

Propiedades migratorias de las células dendríticas y grado de infectividad en infección por *Leishmania (L) mexicana* en el modelo múdo de tolerancia

Cisneros González Ligia Elena*
Pereira Rocca Geraldo José*
Aguin Melendez Víctor José*

Migratory properties of dendritic cells and degree of infectivity by infection with *Leishmania (L) mexicana* in the murine model of tolerance

Fecha de aceptación: septiembre 2011

Resumen

En el modelo múdo de tolerancia a la infección por *Leishmania (L) mexicana*, las células dendríticas (CDs) son determinantes en la respuesta, lo cual se puede deber a una alteración en su capacidad migratoria. Esta propiedad puede ser afectada por diversos estímulos (parásitos, quimiocinas o citocinas). En nuestra investigación estudiamos, la migración e infectividad hacia las células dendríticas de ratones BALB/c sanos (CDsS), infectados *in vivo* (CDsI) e *in vitro* (CDsP).

MÉTODOLÓGIA. En migración, fueron aisladas CDsS, CDsI y CDsP con *Leishmania (L) mexicana*, colocadas en una cámara de quimiotaxis, frente a las citocinas RANTES, TNF, y sobrenadante de parásitos. Para la infectividad intracelular, fueron incubadas previamente promastigotas de *Leishmania (L) mexicana* con fluorocromo, y luego se evaluó el grado de infección a través de intensidad de fluorescencia por citometría de flujo.

RESULTADOS. El índice de migración (IM) de las CDsS, fue significativamente mayor al compararlo con las CDsI y CDsP. El IM de CDsS y CDsP en presencia de RANTES y TNF, fue significativamente mayor a las CDsI; la migración depende de la concentración de citocinas.

DISCUSIÓN. Los resultados sugieren, que el microambiente en que se encuentran las CDs al exponerse al estímulo es determinante en el comportamiento migratorio de la célula. En cuanto a la infectividad, en el contacto previo con el parásito disminuye su capacidad de captar el antígeno (Ag) y procesarlo, estableciendo un estado de tolerancia.

CONCLUSIÓN: La migración de CDs depende del microambiente, la intensidad y tipo de estímulo, y el contacto previo con el antígeno. El grado de infectividad depende del estado tolerógeno previo de las CDs.

Palabras clave: Células dendríticas, BALB/c, migración, infectividad, quimiocinas, citocina.

Abstract

In the murine model of tolerance to infection by *Leishmania (L) mexicana*, dendritic cells (CDs) are critical in this response, this may be due to an alteration in their migratory prowess. This property may be affected by various stimuli (parasite, chemokines or cytokines). In our research we study the migration and infectivity of CDs of mice BALB/c healthy (CDsS), infected *in vivo* (CDsI) and *in vitro* (CDsP).

METHODOLOGY. In migration, were isolated CDsS, CDsI and CDsP with *Leishmania (L) mexicana*, placed in a chemotaxis chamber, compared RANTES, TNF, and supernatant of parasite. For intracellular infectivity were preincubated promastigotes of *Leishmania (L) mexicana* with fluorochrome, and then assessed the degree of infection by fluorescence flow cytometry.

RESULTS. The rate of migration (IM) of CDsS, was significantly higher when compared with CDsI and CDsP. The IM of CDsS and CDsP in the presence of RANTES and TNF, was significantly greater than that of CDsI, this migration depends on the concentration of such cytokines.

DISCUSSION. The results suggest that the microenvironment in which the CDs is exposed to the stimulus is critical for the migratory behavior of that cell. In terms of infectivity, the previous contact with the parasite reduces its ability to capture and process the antigen (Ag), establishing a state of tolerance.

CONCLUSION. The migration of CDs depends on the microenvironment, the intensity and type of stimulus, and previous contact with antigen. The infectivity depends of the previous tolerogenic state of the CDs.

Keywords: dendritic cells, BALB/c, migration, infectivity, chemokines, cytokine.

*Médico de la Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Venezuela.

Correspondencia: Víctor Aguin, Urb. San José de Tarbes, Res.

Tarbes "B", Apart 9-A. Valencia, Venezuela.

Dirección electrónica: vinote@hotmail.com.

Introducción

En el lenguaje de la inmunología, las células dendríticas (CDs) son también llamadas células presentadoras profesionales de antígenos (Ag), y desde el punto de vista morfológico, presentan un conjunto de extensiones citoplasmáticas denominadas pseudópodos que les dan un aspecto estelar, les confieren gran movilidad, y les permiten interactuar fácilmente con diversos antígenos.¹ Además, se encuentran ampliamente distribuidas en todo el organismo. Son llamadas células presentadoras de antígenos profesionales porque poseen una potente capacidad de presentación antigénica permitiéndoles estimular a los linfocitos T e iniciar la respuesta inmunitaria específica.²

Las células dendríticas, se originan a partir de un precursor hematopoyético CD34+, que da lugar a dos poblaciones de células progenitoras: mieloide y linfoide.^{3,4} Las células dendríticas mieloides provienen del precursor que da origen a los granulocitos y macrófagos. Las células dendríticas linfoides, a diferencia de las células mieloides, entran al timo para alojarse y desarrollarse en la médula tímica, en la unión córtico medular, o viajan directamente, hacia los órganos linfoides secundarios y se desarrollan en células dendríticas bajo la influencia de una combinación de diferentes citocinas.^{5,6}

Otro aspecto a destacar es que las células dendríticas, cuando salen a la periferia a colonizar los diferentes tejidos, se encuentran en un estado "inmaduro". Ellas se activan y maduran bajo ciertas condiciones, como el encuentro con un patógeno o muerte celular masiva (estados de alarma) así como la interacción CD40/CD40L y la presencia de citocinas proinflamatorias; en estas dos etapas de maduración las CDs se encuentran reguladas por un conjunto de mediadores, citocinas y quimiocinas, que establecen un balance finamente regulado, donde un grupo de éstos actúa sobre las células dendríticas inmaduras y otro grupo actúa sobre las células dendríticas maduras. Esto significa que la presencia adecuada de mediadores específicos, sumado a la expresión coordinada de receptores, juega un papel crítico en la culminación eficiente de dichas funciones.⁶

