de CD73 en las pDC recién purificadas de sangre periférica.

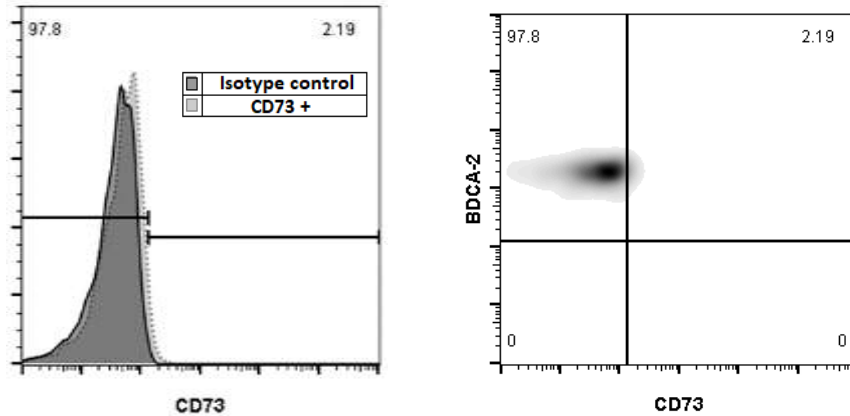


Fig 19 Expresión extracelular de CD73 en pDC.

Se establecieron los controles para el marcador CD73 en pDC (histograma izquierdo). En los donadores analizados no se detectó la presencia extracelular de CD73 en pDC (dot plot izquierdo). n=13.

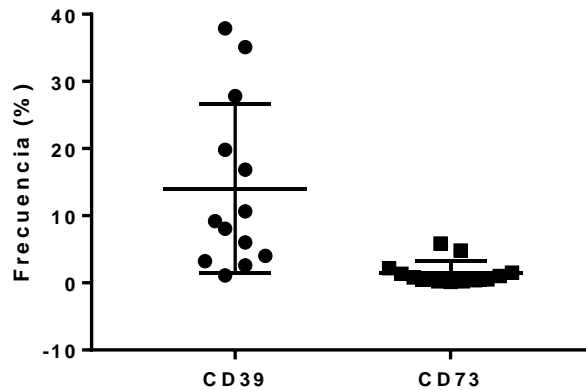


Fig. 20 Presencia del halo purinérgico en pDC.

Frecuencia de CD39 y CD73 extracelular en pDC recién purificadas. n=13.

Para la evaluación de CD73 extracelular en pDC totales, fueron establecidos los controles para este marcador, en los donadores analizados se detectó mínima o nula presencia de CD73 extracelular en pDC (Fig. 19). En promedio la frecuencia reportada fue de 1.5% (± 1.8) (Fig.20) y expresión (MFI) de 0.66 ± 0.15 . Cabe mencionar que se ha reportado la presencia tanto extracelular e intracelular de CD73 en Treg, ante la mínima presencia extracelular de CD73 en pDC se especuló que posiblemente esta molécula podría tener una mayor expresión en el espacio intracelular. Por tal motivo se realizó la búsqueda de CD73 intracelular en pDC.

Para la búsqueda de esta proteína intracelularmente en la pDC, se realizó una tinción intracelular utilizando Triton al 0.1% para permeabilizar la membrana.

El análisis intracelular de CD73 en pDC por citometría de flujo, demostró que hay un bajo porcentaje de estas células que expresan esta molécula (*Fig. 21*).

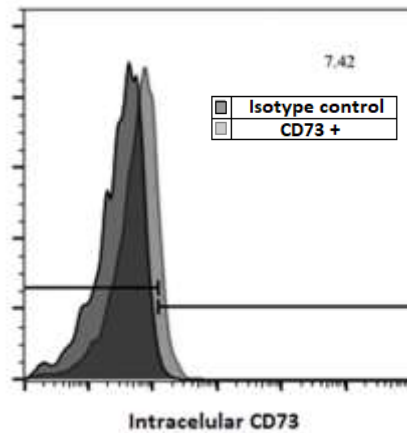


Fig. 21 Expresión intracelular de CD73 en pDC.

Se establecieron los controles para el marcador CD73 en pDC (*histograma izquierdo*). Se observa que de forma intracelular si hay presencia de CD73 en pDC. $n=5$.

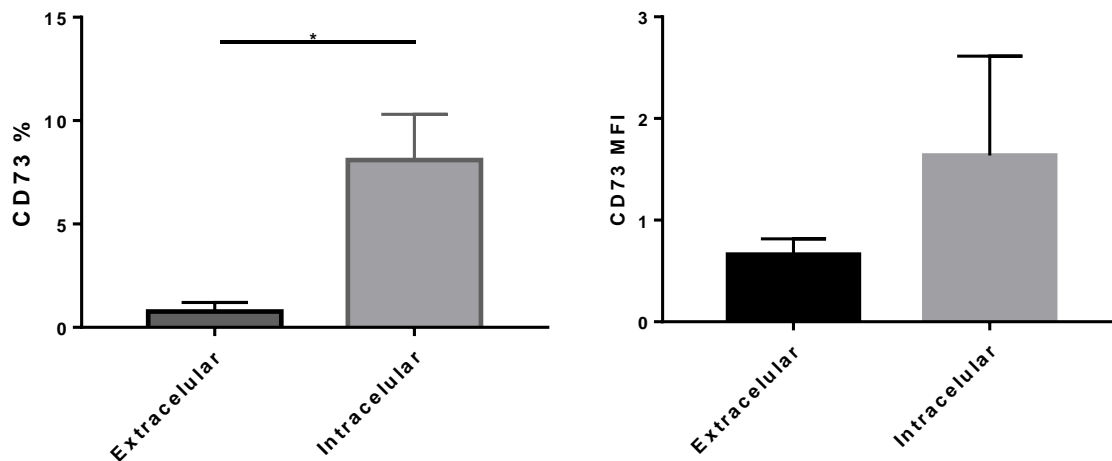


Fig. 22 Expresión intracelular y extracelular de CD73 en pDC.

Análisis de la frecuencia (%) y expresión (MFI) de CD73 en pDCs representado en gráfico de barra. Extracelularmente no hay presencia de CD73 en pDCs, sin embargo, de forma intracelular en pDCs si detectamos esta molécula con una frecuencia aproximada de 8% (*gráfico izquierdo*). Por otra parte, no hubo diferencia significativa en la expresión (MFI) extra e intracelular de CD73 (*gráfico derecho*). Diferencia estadísticamente significativa * $p<0.05$. $n=5$.

Los resultados obtenidos de 5 donadores analizados para la evaluación extra e intracelular de CD73 fueron de una frecuencia promedio de 1.5% (± 1.8) extracelular y 8.0% (± 2.2) intracelular en pDC, $p= 0.031$. La expresión fue MFI 0.66 (± 0.15) extracelular y 1.63 (± 0.97) intracelular, $p=0.062$ (Fig. 22).

Dada la poca expresión de CD73 del análisis de datos por citometría de flujo, se realizó la identificación de CD73 extra e intracelular por microscopia de fluorescencia para corroborar lo datos obtenidos previamente.

Como se mencionó anteriormente en pDC se identificó una mínima o nula expresión de CD73 extracelular, sin embargo, se detectó presencia de esta molécula intracelularmente, aunque en un bajo porcentaje. Dada esta situación y para el establecimiento de la técnica de microscopia, se incluyeron controles positivos para la detección de CD73; Estos controles utilizados fueron células estromales mesenquimales (MSC) ya que expresan alrededor del 90-100% CD73 y PBMC ya que es sabido que diferentes tipos de linfocitos como los B y T así como monocitos expresan esta ectonucleotidasa no en porcentajes tan altos como la MSC (Anexo 10.3). En pDC recién purificadas se evaluó la expresión basal de CD73 extra e intracelularmente con el anticuerpo primario anti-CD73 y el anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 (AF488).

El control de tinción CD73 fue establecido con el control de isotipo donde al no haber anticuerpo anti-CD73 el anticuerpo AF488 no se une por lo tanto no hay pegado inespecífico. Ya establecidos los parámetros, y similar a los datos obtenidos de CD73 por citometría de flujo, la búsqueda extracelular de CD73 en pDC fue mínima o nula, ya que se puede observar unas células teñidas y otras no; sin embargo, en el caso de la determinación intracelular se observa un incremento de tinción al evidenciar un mayor número de células del campo captado teñidas con AF488 revelado en verde con un patrón de gránulos (Fig. 23).

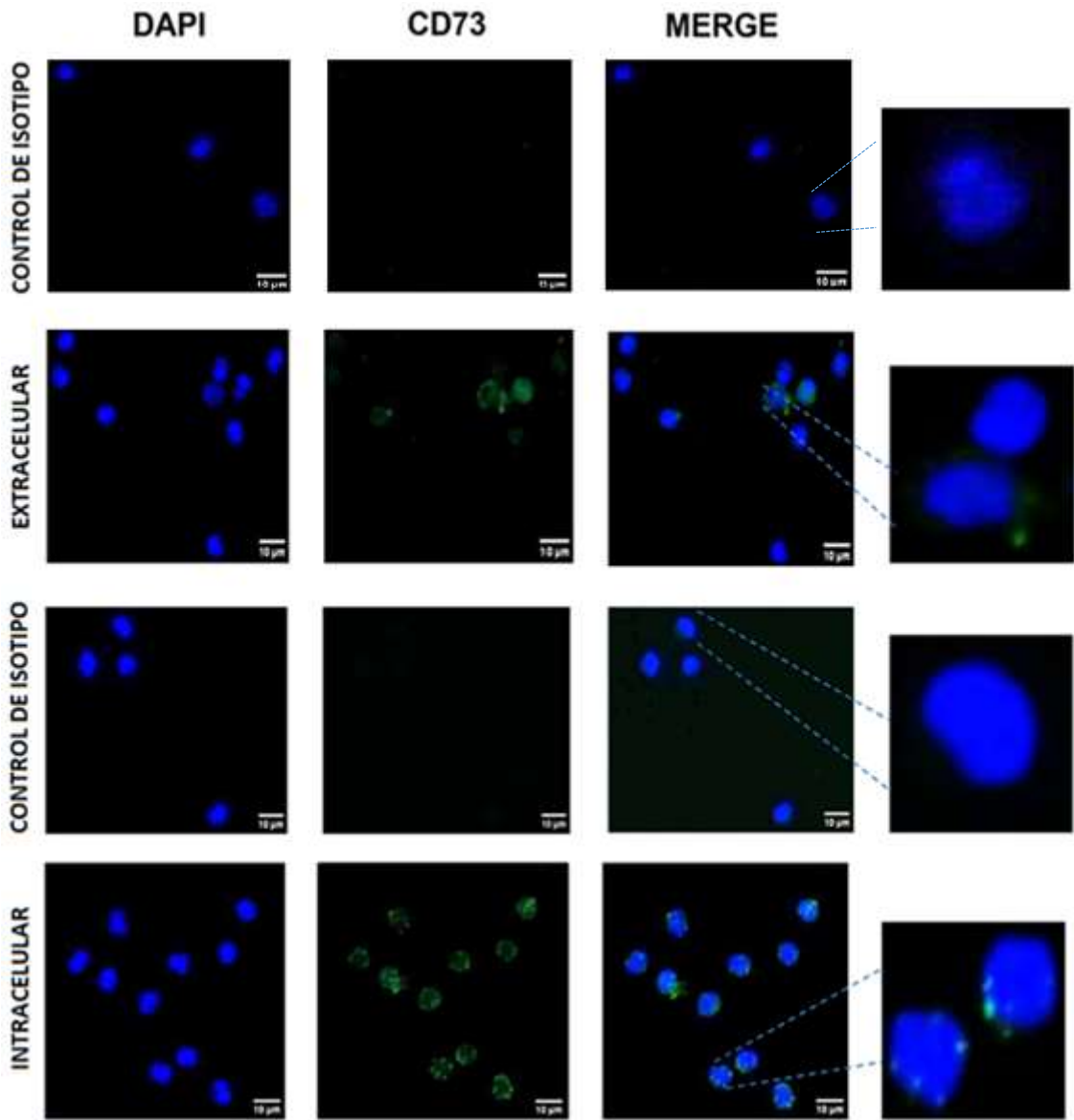


Fig. 23 Expresión intracelular y extracelular de CD73 en pDC por microscopía de fluorescencia.

Se observa en Azul (DAPI) estructura correspondiente al núcleo de las pDCs purificadas (columna izquierda), en verde observamos la presencia de CD73 (anti-CD73) evidenciado con AF488 (columna media "CD73"). El control de isotipo de la tinción extracelular (panel superior) e intracelular (tercer panel) fue establecido para descartar pegado inespecífico lo cual se observa en la ausencia de fluorescencia del AF488. En la detección extracelular de CD73 (segundo panel) observamos que no todas las células del campo expresan esta molécula, mientras que en la detección intracelular observamos una mayor expresión de CD73 en pDC (panel inferior). Como observamos en el Merge (columna derecha) la expresión de esta molécula CD73 se evidencia como en forma de gránulos. Imágenes representativas de un experimento por triplicado de cada uno se realizaron 5 capturas del cubreobjetos (4 extremos, 1 centro).