Las propiedades biológicas (captación y procesamiento del antígeno, migración hacia los ganglios linfáticos y presentación del antígeno al linfocito T virgen) y funciones de las CDs, dependen del estado de maduración de la célula, de su localización o microambiente que las rodea. Uno de sus papeles fundamentales es la inducción y polarización de la respuesta inmunitaria hacia Th1 o Th2, además de cumplir un papel importante en la tolerancia inmunitaria central, mediante la educación y selección tímica de los linfocitos T, y periférica.^{1,7}

Las CDs inmaduras detectan señales de peligro o alarma (microorganismos patógenos, células infectadas, células muertas o sus productos) a través de varios mecanismos: a) macropinocitosis; b) endocitosis mediada por PRRs (Receptores de Reconocimiento de Patógenos) como tipo lectina (receptor de manosa, DEC-205)^{8,9} o receptores Fcγ I (CD64) y II (CD32);⁹ y c) fagocitosis de fragmentos antigénicos.^{10,11} Después de captar el antígeno, la célula dendrítica lo procesa y, dependiendo del microambiente

de citocinas donde se encuentra, madura y se traslada hacia el ganglio linfático más cercano.^{12,13} Para que la migración se efectúe, la CD expresa una serie de receptores de quimiocinas o receptores de citocinas cuya expresión varía en función del estado de maduración de la célula.¹³ En primer lugar, la CD debe movilizarse hacia el sitio de la lesión (donde se produjo el estímulo inflamatorio) en respuesta a una serie de quimiocinas tales como: MIP1α (Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1α), MCP (Proteína Quimiotáctica para Monocitos), IL-8 y RANTES (quimiocina de la subfamilia CC o β- quimiocina), estas quimiocinas se unen a sus respectivos receptores CCR1 (Receptor de CC quimiocinas tipo 1), CCR2, CCR5 y CCR6; en segundo lugar, dependiendo del estado de maduración de la CD, disminuye la expresión de dichos receptores y aumenta la expresión de CCR7, el mediador principal de la movilización de las CDs hacia los órganos linfoides secundarios, el cual se une a sus ligandos MIP3β y CCL21 (quimiocina de la subfamilia CC o β- quimiocina, también conocida como 6-Ckine).¹⁴ Una vez en el ganglio linfático, la CD es capaz de presentar el antígeno y activar al linfocito T ingenuo.¹⁵

Para cumplir su función de migración, las CDs necesitan la presencia de quimiocinas que estimulen la movilización de esta célula, bien sea hacia el sitio de la agresión antigénica o hacia los órganos linfoides secundarios, una vez que se ha cumplido la internalización del antígeno.¹⁵ Una de las citocinas más destacadas es RANTES (CCL5), la cual ha sido descrita como una de las citocinas más importantes en el proceso de migración de las CDs, además de ejercer una función fundamental durante los procesos de inflamación crónica.¹⁵

Existe un modelo murino claramente definido frente a la infección por *Leishmania*, en el cual dos cepas de ratones presentan respuestas estereotipadas y contrastadas. Estas cepas están representadas por los ratones C57BL/6 y los ratones BALB/c, los cuales presentan respuestas resistentes (Th1) o tolerogénicas, (Th2) respectivamente.¹⁶ Este modelo murino de infección por *Leishmania*, fue establecido por los investigadores en su afán por precisar los fenómenos secuenciales, así como los factores determinantes que promueven el establecimiento de una respuesta Th1 o Th2, por lo que en la actualidad es utilizado frecuentemente para tal fin.^{16,17}

El modelo murino de infección por *Leishmania* permite recrear la respuesta inmunitaria, en sus dos extremos; en otras palabras, es de gran utilidad científica, ya que permite estudiar de manera independiente y aislada, circunstancias diferentes de un mismo fenómeno inmunitario, razón por la cual fue utilizado en nuestro estudio, en particular ante la infección con la especie de *Leishmania (L) mexicana*.

Los ratones BALB/c producen citocinas tipo Th2, en particular IL-4 e IL-10, y son susceptibles a la infección por *Leishmania*, es decir son tolerantes a la infección. En contraste, la recuperación de la infección de la cepa de ratones resistentes, C57BL/6, depende de la inducción de la respuesta tipo Th1, resultando en la activación de los macrófagos y en la destrucción del patógeno intracelular.¹⁶⁻¹⁸

Se han realizado numerosos estudios para determinar el papel de las CDs en la respuesta frente al parásito, principalmente sus propiedades migratorias y el efecto de ciertas citocinas, tales como INF γ (Interferón Gamma) y TNF α , sobre la polarización de la respuesta inmunitaria.^{17,18}

En este orden de ideas, el TNF α , ha sido vinculado ampliamente con el desarrollo de una respuesta inmunitaria de resistencia frente a la leishmaniasis cutánea en el modelo murino, sin embargo, los mecanismos por los cuales esto sucede no han sido del todo dilucidados.¹⁹

El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) es una citocina que forma parte de una gran superfamilia que comprende más de 15 proteínas con diversas funciones. Es producida, principalmente, por macrófagos y, en menor proporción, por linfocitos T, células NK y mastocitos. Se considera una citocina proinflamatoria, que desencadena importantes efectos locales y sistémicos. Entre los primeros, destaca la acumulación de células inflamatorias y la inducción de la síntesis de las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-4 e IL-6 por las células mononucleares, a través de la interacción principalmente con dos tipos de receptores, TNF-RI y TNF-RII.^{19,20}

En la membrana de las CDs maduras, se expresa una proteína perteneciente a la superfamilia de los receptores de TNF denominada TRANCE, la cual sirve tanto para inducir la producción de otras citocinas en estas células, como para estimular a los linfocitos vírgenes que expresan su ligando. Sin embargo, esto no explica por qué las CDs favorecen el desarrollo de una respuesta Th1 en individuos resistentes y una respuesta Th2 en individuos tolerantes, como es el caso de los ratones C57BL/6 y BALB/c, respectivamente, durante la infección por *Leishmania*.^{21,22}