El análisis cuantitativo de todas las imágenes captadas establecido por el valor medio de la señal de gris por área para AF488 de cinco tomas (4 extremos, una central) por condición/cubreobjeto revelo en promedio para los resultados obtenidos del control de isotipo en la tinción extracelular 0.31 ± 0.35 , para la detección extracelular de CD73 0.48 ± 0.53 mientras que para la tinción intracelular el control de isotipo mostro en promedio 0.31 ± 0.35 y CD73 intracelular 1.57 ± 0.905 (Fig. 24), evidenciando así con el análisis cualitativo y cuantitativo una mayor expresión de CD73 en el espacio intracelular de la pDC.

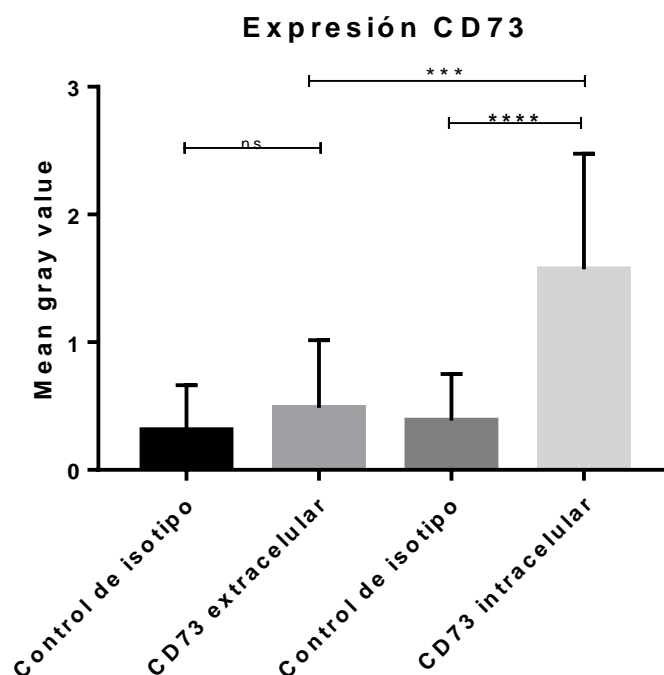


Fig. 24 Análisis cuantitativo de la expresión intracelular y extracelular de CD73 en pDC por microscopia de fluorescencia.

El gráfico muestra el valor medio de gris de las capturas de imagen realizadas. Datos de un experimento por triplicado de cada uno se realizaron 5 capturas del cubreobjetos (4 extremos, 1 centro). *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Con los datos de la citometría de flujo y la microscopia de fluorescencia se evidencio por primera vez la expresión intracelular de CD73 en pDC, a pesar de la mínima presencia extracelular de esta molécula. Es sabido que en los Tregs y otras células la estimulación de las células con mediadores inflamatorios o antiinflamatorios

favorecen un incremento en la expresión extracelular de CD73, y teniendo en cuenta que con este trabajo se pretende relacionar la probable función inmunomoduladora de las pDC con su expresión extracelular de CD73, surge la interrogante ¿si las pDC son activadas se podría inducir la expresión extracelular de CD73?, para resolver estas interrogantes es necesario activar las pDC con estímulos activadores como es el caso de un agonista de TLR-7 (R848).

4.3 La activación de pDC con el agonista de TLR-7 incrementa la expresión de CD40 y favorece la secreción de IFN- α en estas células.

La función de las pDC en la respuesta inmune esta principalmente enfocada en la defensa contra virus, esto por sus características; recordando que dentro de sus principales características es que poseen una alta expresión de TLR-7 y TLR-9 que reconocen los ácidos nucleicos. Por lo tanto, para activar las pDC se requiere de un agonista de TLR-7 o TLR-9, en este proyecto se dio la estimulación con R848 una imidazoquinolina que activa pDC a través de la vía de señalización dependiente de TLR-7/MyD88 para inducir la secreción de IFN- α . Se realizó la validación de la activación de pDC a través de la expresión de una molécula de activación CD40 y de la secreción de IFN- α .

Cabe resaltar que el interés de este proyecto fue analizar los cambios en la expresión del halo purinérgico en pDC recién purificadas (sin estimular) y en pDC activadas, sin embargo, las pDC en cultivo para su sobrevivencia requieren de IL-3, por ello el análisis de expresión de CD40 también fue realizado en pDC solo en cultivo con IL-3 para descartar la influencia de esta citocina en la activación de las pDC.

El análisis de CD40 revelo que en las pDC recién purificadas o sin estimular en promedio la frecuencia de células CD40+ fue de 22.93% (\pm 15.45) con una expresión "MFI" de 1.027(\pm 0.22) siendo similar a los datos obtenidos para las células en cultivo con IL-3 con un promedio de frecuencia 28.5% (\pm 14.81) y de expresión 1.83 (\pm 0.28), sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos

(sin estimular vs IL-3) con un valor $p=0.37$ para porcentaje y $p=0.375$ para MFI, lo cual indica que no hay influencia de IL-3 en la activación de las pDC, por lo tanto los resultados de las pDC activadas con R848 en presencia de IL-3 es resultado solo del efecto de este agonista de TLR-7. Los datos obtenidos de las pDC activadas [R848 (R848 + IL-3)] fueron un promedio de frecuencia de 52.13% (± 1.27) y de expresión de 2.123 (± 0.63), mostrando diferencia estadísticamente significativa con un valor $p=0.05$ para ambas condiciones “Sin estimular vs R848” e “IL-3 vs R848” (Fig. 25). Con estos resultados se observó que R848 incrementa la expresión de CD40 en pDC comparado a lo observado en las pDC recién purificadas (sin estimular), así mismo que a pesar que se requiere el uso de IL-3 para la sobrevivencia de las pDC en cultivo esta no influye en la activación de las mismas ya que no hubo cambios en la expresión de CD40 con respecto a las pDC sin estimular.

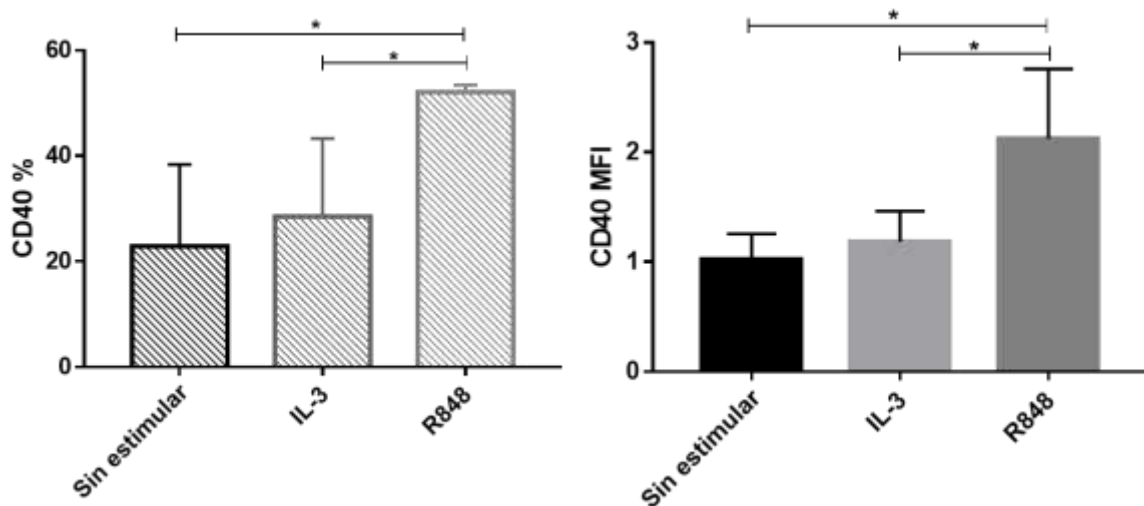


Fig 25 Expresión de CD40 en pDC tras la activación con R848.

*El agonista de TLR-7 (R848) induce un incremento en la frecuencia de pDCs CD40+, comparado a las pDCs sin estimular y las tratadas solo con IL-3 (grafico izquierdo), el mismo patrón observamos en lo que respecta a la expresión de esta molécula (grafico derecho). * $p<0.05$. $n=6$.*

A la par se determinó la concentración de IFN- α en los sobrenadantes de los cultivos de la activación de las células, por requerimientos experimentales la determinación

de esta citocina se realizó solo en las condiciones IL-3 y R848, pero cabe resaltar que IL-3 no induce la activación de las células. Los resultados obtenidos fueron en promedio para IL-3 34.37 pg/ml (± 2.38) y para R848 43.63 pg/ml (± 9.42), se pueden apreciar estos datos representados en la *Fig 26*.

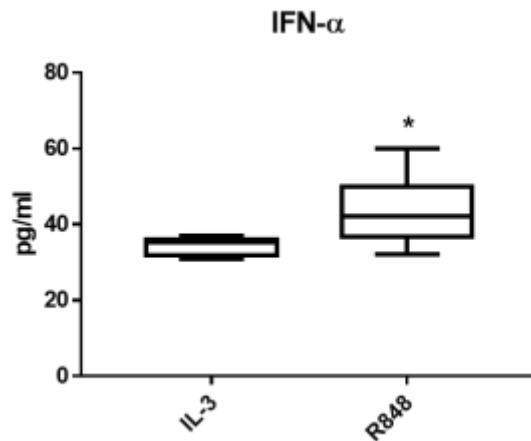


Fig. 26 Determinación de la concentración de IFN- α en pDC.

La concentración (pg/ml) de IFN en pDC control (IL-3) y activadas con R848. El grafico muestra la mediana y la desviación estandar. * $p < 0.05$. $n = 6$.

Los resultados indican que R848 activa las pDC esto por el incremento en la concentración de IFN- α que se observa. En conjuntos estos resultados, el incremento en la expresión de CD40 y el aumento en la concentración de IFN- α indican que la activación de pDC a través del receptor TLR-7. Ahora bien, una vez activas las pDC se evaluaron si existen cambios en la expresión extracelular de CD39 y CD73.

4.4 El estímulo activador R848 (agonista de TLR-7) induce incremento en la expresión del halo purinérgico en las pDC.

Para evaluar propiedades inmunoregulatoras de pDC asociadas al halo purinérgico, es necesario incrementar su expresión extracelular, debido al rol clave que desempeña CD73 como paso único y determinante en la generación de adenosina,

es importante favorecer la expresión extracelular de esta molécula en pDC. Como se evidencio anteriormente en pDC recién purificadas o sin estimular se encontró expresión extracelular de CD39 caso contrario a lo que se observa con CD73 que se encuentra casi ausente, sin embargo se identificó esta molécula intracelularmente en la pDC, teniendo conocimiento que en otras células tras estimulación se induce la expresión extracelular de CD73, se activaron a las pDC con R848 y se evaluó si posterior a la activación se induce la expresión de esta molécula a nivel extracelular.

Los resultados obtenidos del análisis de CD39 y CD73 extracelular en pDC sin estimular y activadas mostraron que hay un incremento en la expresión de CD39 en pDC estimuladas con R848 [MFI 2.204(\pm 1.196)] comparado a las pDC sin estimular [MFI 1.104(\pm 0.70)], mientras que en el caso de CD73 se observó que la estimulación de pDC con R848 indujo su presencia extracelular mostrando en promedio una frecuencia de 18.61% (\pm 9.3) así como también incrementó su expresión (MFI) 1.746 (\pm 0.96) en comparación a lo observado en las pDC sin estimular 3.64% (\pm 3.3) y MFI 0.53 (\pm 0.17). El análisis de los datos está representado en la *Fig.27*.

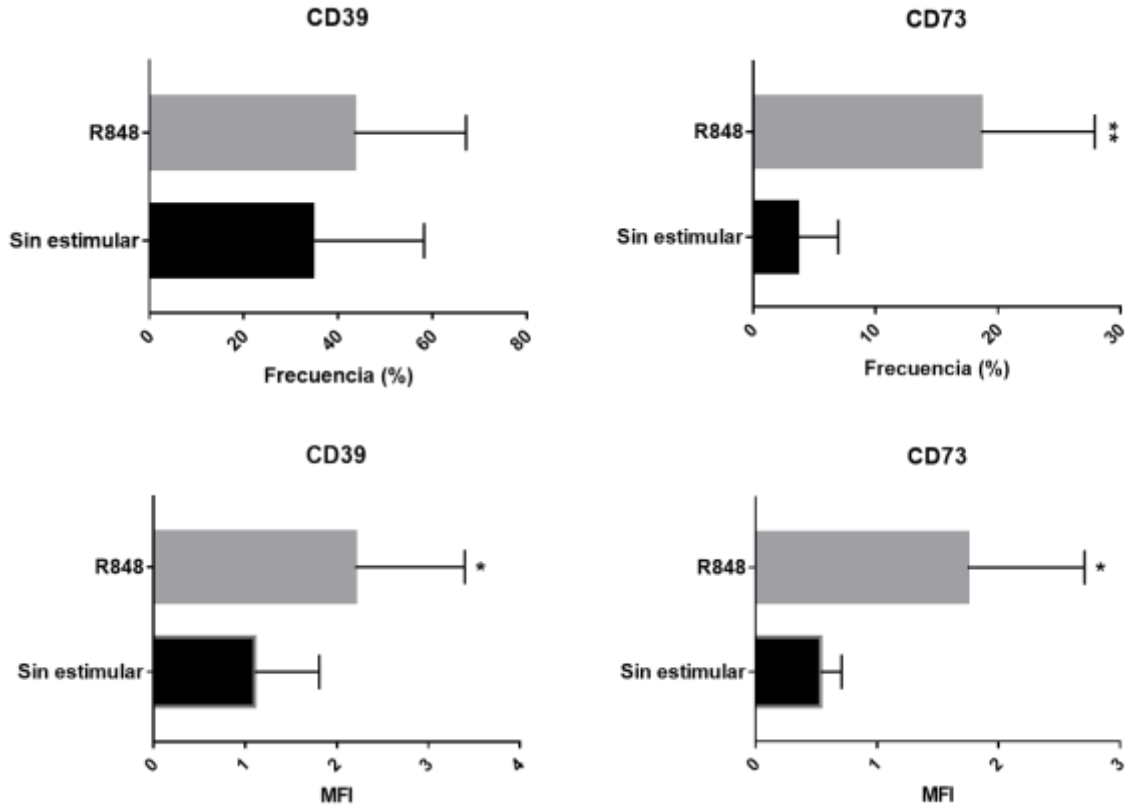


Fig. 27 Expresión de CD39 y CD73 en pDC activadas.