En la década de los años noventa, Poly Matzinger y cols., en sus investigaciones, describen que las células dendríticas responden a señales de peligro (Teoría del Peligro), las mismas son captadas, al menos parcialmente, a través de receptores específicos de superficie, como son PRRs, CD40, CD80/86R, Hsp, etcétera;²¹ al suceder este fenómeno, las células dendríticas son activadas, y son capaces de coestimular a los linfocitos T vírgenes, mediante CPH II unido a un péptido antigénico; la segunda señal, no específica, coestimuladora, proporcionada por las CDs, es mediada por la unión de CD28 a B7 CD80 – CD86.²³

Mónica Pernía en 2007, en sus estudios, realizados en la UNIVENIN, sobre las propiedades migratorias de las CDs *in vitro*, concluye que las CDs de ratones adultos BALB/c sanos migran en presencia de RANTES y TNF. Tal migración es dependiente de las concentraciones de los mediadores y significativamente mayor que la observada en ratones C57BL/6.²⁴ Por otro lado, reportes previos, de trabajos realizados en nuestro laboratorio, sugieren que las propiedades inmunoestimulantes de las CDs neonatales y adultas de ratones BALB/c dependen en gran medida del contacto con el antígeno y del momento mismo de ese contacto. En este sentido, cuando una CDs neonatal se pone en contacto con el antígeno, en ese periodo de la vida, disminuye su capacidad de estimulación de los linfocitos T.²⁵ En CDs de ratones BALB/c adultas el contacto previo con el antígeno no modifica su capacidad inmunoestimulante. Por lo anterior, es interesante estudiar la influencia de la infección, *in vivo* e *in vitro*, sobre la respuesta migratoria y grado de infectividad de *Leishmania* en CDs de ratones

BALB/c adultos con el objeto de comprender los mecanismos de tolerancia implícitos en esta cepa de ratones susceptibles a la infección por *Leishmania*.

En este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudiar el efecto de diferentes concentraciones de RANTES sobre las propiedades migratorias de las CDs de ratones BALB/c sanos e infectados *in vivo* o *in vitro*.
- Estudiar el efecto de diferentes concentraciones de TNF α sobre las propiedades migratorias de las CDs de ratones BALB/c sanos e infectados *in vivo* o *in vitro*.
- Estudiar el efecto de sobrenadante de parásitos *Leishmania (L) mexicana* sobre las propiedades migratorias de las CDs de ratones BALB/c sanos e infectados *in vivo* o *in vitro*.
- Comparar el efecto de RANTES, TNF α y sobrenadante de parásitos *Leishmania (L) mexicana* sobre las propiedades migratorias de CDs de ratones BALB/c sanos e infectados *in vivo* o *in vitro*.

Materiales y métodos

Animales

Los ratones BALB/c adultos (machos y hembras) de 6 a 7 semanas, fueron obtenidos a partir de criaderos libres de patógenos y facilitados por el Bioterio del Instituto de Biomedicina (Caracas, Venezuela). Dichos animales fueron criados en el Bioterio de la Universidad de Carabobo bajo condiciones apropiadas de temperatura, agua y alimentación. Fueron utilizados 24 ratones BALB/c, 12 de los cuales fueron expuestos a la infección *in vivo* con promastigotas *Leishmania (L) mexicana*.

Anticuerpos

Los siguientes anticuerpos monoclonales de rata fueron utilizados para aislar y caracterizar las células dendríticas murinas: CD19 (células de B, clon IBL-2), MOMA-2 (Macrófagos/Monocitos), CD2 (células NK; clon RA3-6B2), CD3 (células de T; clon KT3), CD11c (células dendríticas, clon N418), Serotec Ltd. (Oxford, Reino Unido).

Citocinas

Las siguientes quimiocinas y citocinas fueron utilizadas para realizar en el ensayo de migración *in vitro* de CDs: RANTES recombinante de ratón (Sigma Laboratory, EEUU) y TNF α recombinante de ratón (Pierce Biotechnology, Inc. EEUU).

Cultivo de promastigotas *Leishmania (L) mexicana*

Los promastigotas de *Leishmania (L) mexicana*, se obtuvieron a través del Instituto de Biomedicina de la UCV, las cuales fueron replicadas *in vitro* en la campana, a través de un medio de RPMI suplementado con BFS al 10% (suero fetal bovino), a temperatura ambiente, así mismo el medio de cultivo contenía penicilina G (100 U/ml), y estreptomycin (100 μ g/ml). Una vez que los parásitos alcanzan su fase estacionaria de 6 a 8 días de cultivo, se procede a centrifugar a 2500 X g, 10 min, 4 °C, para luego

ser lavados 3 veces, con RPMIs, antes de ser inoculados a los ratones.²⁵

Infección de los ratones con prosmastigotas de *Leishmania (L) mexicana*

Ambas cepas de ratones, tanto machos como hembras, entre 6 y 7 semanas de nacidos, se infectaron subcutáneamente en la almohadilla plantar izquierda, mediante una dosis de 1×10^6 parásitos en fase estacionaria, en un volumen total de 2 μ l de un medio de RPMI. Al transcurso de una semana, fueron sacrificados a través de dislocación cervical, para posteriormente extraer sus bazos, y de este tejido aislar las células dendríticas.²⁵

Aislamiento y purificación de células dendríticas

Las células dendríticas (CDs) de los ratones adultos BALB/c y C57BL/6 fueron aisladas del bazo. Bajo condiciones estériles, los bazos fueron picados y desgarrados en una rejilla metálica con RPMI-1640 (Tecnologías de la Vida, Rockville, EEUU) suplido con el 10% de suero fetal de albúmina bovino descomplementado (SFB), L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1 mM, 2-mercaptoethanol 50 μ M y penicilina de 100 U/ml (RPMI-10 completo). La suspensión celular obtenida fue filtrada en un tamiz de nylon, transferida a tubos estériles de 15 ml (Corning, Acton, EEUU) y centrifugada a 250 g, 4°C por 10 minutos. Las células viables fueron contadas por exclusión del azul trypan. La concentración de las células fue ajustada a 1×10^7 células/ml en RPMI-10 completo, y 8 ml de esa concentración celular fueron colocados en matraces de cultivo. Los matraces de cultivo fueron incubados durante 2 horas a 37°C en una incubadora CO₂ al 5% (NAPCO, EEUU), permitiendo la adherencia de CDs. Las células no adherentes fueron retiradas, colocadas en tubos estériles de 50 ml y centrifugadas a 250 g, 4°C por 10 minutos. Las células adherentes fueron cubiertas con 10 ml RPMI-10 completo e incubadas por 16-18 horas en las mismas condiciones anteriormente descritas, para permitir la separación de las CDs del matraz de cultivo. Después de lavar la superficie de los matraces, con RPMI-10 completo, los volúmenes de la suspensión celular obtenidos del lavado fueron colocados en tubos estériles de 15 ml y centrifugados a 250 g, 4°C por 10 minutos. En cada tubo, el precipitado celular fue resuspendido de nuevo en 6 ml RPMI-10 completo. Este volumen fue colocado cuidadosamente sobre 3 ml de una solución, NycoPrep (Nycomed Pharma Como, Torshov, Noruega) y centrifugado a 600 g, 20°C por 20 minutos, para separar las células por gradiente de densidad. Las células mononucleares fueron obtenidas del anillo de interfaz usando una pipeta Pasteur, transferidas a un tubo estéril de 15 ml y centrifugadas en 10 ml RPMI-10 completo a 400 g, 20°C por 15 minutos tres veces. El precipitado celular final, fue resuspendido de nuevo en 1 ml de solución de sal balanceada (Hank's) fría (4°C), suplementado al 10% con SFB descomplementado y HEPES 2 mM. Las células fueron cuantificadas y la viabilidad fue determinada por exclusión de azul trypan. La etapa final de la purificación consistió en una selección negativa inmunomagnética de las CDs. La suspensión de células obtenida anteriormente fue incubada con anticuerpos primarios monoclonales rata anti-ratón que reconocen respectivamente linfocitos B, T,

células NK y monocitos/macrófagos (1.5 μ g/ml de anticuerpo por 1×10^6 células), bajo agitación continua a 4°C por 1 hora. Después de la incubación, las células fueron lavadas tres veces con Hank's frío a 250 g, 4°C por 10 minutos. El precipitado celular fue resuspendido en 1 ml de Hank's frío en un tubo estéril de 15 ml e incubado con un anticuerpo secundario policlonal IgG de oveja anti-rata conjugados a microesferas magnéticas (Dynabeads® M-450, Dynal Biotech Inc., EEUU) en una relación esfera/célula 7:1, bajo agitación continua a 4°C por 1 hora. Las células no dendríticas unidas a las microesferas magnéticas fueron retiradas por selección positiva en tres depleciones secuenciales usando un objeto magnético (Dynal MPC® Dynal Biotech Inc., EEUU) a 4°C por 6 minutos.²⁵

Ensayo de infectividad de células dendríticas

Se realizaron dos tipos de ensayo de infectividad: el primero por microscopía de fluorescencia y el segundo por citometría de flujo, utilizando CFSE como marcador fluorescente.²⁶

1. Microscopía de fluorescencia

- Preparación y marcaje de los parásitos.** Los parásitos *Leishmania (L) mexicana* creciendo en medio de cultivo Schneider son colectados en fase estacionaria. Se procede a lavar con PBS, o medio de cultivo libre de proteínas, 1×1500 G (300 r/v/m, por 10 minutos a 4°C). Se resuspenden los parásitos, y se ajusta la concentración 1×10^8 /ml. Son incubados 0.5 ml de la suspensión de parásitos (5×10^7 parásitos) con un volumen igual de 5 mg/ml de CFSE. La incubación se realiza a 37°C, y en la oscuridad por 10 minutos. La reacción se detiene agregando cRPMI (RPMI más 10% de SFB). Los parásitos deben lavarse al menos 3 veces con PBS-A (PBS sin calcio). Los parásitos marcados se resuspenden a 5×10^7 parásitos/ml.²⁷
- Preparación de células dendríticas.** Las células en cultivo se cosechan utilizando un rastrillo, para despegarlas de la superficie plástica. Se lavan dos veces con RPMI a 256G (1200 rpm/ 10 minutos/ 4°C). El tercer lavado se hace con RPMI sin proteínas. Se resuspenden y se ajustan a 5×10^4 cel/ml. Se procede a la infección, en placa de 24 pozos, colocando una relación parásitos/células de 10:1, en medio sin proteínas. Se incuban a temperatura ambiente por una hora. Se lavan las placas, dos veces con medio con proteínas cRPMI-10. Se añade un ml, de cRPMI-10 y se coloca a 37°C, 5% de CO₂.²⁷

2. Citometría de flujo. Las células dendríticas, sanas e infectadas *in vivo*, una vez incubadas con el parásito fluorescente durante 12 horas, se centrifugan tres veces a 1200 rpm, 10 minutos, a 4°C y se resuspenden en 0.5 ml de RPMIs para pasarlas por el citómetro de flujo.²⁸

Ensayo de quimiotaxis (migración)

La migración celular fue estudiada utilizando una cámara de quimiotaxis (microcámara de Boyden de 48 pozos; Neuroprobe, EEUU).²⁴ Fue empleada, para cada una de las

condiciones experimentales, la cantidad de 4×10^5 células, las cuales fueron dispuestas en los pozos del plato superior de la cámara. Se emplearon las siguientes condiciones experimentales: RPMI (migración basal), RANTES (100 y 10 ng/ml), TNF α (10 y 1 ng/ml) y sobrenadante (SP) de parásitos de *Leishmania (L) mexicana*. Cada uno de estos componentes, en sus diferentes concentraciones, fue colocado en los pozos del plato inferior de la cámara de Boyden. Entre los platos superior e inferior de la cámara de Boyden, fue situado un filtro o membrana estándar de policarbonato, con poros de 5 μ m de diámetro (Neuroprobe) y se procedió a realizar la incubación durante 3 horas, a 37 °C y CO₂ al 5 %. Al término de ésta, las células que migraron a través del filtro, quedando ubicadas en la cara inferior del mismo, fueron teñidas con violeta de genciana y contadas a 40X mediante la selección de campos al azar, utilizando un microscopio óptico (Leica CME, EEUU). Cada ensayo de quimiotaxis fue realizado dos veces consecutivas, y a su vez, cada condición experimental fue hecha por duplicado. Los resultados fueron expresados como la media \pm DE de las células que migraron por 10 campos.²⁴