Tras la activación con R848 se observa un incremento en la expresión de CD39, así mismo se indujo CD73 extracelular y se observa un incremento en la expresión de esta molécula. Los gráficos muestran la media y la desviación estándar (SD). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. $n=6$.

Otro dato obtenido fue la co-expresión CD39/CD73, se observó un incremento en la co-expresión de estas moléculas en pDC activadas con R848 ($9.48\% \pm 8.44$) a lo evidenciado en pDC sin estimular ($2.048\% \pm 2.47$). En la Fig. 28 se puede observar un contour plot representativo y una gráfica de los experimentos realizados.

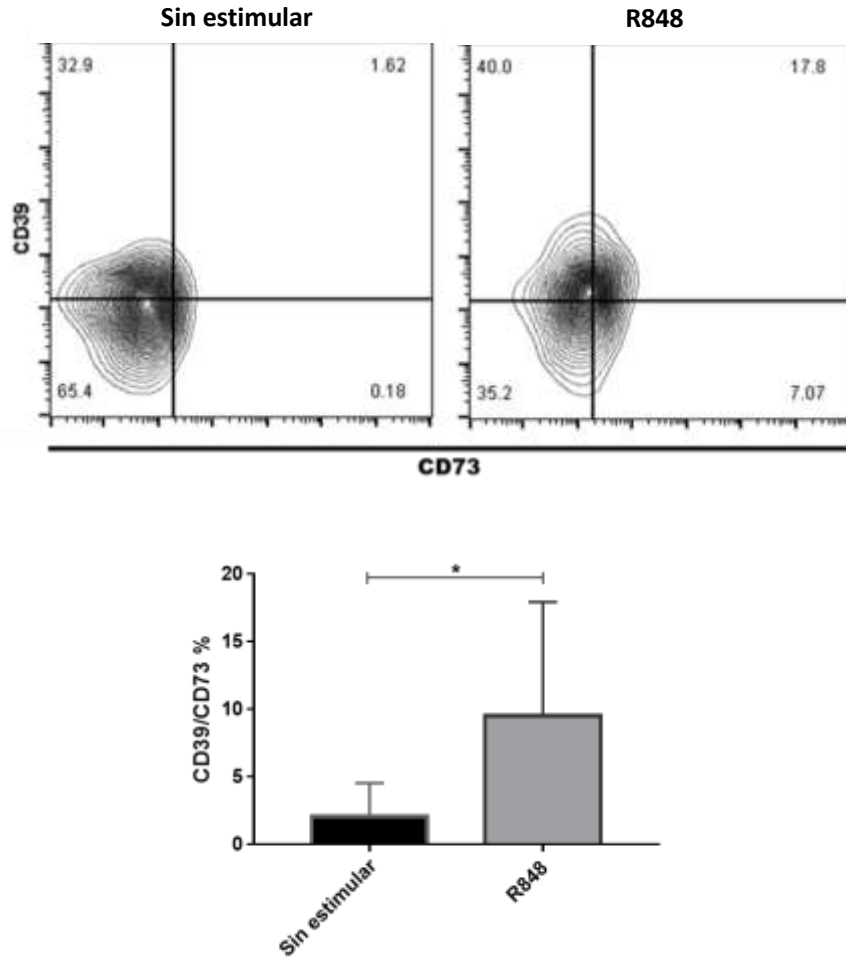


Fig 28 Co-expresión de CD39 y CD73 en pDC activadas.

La activación con R848 induce un incremento en la co-expresión de CD39/CD73 el cual podemos observar en los contour plot con el desplazamiento de la población en pDCs. El gráfico muestra la media y la desviación estándar (SD). * $p < 0.05$. $n = 6$.

Al evidenciar que en pDC activadas con R848 se induce un incremento en la expresión extracelular de CD73, era necesario evaluar la capacidad funcional de esta molécula, esto se realizó a través de la producción de adenosina.

4.5 La capacidad enzimática de CD73 para la producción de adenosina es eficiente a pesar de la baja expresión de la molécula en pDC.

Para la generación de adenosina (ADO), una primera fase la lleva a cabo CD39 que fosfohidroliza ATP hasta AMP, sin embargo, el último paso en este proceso es realizado por CD73 que convierte este AMP en adenosina. Para evaluar la capacidad enzimática (capacidad funcional) de CD73 en pDC se evaluó la concentración de ADO generada a partir de ATP por fluorometría. Antes de realizar la cuantificación fue importante primero determinar el punto máximo de expresión de CD73 en pDC activadas con R848. Por tal motivo se realizó una cinética de activación donde se evaluó a diferentes puntos la expresión de CD73 por citometría de flujo. Como se observa en la *Fig. 29* los resultados muestran una mayor expresión estadísticamente significativa de CD73 a las 18h [1.74 ± 0.62 ($p=0.05$)] y 24h [1.077 ± 0.65 ($p=0.05$)], sin embargo, al observar la distribución de los datos a las 18h de activación se observa un mayor incremento comparado a las 24h por lo tanto el tiempo seleccionado de estimulación de pDC para este ensayo fue de 18h.

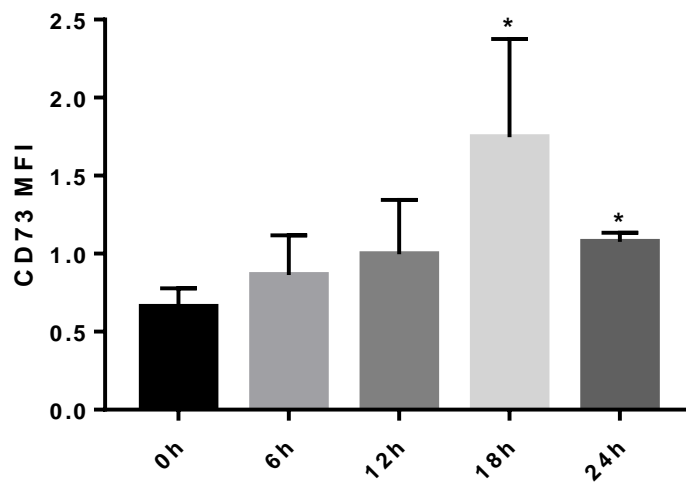


Fig. 29 Cinética de expresión de CD73 en pDC estimuladas con R848.

La mayor expresión de CD73 se estableció a las 18h. El gráfico muestra la media y SD de dos experimentos realizado por triplicado. * $p < 0.05$.

Ya establecido el punto máximo de expresión de CD73, se evaluó la capacidad enzimática de esta ectonucleotidasa a través de la generación de adenosina, para ello las pDC fueron o no tratadas con anticuerpo neutralizante anti-CD73 y se adiciono ATP. Finalmente, el sobrenadante recolectado fue analizado para determinar la concentración de adenosina. Los resultados obtenidos (Fig. 30) mostraron en promedio en las pDC sin estimular 39.5 μM (± 2.16) de adenosina, mientras que se observa un incremento considerable en la concentración de adenosina al estimular a las pDC con R848 [106.2 μM (± 72.2)] lo que estaría relacionado al aumento en la expresión extracelular de CD73 cuando activamos a las pDC, por otra parte cuando se bloquea CD73 con un anticuerpo neutralizante anti-CD73 la concentración de adenosina es revertida [49.0 μM (± 34.04)] similar a la concentración en pDC sin estimular.

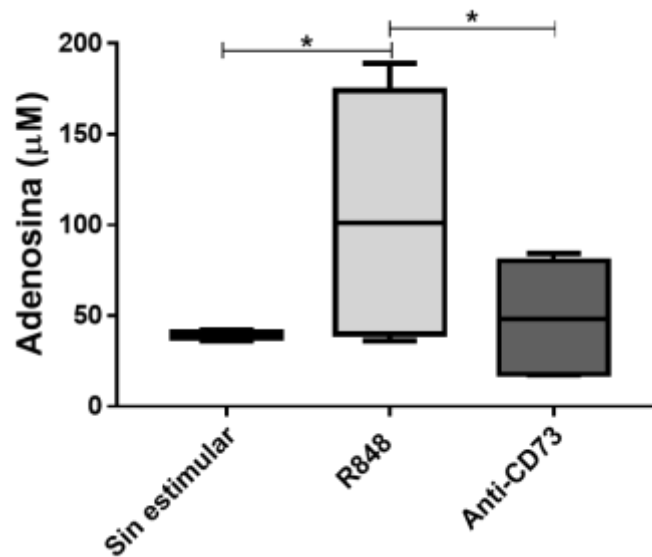


Fig. 30 Cuantificación de la concentración de adenosina.

Las pDC sin estimular, activadas con R848 (R848) y activadas con R848 y adición de anticuerpo neutralizante (Anti-CD73) fueron tratadas con ATP exógeno por 1h. La activación de pDC favorece el incremento de la concentración de adenosina, la cual es revertida al agregar el anticuerpo neutralizante. El grafico muestra la media y SD de dos experimentos realizado por triplicado. * $p < 0.05$.

Los datos sugieren que el tratamiento con R848 incremento la expresión de CD73 al activar las pDC lo cual está relacionado a la producción y niveles incrementados

de la concentración de adenosina, lo que evidencia la capacidad enzimática de esta ectonucleotidasa, y esto lo corroboramos al bloquear a CD73 en pDCs activadas con un anticuerpo neutralizante donde la concentración de adenosina es revertida similar a la condición sin estimular a pesar de la adición de ATP.

Al demostrar la presencia y funcionalidad de la molécula CD73 en pDC, surgieron más interrogantes, ¿Cómo la presencia y función de esta molécula en pDC podría estar relacionada a las capacidades inmunorreguladoras de estas células? Por ello para tratar de comprender un poco este cuestionamiento se evaluó el comportamiento de CD73 a través de la capacidad estimuladora de las pDC.

4.6 La ectonucleotidasa CD73 influye en la capacidad estimuladora de pDC.

Para evaluar el probable rol o participación de la adenosina generada por CD73 en la capacidad estimuladora de pDCs se analizó el efecto de estas sobre la proliferación de linfocitos CD4+, ya que se sabe que la adenosina producida por CD73 afecta la proliferación celular. Por tal motivo se realizó un ensayo de reacción leucocitaria mixta donde se purificaron linfocitos T CD4+ que se pusieron en contacto con pDC alogénicas solo en medio (IL-3), activadas (R848) y activadas más anticuerpo neutralizante (Anti-CD73) para bloquear la actividad enzimática de esta ectonucleotidasa. El cocultivo fue establecido por 5 días para su posterior análisis por citometría de flujo. Como se puede observar en la *Fig. 31* y *Fig. 32* la activación de pDC con R848 [17.14% (\pm 5.82)] mejora su capacidad estimuladora al reflejarse en un incremento de proliferación de linfocitos T con respecto observado en el control de pDCs "IL-3" [14.24% (\pm 2.07)], sin embargo, al activar las pDC y bloquear CD73 (Anti-CD73) se observa un mayor incremento [21.4% (\pm 6.24)] en la proliferación de los linfocitos T respecto a las otras dos condiciones. Esto sugiere que en efecto la adenosina un producto resultado de la actividad enzimática de CD73 podría estar ejerciendo un efecto en la capacidad aloestimuladora de las pDC sobre la proliferación de linfocitos T.