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar. Cada grupo experimental estuvo compuesto por 1.2×10^6 células. Los datos fueron sometidos al Test de Distribución normal de Kolmogorov-Smirnov; y las comparaciones entre las medias de las condiciones experimentales fueron hechas con la prueba t de student. Cualquier valor de $p \leq 0.05$ fue considerado significativo. También fue expresado el índice de migración de cada condición experimental con respecto al control negativo de migración RPMI 1%, el cual se obtuvo dividiendo el número de células de cada condición entre el número de células del control. Todas las pruebas fueron realizadas usando GraphPad InStat 3.02 (software de GraphPad, San Diego, CA, EEUU).²⁴

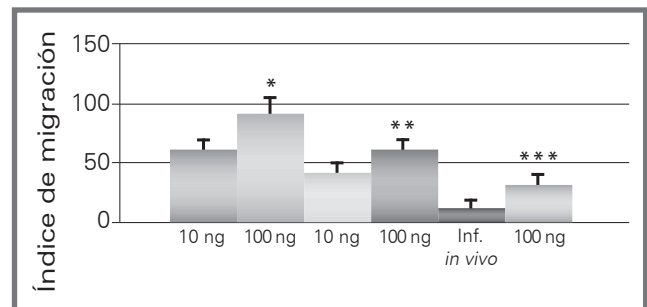
Resultados

En la gráfica 1, se muestra el efecto de RANTES sobre la migración de células dendríticas de ratones BALB/c sanos e infectados *in vivo*, e *in vitro* con *Leishmania (L) mexicana*. Se observa en todos los casos que las CDs migran en presencia de RANTES. Siendo mayor la migración a una concentración de la quimiocina a 100 ng. Al comparar los índices de migración de los tres grupos experimentales con la quimiocina a máxima concentración, se observa que éste es significativamente mayor en las células sanas, que en las células infectadas *in vivo* e *in vitro*, así mismo se evidencia que la migración de células infectadas *in vivo* es significativamente mayor a la migración de las células infectadas *in vitro*.

En la gráfica 2, se observa el efecto de TNF sobre la migración de las células dendríticas de los grupos experimentales mencionados anteriormente, en dicho fenómeno se puede apreciar que las CDs migraron ante el estímulo de la mencionada citocina, siendo mayor el índice de migración de las células dendríticas cuando la dosis de TNF fue

de 100 ng. Las CDs exhibieron mayor migración en el grupo de ratones sanos, al comparar con las CDs de ratones que fueron sensibilizados *in vivo* e *in vitro* con *Leishmania (L) mexicana*, siendo este último grupo el que presentó menor migración.

Gráfica 1
Efecto de RANTES sobre la migración de ratones adultos BALB/c sanos, infectados *in vivo* e *in vitro* con *Leishmania (L) mexicana*.

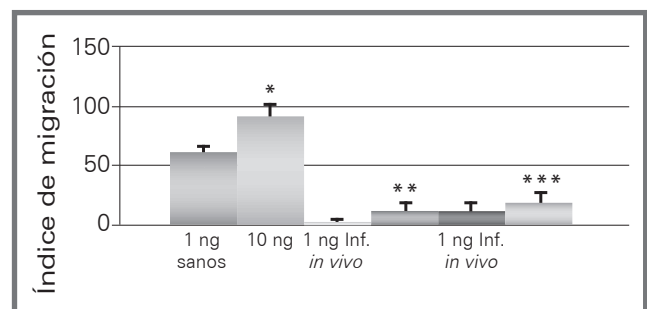


*Sanos (RANTES 100 ng) vs. infección *in vivo* (RANTES 100 ng) $P < 0.01$.

** Infección *in vivo* (RANTES 100 ng) vs. infección *in vitro* (RANTES 100 ng) $P < 0.01$.

*** Infección *in vitro* (RANTES 100 ng) vs. sanos (RANTES) < 0.01 .

Gráfica 2
Efecto de TNF sobre la migración de CDs de ratones adultos BALB/c sanos, infectados *in vivo* e *in vitro* con *Leishmania (L) mexicana*.



*Sanos (TNF 10 ng) vs. infección *in vivo* (TNF 10 ng) $P < 0.01$.

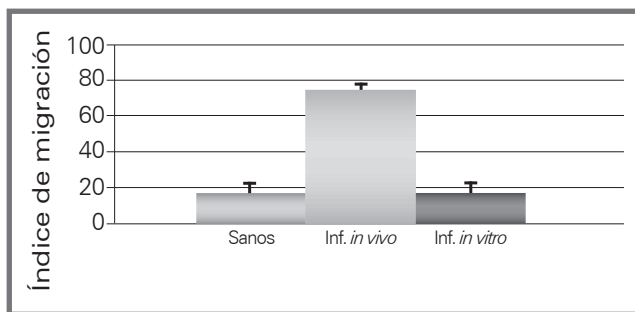
** Infección *in vivo* (TNF 10 ng) vs. infección *in vitro* (TNF 10 ng) $P < 0.01$.