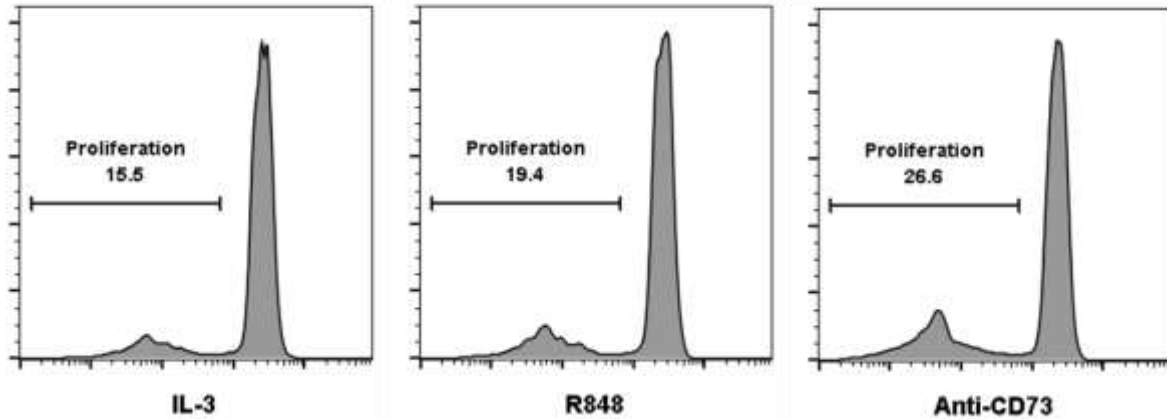


Fig. 31 Histogramas de la proliferación de linfocitos T CD4+ cocultivados con pDC.

Las pDC control (IL-3), pDC activadas (R848) y pDC activadas tratadas con anticuerpo neutralizante (Anti-CD73) fueron cocultivadas con linfocitos T por 5 días. Por ensayo de dilución de CFSE analizamos la proliferación de los linfocitos para evaluar la capacidad aloestimuladora de las pDC y su relación con la expresión de CD73 y producción de adenosina. Los datos representativos de los histogramas nos muestran una mayor proliferación al bloquear CD73.

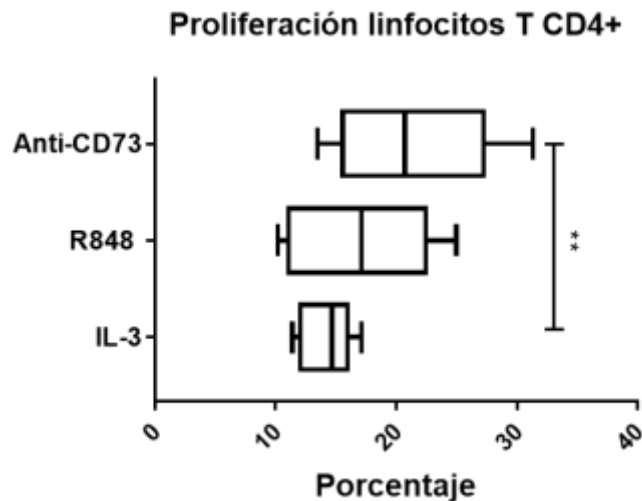


Fig. 32 Proliferación de linfocitos T CD4+ cocultivados con pDC.

Se observa una mayor proliferación de linfocitos T en aquellas cocultivadas con pDC activadas y tratadas con anticuerpo neutralizante (Anti-CD73) comparadas a las pDC control (IL-3) y pDC activadas (R848). La grafica muestra la mediana y desviación estándar de los datos de dos ensayos realizados por duplicado. * $p < 0.05$.

También fue de interés investigar cómo la adenosina producida por CD73 de pDC podría estar influyendo en el estado de activación de los linfocitos T, por lo tanto, se analizó la expresión de CD25 de los linfocitos procedentes de los cocultivos anteriormente mencionados. A pesar de no observar diferencias estadísticamente

significativas si se evidenciaron tendencias (*Fig. 33*), se estableció como control los linfocitos T CD4+ solos en cultivo [386.8 (\pm 134.3)], en donde se observó un incremento de la expresión de CD25 en los linfocitos T CD4+ provenientes de los cocultivos con pDC IL-3 [4404 (\pm 3020)] y pDC R848 [5156 (\pm 2436)] comparado a estos el bloqueo de CD73 (Anti-CD73) en pDC muestra tendencia a disminución en la expresión de CD25 [5117 (1895)] en los linfocitos T CD4+ del cocultivo.

Con estos resultados se sugiere que la adenosina producida por el halo purinérgico (CD39/CD73) está implicada en la actividad inmunorreguladora de las pDC ya que se demostró que el bloqueo de CD73 en pDC y por ende la falta de adenosina favorecen la capacidad aloestimuladora de las pDC reflejándose en un incremento en la proliferación de los linfocitos T CD4+ así como una disminución de su activación a través de la expresión de CD25.

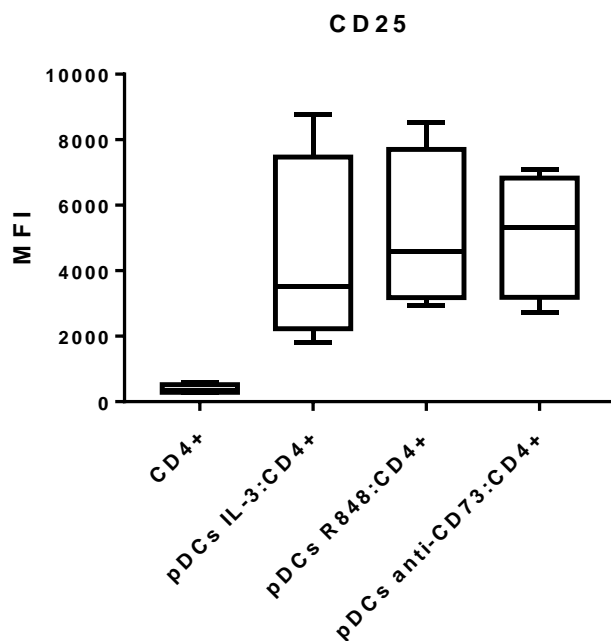


Fig. 33 Expresión de CD25 en linfocitos T CD4+ cocultivos con pDC.

Los linfocitos CD4+ no provenientes de cocultivo fueron establecidos como control. Hay un incremento en la expresión de los linfocitos T CD4+ del cocultivo con pDC IL-3 y pDC R848. Sin embargo, esta expresión disminuye en linfocitos T CD4 cocultivos con pDC anti-CD73. La grafica muestra la mediana y desviación estándar de los datos de dos ensayos realizados por duplicado.

En general los resultados que se obtuvieron evidenciaron la presencia de AS-DC en la población de pDC sin embargo el porcentaje bajo de estas no representa problema con los resultados posteriores. En primer lugar, se estableció la población de pDC con la evaluación de viabilidad celular (7AAD) y sobre células vivas se identifica las células BDCA-2+, CD123+, CD4+ y CD33-. Posterior al establecimiento de la población se analizó la expresión extracelular de CD39 y CD73, cabe mencionar que CD73 presento una mínima o nula expresión extracelular en pDC de sangre periférica, sin embargo, se halló esta molécula en el espacio intracelular de las pDC, por tal motivo las pDC se activaron con R848, corroborando la activación a través del incremento en la expresión de CD40 e incremento de los niveles de IFN- α . Se observó que la activación de pDC induce la expresión de CD73 extracelular, así como un incremento en la expresión de esta misma molécula y de CD39. Ya inducidas las moléculas CD73 se evaluó su capacidad enzimática a través de la producción de adenosina a partir de ATP exógeno, en pDC activadas hubo un incremento de la concentración de adenosina el cual fue revertido cuando al sistema se le adiciono un anticuerpo neutralizante Anti-CD73 evidenciando así el rol funcional de esta ectonucleotidasa. Por último, se evaluó la influencia que tiene el halo purinérgico y la adenosina en el rol de las pDC, evaluando su capacidad aloestimuladora y el efecto que tiene en linfocitos CD4+, observandose que al inhibir la producción de adenosina se favorece la proliferación de linfocitos T CD4+ y disminuye la expresión de CD25 indicativa de la activación de linfocitos T, lo cual sugiere una probable relación del halo purinérgico con las propiedades inmunoregulatoras de la pDC.

5. DISCUSIÓN

La participación de las pDC en la respuesta inmune antiviral está ampliamente descrita, y el conocimiento sobre sus actividades funcionales y propiedades inmunogénicas está en constante aumento. Sin embargo, también se han informado desequilibrios funcionales de pDC en la pérdida de tolerancia inmune y el desarrollo de autoinmunidad, principalmente relacionados con la sobreactivación celular y la hipersecreción de IFN- α (45). Sin embargo, los mecanismos tolerogénicos de pDC no han sido suficientemente descritos para explorar su probable asociación con estas patologías. Por lo tanto, este trabajo buscó directamente la presencia y funcionalidad del halo purinérgico (CD39/CD73) como un probable mecanismo inmunomodulador en pDC de sangre humana.

El halo purinérgico es un mecanismo regulador conocido en Tregs. La importancia de estas moléculas en la generación de adenosina ha sido ampliamente demostrada (43). Anteriormente, nuestro grupo de investigación demostró que las DC derivadas de monocitos tolerogénicos humanos cultivadas con las citocinas inmunosupresoras IL-10/TGF- β mostraban niveles más altos de expresión de CD39 que sus equivalentes de DC derivadas de monocitos convencionales (60). Dado que la producción de adenosina requiere la presencia tanto de CD39 como de CD73, aquí evaluamos la expresión de estas moléculas y su actividad enzimática en pDC de sangre humana para vislumbrar la asociación de este halo purinérgico con sus propiedades inmunorreguladoras.

Para la identificación de pDC, las células se definieron como células BDCA-2+, BDCA-4+, CD123+, CD4+ y CD33- (52). El subconjunto de células CD33+ purificado con pDC se consideró AS-DC y se descartó en un análisis fenotípico adicional. Dadas sus diferencias funcionales especialmente en la producción de IFN- α , el número limitado de células CD33+ durante el análisis de activación podría no ser significativo en este estudio. Este trabajo analizó la expresión de CD39 y CD73 en pDCs de sangre humana. Los resultados revelaron una frecuencia del 18,11% de pDC CD39+ con expresión extracelular de CD73 mínima o nula. Del mismo modo,

Mandapathil et al. observaron una baja expresión extracelular de CD73, pero una alta expresión intracelular en Treg humanos (33). Asimismo, Schuler et al. encontraron que la localización intracelular de CD73 está en gránulos citoplasmáticos en diferentes subconjuntos de linfocitos T (51). Siguiendo con estos antecedentes, realizamos la búsqueda intracelular de CD73 en pDC y observamos una frecuencia de células del 8,09% que mostraba esta molécula. Además, realizamos la detección de CD73 en pDC mediante microscopía de fluorescencia, los datos revelaron la presencia de CD73 en pDC, cabe mencionar que la expresión fue mayor a nivel intracelular y la presencia se observó de manera similar a lo observado por Schuler et al. en forma de gránulos. Por primera vez, este estudio demostró la co-expresión de CD39/CD73 en pDC de sangre humana. Por otra parte los niveles bajos de CD73 extracelular en algunas células se han relacionado con el desprendimiento de la membrana celular por la escisión del anclaje GPI realizada por la fosfatidilinositol-fosfolipasa C "PI-PLC" (29). Sin embargo, el CD73 soluble conserva su actividad catalítica (50), se sabe que algunos factores como la hipoxia, ATP, IFN- α , TNF- α , IL-6 y TGF- β pueden aumentar la expresión y actividad enzimática de CD73 (40). La interacción entre las pDC y las células de mieloma múltiple ha demostrado un aumento y regulación de la expresión de CD73 en las pDC de medula ósea de pacientes con mieloma múltiple, lo que podría estar relacionado con el microambiente tolerogénico que se suscita (47). Sin embargo, el presente estudio reveló que, en condiciones fisiológicas normales, las pDC de donadores sanos también expresan CD73, así como CD39, ambas moléculas clave para la producción de adenosina, lo que destaca la relevancia de evaluar si la activación de las pDCs a través de sus receptores (TLR7/9) podría influir en la expresión de estas ectonucleotidasas.

La activación de TLR-7 a través del agonista R848 en pDCs de sangre humana indujo una activación celular eficiente como lo demuestra el aumento significativo de la expresión de CD40 y la secreción de IFN- α . Con respecto a eso, el estudio tuvo como objetivo mostrar la secreción de IFN- α como un marcador de activación y no como una secreción optimizada como respuesta antiviral o inflamatoria. Los resultados se analizaron y se tomaron como válidos porque, a pesar de los bajos

niveles de IFN- α , se obtuvo una diferencia significativa entre las células estimuladas con R848 y las no estimuladas. La IL-3, como factor de supervivencia de las pDC in vitro, no mostró cambios sustanciales en la activación (expresión de CD40) con respecto a las pDC sin estimular. Por lo tanto, el aumento en la coexpresión extracelular de CD39 y CD73 indica un aumento significativo del halo purinérgico en la superficie de pDC inducido por la activación de TLR-7.

Dado que la generación de adenosina catalizada por el halo purinérgico depende de la actividad enzimática de CD73, la producción de adenosina se cuantificó en el momento de máxima expresión de CD73 en pDC establecida en un tiempo de 18h. Los análisis revelaron que las pDC activadas generaron niveles de adenosina significativamente más altos que las pDC no estimuladas. Es fundamental destacar que, además del halo purinérgico, algunos tipos de células (p. ej., los neutrófilos) están dotados de capacidad de producción de adenosina catalizada por la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina (46). Sin embargo, en la actualidad no se ha informado sobre la actividad de la fosfatasa alcalina en las pDCs. Por otra parte, la producción elevada de adenosina generada por pDCs activadas se revirtió a los niveles de las pDC no estimuladas cuando se bloqueó la actividad enzimática de CD73. Por lo tanto, estos resultados demuestran que el halo purinérgico media la generación de adenosina en pDC de sangre humana.

El efecto inmunomodulador de CD39/CD73 depende de la capacidad de la célula para producir adenosina extracelular. Las concentraciones fisiológicas de adenosina van desde el nivel nanomolar (19). Por lo tanto, nuestros resultados mostraron que las pDC activadas por R848 pulsadas con ATP exógeno produjeron suficiente adenosina extracelular para ser detectada in vitro, lo que sugiere sus posibles capacidades moduladoras.

Las pDC juegan un papel crucial en la respuesta inmune antiviral a través de su capacidad para secretar altos niveles de IFN-I. Además, las pDC están dotadas de capacidades de células presentadoras de antígeno, aunque cabe mencionar que se consideran poco eficientes comparadas a las DC convencionales (8). Por lo tanto, la actividad de CD73 para la producción de adenosina se bloqueó durante un

ensayo de aloestimulación de pDC en linfocitos T CD4+ para evaluar la contribución de CD73 a las capacidades APC de la pDC. Se demostró que las pDC estimularon una proliferación y activación de linfocitos alogénicos eficientes en todas las condiciones evaluadas, y aunque no se encontraron diferencias significativas entre las pDCs cultivadas con IL-3 y las estimuladas con R848, se observó una tendencia ascendente a una mayor proliferación. Encontramos diferencias estadísticamente significativas en la proliferación y tendencia a una menor expresión de CD25 en linfocitos T CD4+ cuando se bloqueó la funcionalidad de CD73 (anti-CD73). Vale la pena señalar que la eficiencia de APC de pDC en la activación de linfocitos T es limitada en comparación con DC convencionales (63). Sin embargo, la evidencia de que el bloqueo de CD73 mejora las capacidades estimulantes de las pDC en este estudio revela que la producción de adenosina a través de la actividad de CD73 podría modular la función de las pDC.

Estudios previos han demostrado que la adenosina puede afectar la activación de los linfocitos T; la activación temprana, la producción de citocinas, la actividad metabólica, la proliferación y la diferenciación de linfocitos T pueden anularse cuando se estimulan con adenosina; su ausencia conduce a una activación óptima de linfocitos T (31). Debido a que CD73 funciona como un paso limitante en la producción de adenosina, los resultados de este estudio sugieren que la regulación de la actividad de CD73 podría influir en la eficacia de pDC para activar linfocitos T, centrando la atención en el rol de la adenosina.

En resumen, la presencia y funcionalidad del halo purinérgico (CD39/CD73) en pDC de sangre humana revelado en este trabajo abre un nuevo campo de investigación para estudiar su implicación en la inmunopatogénesis de patologías asociadas al desequilibrio de pDC.

6. CONCLUSIONES

- El aislamiento de pDC de sangre periférica por selección positiva en separación magnética produjo reproduciblemente dos poblaciones de menor y mayor complejidad.
- El análisis fenotípico de las dos poblaciones de pDC de sangre periférica reveló que la población de mayor complejidad corresponde en su totalidad a células BDCA-2+, CD123+, CD4+ CD33+ (AS-DC) y que la de menor complejidad BDCA-2+, CD123+, CD4+ CD33- (pDC). Las AS-DC tienen mayor expresión de CD40 comparado a las pDC.
- La doble separación magnética permitió obtener mayor pureza de pDC. El bajo porcentaje de AS-DC en la purificación de pDC no represento problema para los posteriores ensayos.
- En pDC recién purificadas (sin estimular) se encontró un grupo con expresión extracelular de CD39 mientras que CD73 se detectó intracelularmente.
- El agonista de TLR-7 (R848) indujo la activación de pDC reflejado por un incremento en la expresión de CD40 e incremento en los niveles de IFN- α . Tras esta activación se indujo un incremento en la expresión extracelular de CD39 y CD73 en pDC.
- Se demostró la funcionalidad de CD73 expresado en las pDC activadas al encontrar una mayor producción de adenosina, el cual es revertido por el anticuerpo neutralizante anti-CD73
- La molécula CD73 y la producción de adenosina influye en la proliferación y activación de linfocitos T CD4+. El bloqueo de esta ectonucleotidasa favorece la proliferación de los linfocitos, por lo tanto el halo purinérgico tiene una participación en la función inmunomoduladora de la pDC.

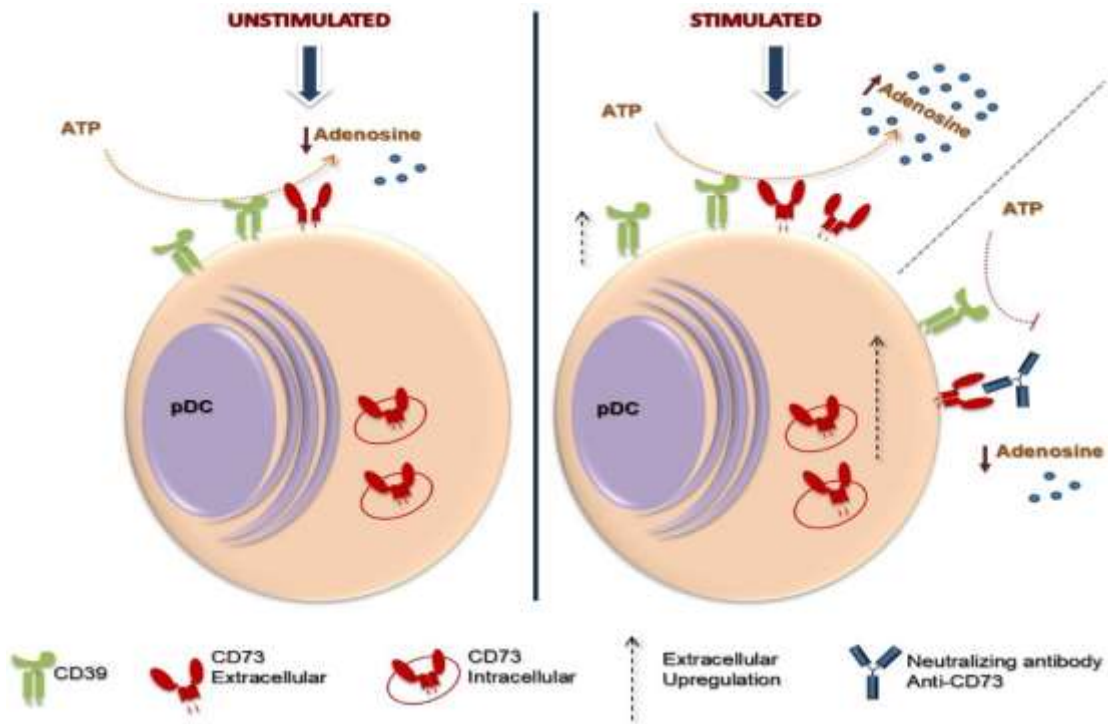


Fig. 34 Expresión del halo purinérgico (CD39/CD73) en pDC humanas de sangre periférica.

En pDC sin estimular (unstimulated) hay presencia extracelular de CD39 sin embargo CD73 mantiene una mínima o nula expresión, además de encontrar esta molecular en el espacio intracelular de la pDC. Sin embargo al estimular la pDC (R848), la activación de esta promueve la expresión extracelular de CD73 e incrementa la co-expresión con CD39.

7. PERSPECTIVAS

- Las propiedades inmunoregulatoras de la pDC pueden ser evaluadas a través del efecto de la neutralización de CD73 en la expresión de moléculas coestimuladoras en las pDC activadas con R848 y también sobre la polarización de los linfocitos T.
- La expresión y funcionalidad del halo purinérgico en pDC puede ser analizada sometiendo a otros estímulos de activación o inflamatorios a las células como ODN (agonista del TLR-9) y ATP (DAMP) así como en ambientes antiinflamatorio como TGF- β que es uno de los principales inductores de CD73.
- El análisis de la expresión de CD39/CD73 en pDC puede realizarse en pacientes con LES para evaluar su posible correlación con el índice de la enfermedad (SLEDAI) y su probable participación en la regulación inmune.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alam MS, Kurtz CC, Rowlett RM, Reuter BK, Wiznerowicz E, Das S, Linden J, Crowe SE, Ernst PB. CD73 is expressed by human regulatory T helper cells and suppresses proinflammatory cytokine production and *Helicobacter felis*-induced gastritis in mice. *J Infect Dis*. 2009 Feb 15;199(4):494-504. doi: 10.1086/596205.
2. Alcántara-Hernández M, Leylek R, Wagar LE, Engleman EG, Keler T, Marinkovich MP, Davis MM, Nolan GP, Idoyaga J. High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization. *Immunity*. 2017 Dec 19;47(6):1037-1050.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.11.001.
3. Alculumbre S, Raieli S, Hoffmann C, Chelbi R, Danlos FX, Soumelis V. Plasmacytoid pre-dendritic cells (pDC): from molecular pathways to function and disease association. *Semin Cell Dev Biol*. 2019 Feb;86:24-35. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.02.014.
4. Alculumbre SG, Saint-André V, Di Domizio J, Vargas P, Sirven P, Bost P, Maurin M, Maiuri P, Wery M, Roman MS, Savey L, Touzot M, Terrier B, Saadoun D, Conrad C, Gilliet M, Morillon A, Soumelis V. Diversification of human plasmacytoid predendritic cells in response to a single stimulus. *Nat Immunol*. 2018 Jan;19(1):63-75. doi: 10.1038/s41590-017-0012-z.
5. Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev*. 2017 Mar;276(1):121-144. doi: 10.1111/imr.12528.
6. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 2013 Jun;19(6):355-67. doi: 10.1016/j.molmed.2013.03.005.
7. Aspod C, Leccia MT, Charles J, Plumas J. Plasmacytoid dendritic cells support melanoma progression by promoting Th2 and regulatory immunity through OX40L and ICOSL. *Cancer Immunol Res*. 2013 Dec;1(6):402-15. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0114-T.

8. Bajnok A, Ivanova M, Rigó J Jr, Toldi G. The Distribution of Activation Markers and Selectins on Peripheral T Lymphocytes in Preeclampsia. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:8045161. doi: 10.1155/2017/8045161.
9. Bao M, Liu YJ. Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Protein Cell.* 2013 Jan;4(1):40-52. doi: 10.1007/s13238-012-2104-8.
10. Bilir C, Sarisozen C. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO): Only an enzyme or a checkpoint controller?. *J Onco Sci.* 2017 April; 3(2):52-56. doi:10.1016/j.jons.2017.04.001.
11. Bono MR, Fernández D, Flores-Santibáñez F, Roseblatt M, Sauma D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett.* 2015 Nov 14;589(22):3454-60. doi: 10.1016/j.febslet.2015.07.027.
12. Cauwels A, Rogge E, Vandendriessche B, Shiva S, Brouckaert P. Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality. *Cell Death Dis.* 2014 Mar 6;5(3):e1102. doi: 10.1038/cddis.2014.70.
13. Challier J, Bruniquel D, Sewell AK, Laugel B. Adenosine and cAMP signalling skew human dendritic cell differentiation towards a tolerogenic phenotype with defective CD8 (+) T-cell priming capacity. *Immunology.* 2013 Apr; 138(4):402-10. doi: 10.1111/imm.12053.
14. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 2018 May;154(1):3-20. doi: 10.1111/imm.12888.
15. Curti A, Trabanelli S, Salvestrini V, Baccarani M, Lemoli RM. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood.* 2009 Mar 12;113(11):2394-401. doi: 10.1182/blood-2008-07-144485.
16. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjoyji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007 Jun 11;204(6):1257-65. doi: 10.1084/jem.20062512.