*** Infección *in vitro* (TNF 10 ng) vs. sanos (TNF 10 ng) $P < 0.01$.

En la gráfica 3, se representa el efecto del sobrenadante de parásito diluido, sobre la migración de las CDs, de ratones adultos BALB/c sanos, e infectados *in vivo* e *in vitro* con *Leishmania (L) mexicana*, en los mismos se puede destacar que las CDs se vieron estimuladas y migraron en presencia de la mencionada sustancia, siendo significativamente mayor la migración en el grupo de CDs provenientes de ratones infectados *in vivo*, con respecto a las CDs aisladas de ratones sanos e infectados *in vitro*, evidenciándose asimismo

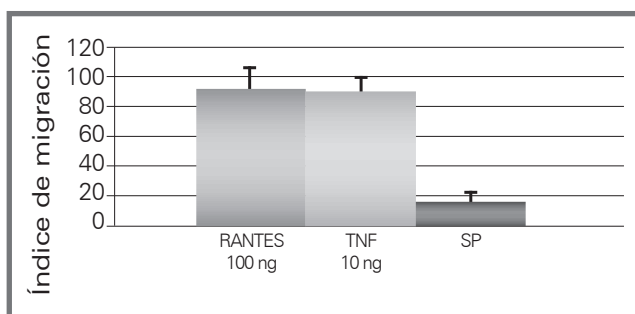
que los índices de migración de estos dos últimos grupos fueron similares entre sí.

Gráfica 3
Efecto de Sobrenadante de parásito sobre la migración de CDs de ratones adultos BALB/c sanos, infectados *in vivo* e *in vitro* con *Leishmania (L) mexicana*.



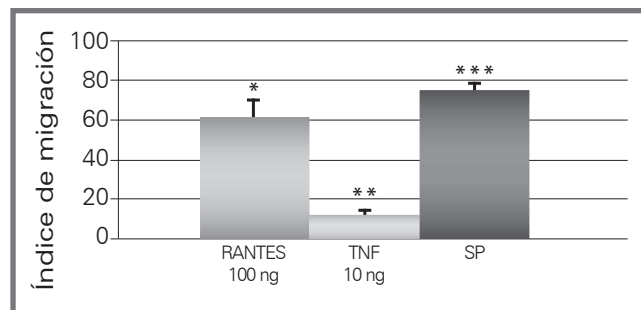
En la gráfica 4, son comparados los efectos de RANTES, TNF, y el sobrenadante de parásitos, sobre la migración de CDs de ratones adultos BALB/c sanos, contemplándose en primer lugar que las tres sustancias producen quimiotaxis sobre las CDs. RANTES y TNF tienen estímulos similares y superiores, sobre la propiedad migratoria de las CDs de dicho grupo, en contraste, la quimiotaxis inducida por el sobrenadante de parásitos fue significativamente menor con respecto a RANTES y TNF.

Gráfica 4
Efecto de RANTES, TNF, Sobrenadante de parásito sobre la migración de CDs de ratones adultos BALB/c sanos.



En la gráfica 5, son comparados los efectos de RANTES, TNF, y el sobrenadante de parásitos, sobre la propiedad migratoria de las CDs de ratones adultos BALB/c infectados con *Leishmania (L) mexicana*, observándose primeramente que todos las sustancias produjeron migración sobre las CDs, sin embargo, este efecto fue significativamente mayor para el sobrenadante de parásito, con respecto a las dos citocinas. RANTES también exhibió una gran capacidad para inducir la migración de las CDs, sin embargo el índice de migración de las CDs ante TNF, fue bastante exiguo.

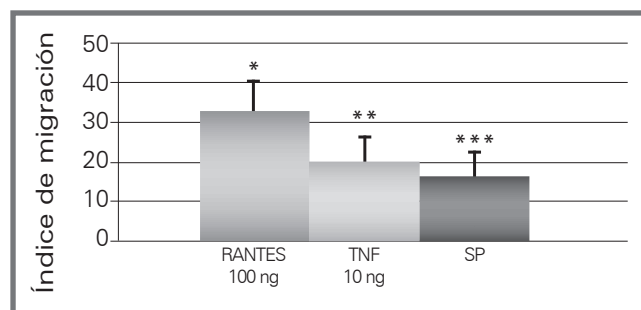
Gráfica 5
Efecto de RANTES, TNF, Sobrenadante de parásito sobre la migración de CDs de ratones infectados *in vivo* e *in vitro* con *Leishmania (L) mexicana*.



* RANTES (100 ng) vs. TNF (10 ng) $P < 0.01$
 ** TNF (10 ng) vs. sobrenadante de parásitos $P < 0.01$
 *** Sobrenadante de parásitos vs. RANTES (100 ng) $P < 0.01$

En la gráfica 6, son comparados el efecto de RANTES, TNF y el sobrenadante de parásitos sobre la migración en ratones adultos BALB/c, que fueron previamente sensibilizados *in vitro* con *Leishmania (L) mexicana*, en el mismo se puede apreciar que las CDs migraron frente a dichos estímulos, siendo significativamente mayor la quimiotaxis ante RANTES y luego TNF, mientras que con el sobrenadante de parásitos el índice de migración fue menor que los anteriores.

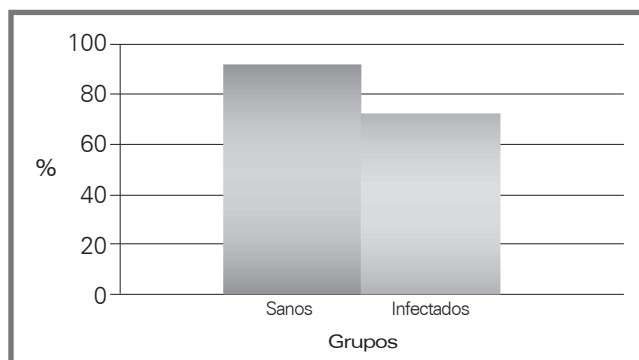
Gráfica 6
Efecto de RANTES, TNF, Sobrenadante de parásito sobre la migración de CDs de ratones adultos BALB/c infectados *in vitro* con *Leishmania (L) mexicana*.