17. Eisenbarth SC. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat Rev Immunol*. 2019 Feb;19(2):89-103. doi: 10.1038/s41577-018-0088-1.
18. Faget J, Bendriss-Vermare N, Gobert M, Durand I, Olive D, Biota C, Bachelot T, Treilleux I, Goddard-Leon S, Lavergne E, Chabaud S, Blay JY, Caux C, Ménétrier-Caux C. ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4⁺ T cells. *Cancer Res*. 2012 Dec 1;72(23):6130-41. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2409.
19. Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ*. 2007 Jul;14(7):1315-23. doi: 10.1038/sj.cdd.4402132.
20. Granot T, Senda T, Carpenter DJ, Matsuoka N, Weiner J, Gordon CL, Miron M, Kumar BV, Griesemer A, Ho SH, Lerner H, Thome JJC, Connors T, Reizis B, Farber DL. Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity*. 2017 Mar 21;46(3):504-515. doi: 10.1016/j.immuni.2017.02.019.
21. Han L, Sugiyama H, Zhang Q, Yan K, Fang X, McCormick TS, Cooper KD, Huang Q. Phenotypical analysis of ectoenzymes CD39/CD73 and adenosine receptor 2A in CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ regulatory T-cells in psoriasis. *Australas J Dermatol*. 2018 Feb;59(1):e31-e38. doi: 10.1111/ajd.12561.
22. Häusler SF, Del Barrio IM, Diessner J, Stein RG, Strohschein J, Hönig A, Dietl J, Wischhusen J. Anti-CD39 and anti-CD73 antibodies A1 and 7G2 improve targeted therapy in ovarian cancer by blocking adenosine-dependent immune evasion. *Am J Transl Res*. 2014 Jan 15;6(2):129-39. PMID: 24489992.
23. Heidkamp GF, Sander J, Lehmann CHK, Heger L, Eissing N, Baranska A, Lühr JJ, Hoffmann A, Reimer KC, Lux A, Söder S, Hartmann A, Zenk J, Ulas T, McGovern N, Alexiou C, Spriewald B, Mackensen A, Schuler G, Schauf B, Forster A, Repp R, Fasching PA, Purbojo A, Cesnjevar R, Ullrich E, Ginhoux F, Schlitzer A, Nimmerjahn F, Schultze JL, Dudziak D. Human lymphoid organ dendritic cell identity is predominantly dictated by ontogeny, not tissue

- microenvironment. *Sci Immunol*. 2016 Dec 16;1(6):eaai7677. doi: 10.1126/sciimmunol.aai7677.
24. Hornyák L, Dobos N, Koncz G, Karányi Z, Páll D, Szabó Z, Halmos G, Székvölgyi L. The Role of Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Cancer Development, Diagnostics, and Therapy. *Front Immunol*. 2018 Jan 31;9:151. doi: 10.3389/fimmu.2018.00151.
25. Jahrsdörfer B, Vollmer A, Blackwell SE, Maier J, Sontheimer K, Beyer T, Mandel B, Lunov O, Tron K, Nienhaus GU, Simmet T, Debatin KM, Weiner GJ, Fabricius D. Granzyme B produced by human plasmacytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion. *Blood*. 2010 Feb 11;115(6):1156-65. doi: 10.1182/blood-2009-07-235382.
26. Kayhan M, Koyas A, Akdemir I, Savas AC, Cekic C. Adenosine Receptor Signaling Targets Both PKA and Epac Pathways to Polarize Dendritic Cells to a Suppressive Phenotype. *J Immunol*. 2019 Dec 15; 203(12):3247-3255. doi: 10.4049/jimmunol.1900765.
27. Knight JS, Mazza LF, Yalavarthi S, Sule G, Ali RA, Hodgins JB, Kanthi Y, Pinsky DJ. Ectonucleotidase-Mediated Suppression of Lupus Autoimmunity and Vascular Dysfunction. *Front Immunol*. 2018 Jun 11;9:1322. doi: 10.3389/fimmu.2018.01322.
28. Koyama M, Hashimoto D, Aoyama K, Matsuoka K, Karube K, Niino H, Harada M, Tanimoto M, Akashi K, Teshima T. Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. *Blood*. 2009 Feb 26;113(9):2088-95. doi: 10.1182/blood-2008-07-168609.
29. Lehto MT, Sharom FJ. Release of the glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme ecto-5'-nucleotidase by phospholipase C: catalytic activation and modulation by the lipid bilayer. *Biochem J*. 1998 May 15;332 (Pt 1)(Pt 1):101-9. doi: 10.1042/bj3320101.
30. Li S, Wu J, Zhu S, Liu YJ, Chen J. Disease-Associated Plasmacytoid Dendritic Cells. *Front Immunol*. 2017 Oct 16;8:1268. doi: 10.3389/fimmu.2017.01268.

31. Linnemann C, Schildberg FA, Schurich A, Diehl L, Hegenbarth SI, Endl E, Lacher S, Müller CE, Frey J, Simeoni L, Schraven B, Stabenow D, Knolle PA. Adenosine regulates CD8 T-cell priming by inhibition of membrane-proximal T-cell receptor signalling. *Immunology*. 2009 Sep;128(1 Suppl):e728-37. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03075.x.
32. Loures FV, Röhm M, Lee CK, Santos E, Wang JP, Specht CA, Calich VL, Urban CF, Levitz SM. Recognition of *Aspergillus fumigatus* hyphae by human plasmacytoid dendritic cells is mediated by dectin-2 and results in formation of extracellular traps. *PLoS Pathog*. 2015 Feb 6;11(2):e1004643. doi: 10.1371/journal.ppat.1004643.
33. Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Ren J, Lang S, Jackson EK, Gorelik E, Whiteside TL. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *J Biol Chem*. 2010 Mar 5;285(10):7176-86. doi: 10.1074/jbc.M109.047423.
34. Manz MG. Plasmacytoid dendritic cells: origin matters. *Nat Immunol*. 2018 Jul;19(7):652-654. doi: 10.1038/s41590-018-0143-x.
35. Marinelli O, Nabissi M, Morelli MB, Torquati L, Amantini C, Santoni G. ICOS-L as a Potential Therapeutic Target for Cancer Immunotherapy. *Curr Protein Pept Sci*. 2018;19(11):1107-1113. doi: 10.2174/1389203719666180608093913.
36. Mathan TS, Figdor CG, Buschow SI. Human plasmacytoid dendritic cells: from molecules to intercellular communication network. *Front Immunol*. 2013 Nov 12;4:372. doi: 10.3389/fimmu.2013.00372.
37. Mauricio Rueda C., Andrea Velilla, P., Rojas, M., & Teresa Rugeles, M. (2012). *AMPc: una molécula clave en los eventos de regulación inmune y en el control de la replicación del VIH*. *Infectio*, 16(1), 59–71. doi:10.1016/s0123-9392(12)70058-9.
38. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state

- and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:563-604. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074950.
39. Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, Antonia SJ, Messina JL, Chandler P, Koni PA, Mellor AL. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest.* 2004 Jul;114(2):280-90. doi: 10.1172/JCI21583.
40. Nedeljkovic N. Complex regulation of ecto-5'-nucleotidase/CD73 and A_{2A}R-mediated adenosine signaling at neurovascular unit: A link between acute and chronic neuroinflammation. *Pharmacol Res.* 2019 Jun;144:99-115. doi: 10.1016/j.phrs.2019.04.007.
41. Niemelä J, Henttinen T, Yegutkin GG, Airas L, Kujari AM, Rajala P, Jalkanen S. IFN- α induced adenosine production on the endothelium: a mechanism mediated by CD73 (ecto-5'-nucleotidase) up-regulation. *J Immunol.* 2004 Feb 1;172(3):1646-53. doi: 10.4049/jimmunol.172.3.1646.
42. Novitskiy SV, Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Huang Y, Tikhomirov OY, Blackburn MR, Biaggioni I, Carbone DP, Feoktistov I, Dikov MM. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood.* 2008 Sep 1;112(5):1822-31. doi: 10.1182/blood-2008-02-136325.
43. Ohta A, Sitkovsky M. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. *Front Immunol.* 2014 Jul 10;5:304. doi: 10.3389/fimmu.2014.00304.
44. Palomo, F. R., Sanchez, P. J. C., risalde, M. A., Pedrera, M., Molina, V., Villamor, E. R. & Villamandos, J. C. (2011). *Funciones y Clasificación de las Células Dendriticas.*
45. Panda SK, Kolbeck R, Sanjuan MA. Plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2017 Feb;44:20-25. doi: 10.1016/j.coi.2016.10.006.
46. Pettengill, M., Robson, S., Tresenriter, M., Millán, J.L., Usheva, A., Bingham, T., Belderbos, M., Bergelson, I., Burl, S., Kampmann, B., Gelinas, L., Kollmann, T., Bont, L., Levy, O. Soluble ecto-5'-nucleotidase (5'-NT), alkaline

- phosphatase, and adenosine deaminase (ADA1) activities in neonatal blood favor elevated extracellular adenosine. *J Biol Chem*. 2013. 288(38):27315-27326.
47. Ray A, Song Y, Du T, Buon L, Tai YT, Chauhan D, Anderson KC. Identification and validation of ecto-5' nucleotidase as an immunotherapeutic target in multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2022 Apr 1;12(4):50. doi: 10.1038/s41408-022-00635-3.
48. Reizis B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity*. 2019 Jan 15;50(1):37-50. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.027.
49. Reynolds G, Haniffa M. Human and Mouse Mononuclear Phagocyte Networks: A Tale of Two Species? *Front Immunol*. 2015 Jun 25;6:330. doi: 10.3389/fimmu.2015.00330.
50. Schneider E, Rissiek A, Winzer R, Puig B, Rissiek B, Haag F, Mittrücker HW, Magnus T, Tolosa E. Generation and Function of Non-cell-bound CD73 in Inflammation. *Front Immunol*. 2019 Jul 26;10:1729. doi: 10.3389/fimmu.2019.01729.
51. Schuler PJ, Saze Z, Hong CS, Muller L, Gillespie DG, Cheng D, Harasymczuk M, Mandapathil M, Lang S, Jackson EK, Whiteside TL. Human CD4+ CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells. *Clin Exp Immunol*. 2014 Aug;177(2):531-43. doi: 10.1111/cei.12354.
52. See P, Dutertre CA, Chen J, Günther P, McGovern N, Irac SE, Gunawan M, Beyer M, Händler K, Duan K, Sumatoh HRB, Ruffin N, Jouve M, Gea-Mallorquí E, Hennekam RCM, Lim T, Yip CC, Wen M, Malleret B, Low I, Shadan NB, Fen CFS, Tay A, Lum J, Zolezzi F, Larbi A, Poidinger M, Chan JKY, Chen Q, Rénia L, Haniffa M, Benaroch P, Schlitzer A, Schultze JL, Newell EW, Ginhoux F. Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science*. 2017 Jun 9;356(6342):eaag3009. doi: 10.1126/science.aag3009.

53. Shortman K, Sathe P, Vremec D, Naik S, O'Keeffe M. Plasmacytoid dendritic cell development. *Adv Immunol.* 2013;120:105-26. doi: 10.1016/B978-0-12-417028-5.00004-1.
54. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science.* 1999 Jun 11;284(5421):1835-7. doi: 10.1126/science.284.5421.1835.
55. Silva-Vilches C, Ring S, Schrader J, Clausen BE, Probst HC, Melchior F, Schild H, Enk A, Mahnke K. Production of Extracellular Adenosine by CD73⁺ Dendritic Cells Is Crucial for Induction of Tolerance in Contact Hypersensitivity Reactions. *J Invest Dermatol.* 2019 Mar;139(3):541-551. doi: 10.1016/j.jid.2018.10.016.
56. Su W, Chen X, Zhu W, Yu J, Li W, Li Y, Li Z, Olsen N, Liang D, Zheng SG. The cAMP-Adenosine Feedback Loop Maintains the Suppressive Function of Regulatory T Cells. *J Immunol.* 2019 Sep 15; 203(6):1436-1446. doi: 10.4049/jimmunol.
57. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2015 Aug;15(8):471-85. doi: 10.1038/nri3865.
58. Swiecki M, Colonna M. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol Rev.* 2010 Mar;234(1):142-62. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00881.x.
59. Tang F, Du Q, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in antiviral immunity and autoimmunity. *Sci China Life Sci.* 2010 Feb;53(2):172-182. doi: 10.1007/s11427-010-0045-0.
60. Torres-Aguilar H, Aguilar-Ruiz SR, González-Pérez G, Munguía R, Bajaña S, Meraz-Ríos MA, Sánchez-Torres C. Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 2010 Feb 15;184(4):1765-75. doi: 10.4049/jimmunol.0902133.
61. Villani AC, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, Griesbeck M, Butler A, Zheng S, Lazo S, Jardine L, Dixon D, Stephenson E,

- Nilsson E, Grundberg I, McDonald D, Filby A, Li W, De Jager PL, Rozenblatt-Rosen O, Lane AA, Haniffa M, Regev A, Hacohen N. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*. 2017 Apr 21;356(6335):eaah4573. doi: 10.1126/science.aah4573.
62. Von Glehn F, Santos LM, Balashov KE. Plasmacytoid dendritic cells and immunotherapy in multiple sclerosis. *Immunotherapy*. 2012 Oct;4(10):1053-61. doi: 10.2217/imt.12.117.
63. Young LJ, Wilson NS, Schnorrer P, Proietto A, ten Broeke T, Matsuki Y, Mount AM, Belz GT, O'Keeffe M, Ohmura-Hoshino M, Ishido S, Stoorvogel W, Heath WR, Shortman K, Villadangos JA. Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol*. 2008 Nov;9(11):1244-52. doi: 10.1038/ni.1665.

9. ANEXOS

9.1 CONSENTIMIENTO INFORMADO



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Donadores sanos.

Oaxaca de Juárez, Oaxaca, a 25 de mayo de 2021.

Por medio de la presente doy mi consentimiento para participar en el proyecto de Investigación:

"Identificación de marcadores tolerogénicos de Células Dendríticas Plasmacitoides en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico"

Entiendo que la realización de este estudio no afecta negativa o positivamente mi estado de salud, ya que su objetivo es identificar marcadores tolerogénicos en Células Dendríticas Plasmacitoides para evaluar su comportamiento y yo he sido elegido como donador sano para evaluar el comportamiento de estas células bajo condiciones normales.

El investigador principal me ha explicado el proyecto, me ha aclarado todas mis dudas y se ha comprometido a responder nuevas dudas que surjan posteriormente, ya sea durante el procedimiento en el cual voy a participar o después.

Entiendo que mi participación en el proyecto consiste en aceptar que se me tome una muestra de sangre de 200 ml del antebrazo y que los posibles riesgos del procedimiento no son mayores a los de una toma de sangre habitual, como hematoma (moretón) o dolor en el sitio de la punción y que no conlleva a ningún riesgo para mi salud.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme en cualquier momento del estudio sin que esto tenga ningún tipo de consecuencias. Así como que mi participación no tendrá ningún costo, ni recibiré ningún tipo de compensación en dinero o especie.

El investigador principal me ha dado la seguridad y garantía de que los datos obtenidos serán manejados en forma confidencial y se me informará del desarrollo de la investigación en caso de que yo así lo solicite en la Facultad de Ciencias Químicas, Avenida Universidad S/N, Colonia Ex-hacienda Cinco Señores, Oaxaca, México. C.P.68120. Teléfono 01 (951) 51 112 63 ext. 111. Celular: 951 210 00 57.

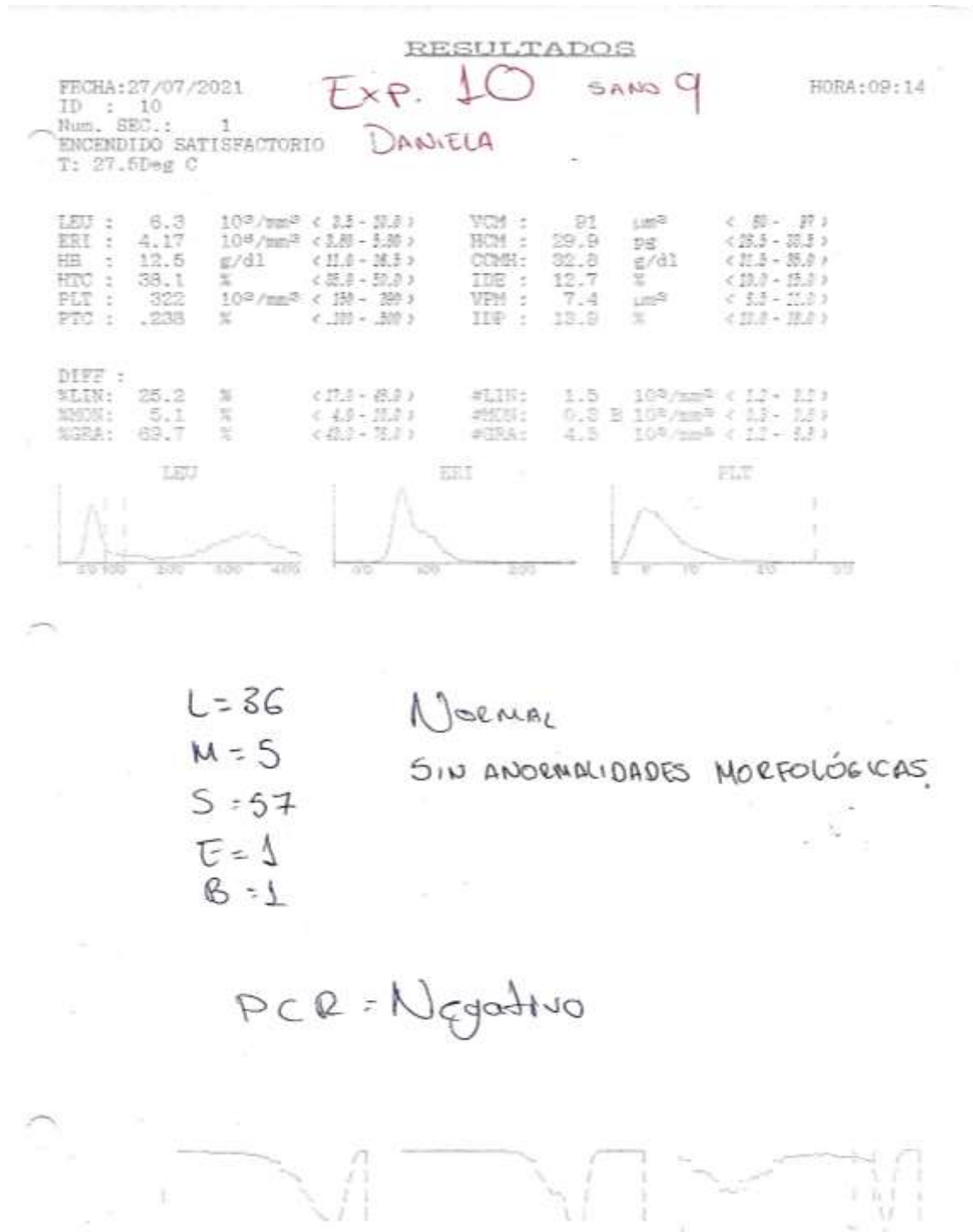

Nombre y firma del participante


Nombre y firma del investigador


Nombre y firma de testigo 1


Nombre y firma de testigo 2

9.2 DATOS LABORATORIALES (BIOMETRÍA HEMÁTICA)



9.3 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA (CONTROL CD73+) EN MSC Y PBMC

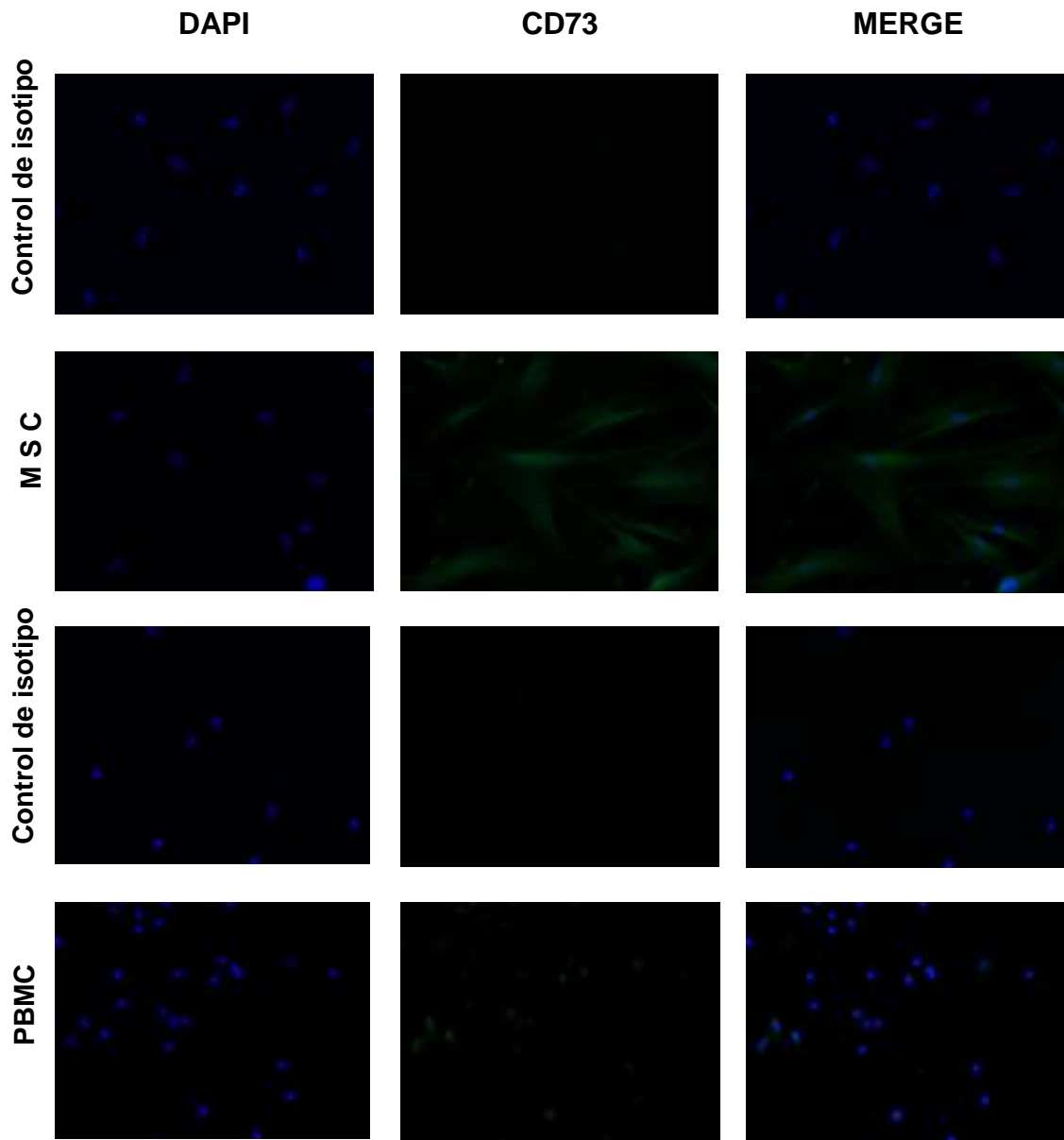


Fig. 35 Expresión de CD73 en MSC y PBMC.

Para verificar una óptima metodología del ensayo de microscopía, implementamos la tinción de CD73 en células positivas. El núcleo se muestra en azul (DAPI) y CD73 se revela en verde (AF488). Las células estromales mesenquimales (MSC) presenta alrededor de 90-100% la molécula CD73 (segundo panel). Mientras que en otras células como los PBMC en promedio es menor al 20%. Esto se realizó con el fin de estandarizar la técnica y establecimiento de controles.

9.4 ARTÍCULOS PUBLICADOS

Immunologic Research
https://doi.org/10.1007/s12026-021-09199-z

ORIGINAL ARTICLE



Structural differences of neutrophil extracellular traps induced by biochemical and microbiologic stimuli under healthy and autoimmune milieus

Sorely Adelina Sosa-Luis¹ · William de Jesús Ríos-Ríos² · Angeles Esmeralda Gómez-Bustamante² · María de los Angeles Romero-Tlalolini³ · Sergio Roberto Aguilar-Rutz⁴ · Rafael Baltieraz-Hoyos² · Honorio Torres-Aguilar²

Received: 29 September 2020 / Accepted: 23 April 2021
© The Author(s), under exclusive license to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

Neutrophil extracellular traps (NETs) are networks of decondensed chromatin loaded with antimicrobial peptides and enzymes produced against microorganisms or biochemical stimuli. Since their discovery, numerous studies made separately have revealed multiple triggers that induce similar NET morphologies allowing to classify them as lytic or non-lytic. However, the variability in NET composition depending on the inducer agent and the local milieu under similar conditions has been scarcely studied. In this work, a comparative study was conducted to evaluate structural and enzymatic divergences in NET composition induced by biochemical (phorbol myristate acetate [PMA] and hypochlorous acid [HOCl]) and microbiologic (*Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*) stimuli, along with the presence of plasma from healthy donors or patients with systemic lupus erythematosus (SLE). The results showed a differential composition of DNA and the antimicrobial peptide cathelicidin (LL37) and a variable enzymatic activity (neutrophil elastase, cathepsin G, myeloperoxidase) induced by the different stimuli despite showing morphologically similar NETs. Additionally, SLE plasma's presence increased DNA and LL37 release during NET induction independently of the trigger stimulus but with no enzymatic activity differences. This work provides new evidence about NET composition variability depending on the inducer stimulus and the local milieu.

Keywords Neutrophils · Neutrophil extracellular traps · Innate immune response · Autoimmunity · Systemic lupus erythematosus

Introduction

Neutrophils are the most numerous white blood cells crucial for the defense against infection in the innate immune response. Phagocytosis, granule releasing, and reactive oxygen species (ROS) production were their initially described microbicide mechanisms. In this regard, neutrophils may perform directed and specialized functions according to the recognized pathogens by selecting granular components and cytokines [1]. Additionally, NETosis was later described as an alternative neutrophil antimicrobial role. Neutrophil extracellular traps (NETs) are networks or filaments of decondensed chromatin loaded with histones, enzymes, and antimicrobial peptides. This process was defined as a different type of programmed cell death for capturing, neutralizing, and eliminating certain kinds of bacteria, fungi, and some viruses, contributing to neutrophils' functional

Honorio Torres-Aguilar
qbbtororio@hotmail.com

¹ Department of Molecular Biomedicine, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

² Clinical Immunology Research Department of Biochemical Sciences Faculty, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, Oaxaca City, Mexico

³ CONACYT - Medicine and Surgery Faculty, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, Oaxaca City, Mexico

⁴ Molecular Immunology Research Department of Medicine and Surgery Faculty, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, Oaxaca City, Mexico

Published online: 04 May 2021

Springer

Current advances in using tolerogenic dendritic cells as a therapeutic alternative in the treatment of type 1 diabetes

William de Jesús Ríos-Ríos, Sorely Adeline Sosa-Luis, Honorio Torres-Aguilar

ORCID number: William de Jesús Ríos-Ríos (0000-0001-9851-7130); Sorely Adeline Sosa-Luis (0000-0001-4785-9086); Honorio Torres-Aguilar (0000-0001-2853-4891).