* RANTES (100 ng) vs. TNF (10 ng) $P < 0.01$
 ** TNF (10 ng) vs. sobrenadante de parásitos $P < 0.01$
 *** Sobrenadante de parásitos vs. RANTES (100 ng) $P < 0.01$

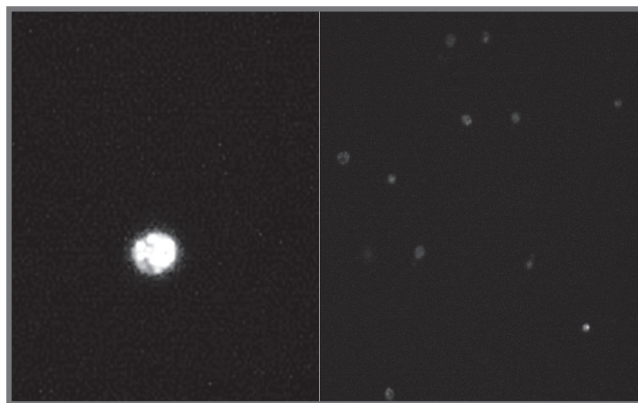
En la gráfica 7, se compara la infectividad intracelular de células dendríticas aisladas de ratones BALB/c sanos e infectados *in vivo* con *Leishmania (L) mexicana*, los cuales fueron incubados durante 12 horas con parásitos previamente marcados con fluorocromo; en el mismo se puede observar, que las CDs de ratones sanos presentaron una infectividad de más 92%, mientras que las CDs de ratones infectados, presentaron un 72% de infectividad intracelular.

Gráfica 7
Grado de infectividad entre ratones adultos BALB/c sanos e infectados.



En la fotografía 1 se vislumbra la infectividad de acuerdo con la fluorescencia de las CDs en ratones BALB/c sanos e infectados *in vivo* con *Leishmania (L) mexicana*.

Fotografía 1
CDs de ratones BALB/c sanos, incubadas con promastigotas de *Leishmania (L) mexicana* marcados con fluorocromo.



Discusión

Las células dendríticas (CDs) tienen un papel importante en el inicio de la respuesta inmunitaria (RI) adaptativa o específica. Existen dos modelos múridos muy representativos de estos dos tipos de respuesta, en este caso frente a la infección por *Leishmania*: los ratones C57BL/6 que resisten a la infección y los ratones BALB/c que toleran la infección.^{16,17} Reportes previos sugieren que estos dos tipos de RI dependen en mucho del tipo de la CDs implicada. Así, se ha demostrado, por ejemplo, que las CDs de ratones BALB/c, tanto neonatales como adultas, son capaces de estimular a los linfocitos T. Sin embargo dicha capacidad disminuye dependiendo del contacto con el antígeno y del momento cuando este se produce. Por lo que resultaría

interesante investigar, en este tipo de células, algunas de sus propiedades biológicas, en presencia del antígeno. En consecuencia, nos hemos planteado, en este trabajo, estudiar la influencia que ejerce el sobrenadante del parásito *Leishmania (L) mexicana*, una quimiocina como RANTES y una citocina como TNF α , sobre las propiedades migratorias de estas células así como el grado de infectividad de *Leishmania* sobre las CDs en diferentes circunstancias *in vitro*.

Nuestros resultados muestran que tanto el sobrenadante del parásito (SP) como RANTES y TNF estimulan la migración de las células dendríticas, efecto que varía dependiendo del contacto previo, *in vivo* o *in vitro*, con el parásito. Así, en presencia de RANTES y TNF se observa un índice migratorio (IM) significativamente mayor que el observado con SP, cuando la célula no ha tenido contacto previo con el antígeno o cuando ese contacto ocurre *in vitro*, mientras que en presencia de SP, ese índice migratorio fue significativamente mayor al observado con RANTES y TNF, cuando hubo contacto *in vivo* con el parásito, destacando, en este caso, el bajo IM observado con TNF (5 a 6 veces menor que con RANTES y SP) lo que sugiere que las condiciones microambientales en las que se realizan las interacciones entre células y mediadores sería determinante en el comportamiento migratorio de este tipo de células, así, por ejemplo, en presencia de RANTES (1.4 veces menos que el observado con células sanas) y TNF (7 veces menos que el observado con células sanas) hay una reducción drástica del índice migratorio, mientras que en presencia de SP (3.9 veces más elevado que el observado con células sanas), se incrementa significativamente. Se sabe que estas dos citocinas son muy importantes en el establecimiento de una RI de resistencia frente al parásito;¹⁹ así, es posible que, *in vivo*, la acción combinada de éstos, y posiblemente otros mediadores, favorezca un ambiente tolerógeno, en presencia del parásito, al disminuir la capacidad migratoria de las CDs hacia los ganglios linfáticos, sitio donde tiene lugar el inicio de la RI adaptativa contra el microorganismo. En consecuencia, e independientemente del efecto del parásito sobre la capacidad inmunoestimulante de la célula dendrítica, es posible que la susceptibilidad de esta cepa de ratones a la infección con *Leishmania* se deba a la alteración de más de una de las propiedades fundamentales de las mismas, en este caso la capacidad de migrar hacia los ganglios linfáticos. Esto estaría en concordancia con la disminución de la capacidad inmunoestimulante de estas células luego del contacto con el parásito, como ha sido reportado en estudios previos.

En cuanto a la infectividad de las CDs de esta cepa de ratones, observamos que las células sanas presentan una infectividad mayor (92.1%) que las células que tuvieron contacto *in vivo* con el parásito. Esto demuestra una mayor capacidad de captación del antígeno (Ag), propiedad fundamental de estas células para poder estimular a los linfocitos T. Estos resultados sugieren que, además de las propiedades inmunoestimulantes y migratorias, la propiedad de captación de las CDs en esta cepa de ratones disminuye con el contacto previo con el parásito, lo que redundaría en una disminución de la RI frente al mismo, y en el establecimiento de un estado de tolerancia inmunitaria.

Conclusiones

La células dendríticas CDs provenientes de ratones BALB/c sanos poseen un comportamiento migratorio frente a RANTES y TNF mucho más eficiente en relación a las CDs infectadas *in vivo* e *in vitro* con *Leishmania (L) mexicana*. A su vez el índice migratorio de las CDs infectadas *in vivo* con el parásito es significativamente mayor en este grupo, en relación a las CDs sanas y a las CDs infectadas *in vitro* con el parásito.

Esto nos sugiere que la condición microambiental donde se encuentran las CDs, aunado al tipo del estímulo, la intensidad del mismo y el contacto previo con el antígeno, es determinante en la realización de las propiedades mencionadas.