Author contributions: All authors contributed to the writing of the manuscript; Torres-Aguilar H supervised the project and generated the final version of the paper.

Supported by A basic science grant from CONACyT, No. 285490; and the Department of Clinical Immunology Research of the Biochemical Sciences Faculty.

Conflict-of-interest statement: The authors have declared having no conflicts of interest.

Open-Access: This article is an open-access article that was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution NonCommercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

William de Jesús Ríos-Ríos, Honorio Torres-Aguilar, Department of Biochemical Sciences Faculty, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, Oaxaca 68120, Mexico

Sorely Adeline Sosa-Luis, Department of Molecular Biomedicine, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City 07360, Mexico

Corresponding author: Honorio Torres-Aguilar, PhD, Professor, Department of Biochemical Sciences Faculty, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, Av. Universidad S/N Ex-Hacienda 5 Señores, Oaxaca 68120, Mexico. qblamerico@hotmail.com

Abstract

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by the destruction of insulin-producing β -cells of the pancreatic islets by autoreactive T cells, leading to high blood glucose levels and severe long-term complications. The typical treatment indicated in T1D is exogenous insulin administration, which controls glucose levels; however, it does not stop the autoimmune process. Various strategies have been implemented aimed at stopping β -cell destruction, such as cellular therapy. Dendritic cells (DCs) as an alternative in cellular therapy have gained great interest for autoimmune disease therapy due to their plasticity to acquire immunoregulatory properties both *in vitro* and *in vivo*, performing functions such as anti-inflammatory cytokine secretion and suppression of autoreactive lymphocytes, which are dependent of their tolerogenic phenotype, displayed by features such as semimature phenotype, low surface expression of stimulatory molecules to prime T cells, as well as the elevated expression of inhibitory markers. DCs may be obtained and propagated easily in optimal amounts from peripheral blood or bone marrow precursors, such as monocytes or hematopoietic stem cells, respectively; therefore, various protocols have been established for tolerogenic (tol)DCs manufacturing for therapeutic research in the treatment of T1D. In this review, we address the current advances in the use of tolDCs for T1D therapy, encompassing protocols for their manufacturing, the data obtained from preclinical studies carried out, and the status of clinical research evaluating the safety, feasibility, and effectiveness of tolDCs.

Key Words: Type 1 diabetes; Dendritic cells; Autoimmunity; Immune tolerance; Cell therapy; Immunotherapy

©The Author(s) 2021. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Review

T Cells Subsets in the Immunopathology and Treatment of Sjogren's Syndrome

William de Jesús Ríos-Ríos ¹, Sorely Adelina Sosa-Luis ² and Honorio Torres-Aguilar ^{1,*}

¹ Department of Clinical Immunology Research of Biochemical Sciences Faculty, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, Oaxaca City 68120, Mexico; qfríoswilliam@hotmail.com

² Department of Molecular Biomedicine, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City 07360, Mexico; mirena.leluiso22@gmail.com

* Correspondence: qhonorio@hotmail.com; Tel.: +52-951-210-00-57

Received: 16 October 2020; Accepted: 8 November 2020; Published: 11 November 2020

Abstract: Sjogren's syndrome (SS) is an autoimmune disease whose pathogenesis is characterized by an exacerbated T cell infiltration in exocrine glands, markedly associated to the inflammatory and detrimental features as well as the disease progression. Several helper T cell subsets sequentially converge at different stages of the ailment, becoming involved in specific pathologic roles. Initially, their activated phenotype endows them with high migratory properties and increased pro-inflammatory cytokine secretion in target tissues. Later, the accumulation of immunomodulatory T cells-derived factors, such as IL-17, IFN- γ , or IL-21, preserve the inflammatory environment. These effects favor strong B cell activation, instigating an extrafollicular antibody response in ectopic lymphoid structures mediated by T follicular helper cells (T_{fh}) and leading to disease progression. Additionally, the memory effector phenotype of CD8⁺ T cells present in SS patients suggests that the presence of auto-antigen restricted CD8⁺ T cells might trigger time-dependent and specific immune responses. Regarding the protective roles of traditional regulatory T cells (T_{reg}), uncertain evidence shows decrease or invariable numbers of circulating and infiltrating cells. Nevertheless, an emerging T_{reg} subset named follicular regulatory T cells (T_{fr}) seems to play a critical protective role owing to their deficiency that enhances SS development. In this review, the authors summarize the current knowledge of T cells subsets contribution to the SS immunopathology, focusing on the cellular and biomolecular properties allowing them to infiltrate and to harm target tissues, and that simultaneously make them key therapeutic targets for SS treatment.

Keywords: Sjogren's syndrome; T cell subsets; infiltrating T cells; immunomodulatory cytokines; emerging T cells; therapeutic targets

1. Introduction

Sjogren's syndrome (SS) is a complex, inflammatory, autoimmune disorder characterized by damage to the salivary and lacrimal glands, which may lead to the loss of appropriate tear and saliva production, resulting in symptoms of severe dry eyes and mouth. The pathology in SS may additionally extend from sicca symptoms and complications of mucosal dryness, as a result of exocrine gland involvement, to a systemic disease or even to malignant B cell lymphoproliferation. SS is called "primary" (pSS) when it occurs alone, or "secondary" (sSS) if it is associated to the presence of another autoimmune disease [1]. Current evidence suggests that T cells form a large part of the lymphocytic infiltrated at earlier stages of the disease, involved in tolerance loss to self-antigens and in the secretion of many pro-inflammatory cytokines associated to local inflammation [2,3].

T cells comprise the helper T cell populations (CD4⁺), which differentiate in several subsets such as Th1, Th2, Th17, regulatory T cells (T_{reg}), and T follicular helper cells (T_{fh}), as well as CD8⁺ T cells, also called Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) [4]. Increased T cells infiltration into salivary glands (SG)

REVIEW ARTICLE



Silent red blood cell autoantibodies: Are they naturally occurring or an effect of tolerance loss for a subsequent autoimmune process?

Honorio Torres-Aguilar^a, Sorely Adelina Sosa-Luis^b, William de Jesús Ríos-Ríos^a, María de los Ángeles Romero-Tlalolini^c and Sergio Roberto Aguilar-Ruiz^a

^aClinical Immunology Research Department of Biochemical Sciences Faculty, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, Oaxaca City, Mexico; ^bDepartment of Molecular Biomedicine, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico; ^cMolecular Immunology Research Department of Medicine and Surgery Faculty, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, Oaxaca City, Mexico

ABSTRACT

Unexpected anti-red blood cell (RBC) alloantibodies are routinely investigated in immunohematology and blood banking since their existence in pregnant women may induce haemolytic disease of the foetus and newborn, and their presence in donors may induce haemolytic transfusion reactions or hyperacute rejection in solid organ transplantation. Unexpected anti-RBC alloantibodies may target antigens of the most blood types excluding the expected antibodies targeting the ABO antigens. Their incidence in humans was originally linked to alloimmunization events such as blood transfusion, transplants, or pregnancies. But later, many findings revealed their existence in pathogenic processes such as malignancies, infections, and autoimmune diseases; and usually (but not always) associated to autoimmune haemolytic anaemia (AHA). Nevertheless, unexpected anti-RBC autoantibodies are also occasionally found in healthy individuals in the absence of AHA and with no history of alloimmunization or the associated pathologic processes. Hence, they are generally known as non-clinically significant, are excluded for typification and called "silent red blood cell autoantibodies (SRBCAA)". This review highlights evidence related to genetic predisposition, molecular mimicry, immune dysregulation, and immune tolerance loss surrounding the existence of anti-RBC antibodies, describing the presence of SRBCAA as possible early witnesses of the development of autoimmune diseases.

GRAPHICAL ABSTRACT



Red blood cells antigens as targets for the loss of immune tolerance. A) Native structures of RBC antigens are membrane-anchored molecules, though some of them present soluble forms or are also expressed in tissues. B) RBC distribution throughout inflammatory milieu makes them vulnerable targets to structural changes induced by oxidative species and free radicals. C) During malignancies, overexpression, mutations, changes in half-lives, misfolding, aberrant degradation and altered post-translational modifications of RBC antigens produce TAA. D) Molecular mimicry between pathogenic microorganisms and RBC antigens. E) the ability to present certain donor RBC antigens restricted by the recipient MHC molecules in genetically predisposed individuals and an immune dysregulation mediated by chronic inflammation are relevant factors likely associated to the activation of F) low affinity existing autoreactive T and B cells, G) with the subsequent production of SRBCAA. H) Depending on intrinsic properties of the produced anti-RBC autoantibody and the expression of its target molecule; I) SRBCAA detecting RBC antigens expressed in other cells might become pathogenic by producing intravascular or extravascular hemolysis (on RBC), immune complexes (on soluble forms), TTP (on platelets), leukopenia (on leukocytes) or another autoimmune process (eg. on fibroblasts), and even keep silent until detected by a stochastic event: MHC, Major Histocompatibility Complex; TTP (immune thrombocytopenic purpura); RBC, Red Blood Cells; SRBCAA, Silent Red Blood Cells Auto Antibodies; TAA, Tumor Associated Antigens.

ARTICLE HISTORY

Received 20 May 2020
Revised 13 July 2020
Accepted 20 July 2020

KEYWORDS

Red blood cell antigens; unexpected antibodies; silent red blood cell autoantibodies; immunological tolerance loss; autoimmunity.

CONTACT Honorio Torres-Aguilar qhoronio@fohnal.com Clinical Immunology Research Department of Biochemical Sciences Faculty, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, Av. Universidad s/n, C.P. Oaxaca City 68120, Mexico

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



Infections as triggers of flares in systemic autoimmune diseases: novel innate immunity mechanisms

Honorio Torres-Aguilar^a, Sorely A. Sosa-Luis^b, and Sergio R. Aguilar-Ruiz^c

Purpose of review

The innate immune response (IR) has to be immediate facing pathogens, and effective to induce a long-lasting adaptive immunity and immune memory. In genetically susceptible individuals, beyond a first defense, a chronically activated by infections IR may represent a trigger for the onset or flares in systemic autoimmune diseases. This article reviews the recent scientific literature in this regard and highlights the key issues needing investigation.

Recent findings

Thanks to its high specificity mediated by pattern recognition receptors, the IR is not called unspesific anymore. The discovery of these increasingly accurate recognizing molecular mechanisms has also evidenced their involvement in breaking self-immune tolerance and to maintain chronic inflammation in autoimmune response. Neutrophil extracellular traps (NETs) as the main source of antinuclear antibodies; the 'neutrophils-pDC activation loop' theory; and the Th1/Th2/Th17 imbalances induced by microbial products because of chronically activated innate immune cells, are some of the recent uncovered IIR origins involved in infectious-induced systemic autoimmune diseases.

Summary

A deeper understanding of the genetic predisposition and the pathogen-derived factors responsible to exacerbate the IIR might potentially provide therapeutic targets to counteract flares in systemic autoimmune diseases.

Video abstract

<http://links.lww.com/COR/A44>

Keywords

infectious-induced autoimmune diseases, innate humoral factors, innate immune cells, innate immune mechanisms

INTRODUCTION

Innate immune cells (neutrophils, eosinophils, basophils, mast cells, macrophages, natural killers, innate lymphoid cells, monocytes, dendritic cells and platelets) bear intracellular and extracellular pattern recognition receptors (PRRs), such as Toll-like receptors (TLRs), Nod-like receptors, RIG-I-like receptors, C-type lectin receptors, Absent in melanoma 2-like receptors, oligoadenylate synthase family proteins and cyclic GMP-AMP synthase, focused on recognizing conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) present in large groups of microorganisms [1]. This specialized molecular identification elicits an immediate defensive response but, to become efficient, it must also activate a long-lasting adaptive immunity and induce immune memory. The innate immune response (IIR) also involves soluble mediators (defensins, complement system, collectins/ficolins

and pentraxins) that destroy and/or opsonize microbes [2]. Infections in individuals with genetic or functional alterations in any of these recognizing molecules may produce chronic activation and lead to dysfunctional changes in IIR mechanisms, representing triggers for the onset or flares in systemic autoimmune diseases.

^aClinical Research Department of Chemical Sciences Faculty, Universidad Autónoma 'Benito Juárez' de Oaxaca, Oaxaca City, ^bDepartment of Molecular Biomedicine, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City and ^cMolecular Immunology Research of Medicine and Surgery Faculty, Universidad Autónoma 'Benito Juárez' de Oaxaca, Oaxaca City, Mexico

Correspondence to: Honorio Torres-Aguilar, PhD, Clinical Research Department of Biochemical Sciences Faculty, Universidad Autónoma 'Benito Juárez' de Oaxaca, Av. Universidad s/n, CP. 68130, Oaxaca City, Mexico. Tel: +52 95 22 10 00 57; e-mail: qthoriano@hotmail.com

Curr Opin Rheumatol 2019, 31:525–531

DOI:10.1097/BOR.0000000000000680