En cuanto a la infectividad de las CDs de ratones BALB/c sanos e infectados *in vivo* con *Leishmania (L) mexicana*, encontramos que el grado de infectividad fue significativamente mayor en las CDs sanas en comparación con las CDs infectadas *in vivo* con el parásito, esto quiere decir

que el contacto previo con el antígeno disminuye la propiedad de captación, dado lugar a una disminución de la respuesta inmunitaria frente al mismo y al establecimiento de un estado de tolerancia inmunitaria.

Recomendaciones

Es de gran valor científico continuar el estudio de las capacidades migratorias de la célula dendrítica, así como también, de cada una de sus otras propiedades biológicas, las cuales le otorgan a esta célula la función principal de presentación de antígenos del organismo, además de su capacidad en polarizar la respuesta inmunitaria.

En este sentido, es necesario estudiar con mayor énfasis, las propiedades migratorias en individuos neonatales tolerantes y resistentes ante la infección con *Leishmania (L) mexicana*, pensando que el desarrollo de respuestas inmunitarias distintas ante la presencia de un mismo agente, dependen del periodo de la vida en que sean expuestas.

Referencias

- Guemonez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells". *Annu Rev Immunol* 2002;20: 621-27.
- Steinman RM, Cohn ZA. "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution". *J Exp Med* 1973; 137: 1142-62.
- Vremec D, Shortman K. "Dendritic cells subtypes in mouse lymphoid organs. Cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen and lymph node". *J Immunol* 1997; 159: 565-73.
- Vremec D, Zorbas M, Scollay R, Saunders AJ, Ardavin CF, Wu L, Shortman K. "The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells". *J Exp Med* 1992; 176: 47-58.
- Naba K, Inaba N, Romani H, Aya H, Deguchi S, Ikehara S, Muramatsu, Steinman RM. "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplement with granulocyte/macrophage colony stimulating factor". *J Exp Med* 1992; 176: 1693-1702.
- Ardavin C. "Origin and differentiation of dendritic cells". *Trends Immunol* 2001; 22: 691-700.
- Pulendran B, Maraskovsky E, Banchereau J, Maliszewski C. "Modulating the Immune response with dendritic cells and their growth factors". *Trends Immunol* 2001;22:41-47.
- Geitjensbeek T, Van Vliet S, Engering A, Hart B, Van Kooyk Y. "Self and non self recognition by C-type lectins on dendritic cells". *Ann Rev Immunol* 2004; 22: 33-54.
- Mommas A, Mulder A, Jordens C, Out M, Tan P, Creswell P, Kluin F. "Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules". *Eur J Immunol* 1999; 29: 571-80.
- Engering A, Cella M, Fluitsma D, Brockhaus M, Hoefsmit E, Lanzavechia A, Pieters J. "The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells". *Eur J Immunol* 1997; 27: 2417-25.
- Fanger N, Wardwell K, Shen L, Tedder T, Guyre P. "Type I (CD64) and type II (CD32) Fcγ receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells". *J Immunol* 1996; 157: 541-48.
- Albert M, Pearce S, Silverstein L, Bhardwaj N. "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via αβv5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T Lymphocytes". *J Exp Med* 1998; 188: 1359-68.
- Rubartelli A, Poggi A, Zocchi M. "The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the αβv3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium". *Eur J Immunol* 1997; 27: 1893-90.
- Dieu M, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon J, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C. "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites". *J Exp Med* 1998; 188: 373-86.
- Chan V, Kothakota S, Rohan M, Panganiban-Lustan L, Gardner J, Wacowiicz M, Winter J, and Williams L. "Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells". *Blood* 1999; 93: 3610-16.
- Alexander J, Satoskar A, Russeft D. "*Leishmania* species: models of intracellular parasitism". *J Cell Sci* 1999; 112: 2993-3002.
- Sacks D, Noben-Trauth N. "The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice". *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 845-58.
- Reiner S, Lcksley R. "The regulation of immunity to *Leishmania major*". *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 151-77.
- Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, de Bouteiller O, Dieu-Nosjean M, Homey B, Massacrier C, Vanbervliet B, Zlot-

- nik A, Vicari A. "Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines". *Springer Semin Immunopathol* 2000; 22(4): 345-69.
20. Parslow T, Stites D, Terr A, Imboden J. *Inmunología básica y clínica*. 10ª ed. Editorial El Manual Moderno, México, 2002: 171-74.
21. Corado JA, Mora S. *Inmunología Actual*. 1ª ed. Universidad de Carabobo, Valencia 2002: 141-61.
22. Bridi M, Vouldoukis I, Mossalayi MD, Debre P, Guilloison JJ, Mazier D, Arock M. "Evidence for direct interaction between mast cells and *Leishmania* parasites". *Parasite Immunol* 1997; 19: 475-83.
23. Matzinger P. and Guerder S. "Does T-Cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell?" *Nature* 1989.338:74-76.
24. Mónica Pernía, "Propiedades Migratorias de las Células Dendríticas en Modelos Múridos de Tolerancia y Resistencia Inmunitaria". *Univenim* 2008; 25:2.
25. Ponce L, Corado J, Díaz N, Tapia F. "La Transferencia adoptiva de células dendríticas modula la inmunogénesis y tolerogénesis en un modelo múrido neonatal del leishmaniasis cutánea". *Kinetop Biol*, 2005; 4: 2.
26. Muraille E, De Trez C, Pajak B, Torrentera FA, De Baetselier P, Leo O, Carlier Y. "Amastigote load and cell surface phenotype of infected cells from lesions and lymph nodes of susceptible and resistant mice infected with *Leishmania major*". *Infect Immun* 2003;71:2704-15.
27. Sánchez M. *Ensayos de proliferación frente antígenos solubles de Leishmania utilizando metodología no radioactiva por citometría de flujo*. Protocolos, Laboratorio de Microbiología Celular UCV, 2007; 1-8.
28. Lyons, AB, "Analyzing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilutions". *Inmunol* 2000; 147-54.