



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA
CIBICI-CONICET

Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias
Químicas

**Estudio de células mieloides supresoras
inducidas por CpG-ODN en el
envejecimiento**

Bioq. María Florencia Harman

Director de tesis: Dra. María Cristina Pistoresi

Córdoba, Argentina

2015

Director de tesis:

Dra. María Cristina Pistoresi

Comisión de Tesis:

Dr. Fabio Cerbán

Dra. Alicia Degano

Dra. Teresa Scimonelli

Evaluador externo:

Dr. Guillermo Horacio Docena

El presente trabajo de tesis fue desarrollado en el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET). Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación (Foncyt), Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC), Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba y por el financiamiento a través de las becas de doctorado tipo I y II otorgadas por CONICET.

AGRADECIMIENTOS

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	xi
Palabras Claves	xiii
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	xiv
LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	xxi
INTRODUCCIÓN	1
1. El sistema inmune en el envejecimiento	2
Células madre hematopoyéticas en el envejecimiento	3
Inmunidad adaptativa en el envejecimiento	6
Inmunidad innata en el envejecimiento.....	9
2. Células mieloides supresoras (MDSC).....	11
Marcadores fenotípicos de las MDSC	13
Mecanismos supresores de las MDSC	15
Inducción de células T regulatorias.....	16
Depleción de aminoácidos esenciales para la célula T.....	16
Generación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno.....	16
Bloqueo de tráfico y viabilidad de linfocitos	17
Mecanismos de expansión y activación de las MDSC.....	19
Las MDSC en el envejecimiento	22
3. Metabolismo de L-arginina.....	23
Expresión y regulación de arginasa en células mieloides	25
L-arginina y respuesta inmune de los linfocitos T	27
4. Modulación de la respuesta inmune por CpG-ODN.....	29

CpG-ODN.....	30
CpG-ODN en la inmunidad innata y adaptativa.....	32
Propiedades contraregulatorias de CpG-ODN	34
Antecedentes de nuestro grupo	35
OBJETIVOS: General y específicos.....	38
RESULTADOS	39
CAPÍTULO I: <i>Caracterización de células mieloides en ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA</i>	40
Modelo de envejecimiento	41
Estudio de células mieloides CD11b ⁺ Gr1 ⁺ en órganos y tejidos de ratones viejos normales	42
Evaluación de apoptosis espontánea de células mieloides de ratones viejos.....	44
Estudio del número de células mieloides en ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA	46
Análisis del fenotipo de las células mieloides de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA	49
Análisis de las subpoblaciones de células mieloides expandidas por CpG-ODN+IFA en ratones viejos.....	50
Conclusiones Capítulo I	54
CAPÍTULO II: <i>Estudio de la función supresora de las células mieloides de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA</i>	55
Evaluación de la actividad supresora de las células mieloides de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA.....	56
Evaluación del metabolismo de L-arginina	59
Evaluación de la actividad y expresión de arginasa en las células mieloides de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA.....	63

Estudio del mecanismo de inducción de arginasa en MDSC de ratones jóvenes y viejos tratados con CpG-ODN+IFA.....	68
Evaluación de la vía STAT6-IL-4.....	68
Evaluación de la vía STAT3-IL-6.....	72
Evaluación de la participación de IL-4 e IL-6 del microambiente en la inducción de arginasa.....	75
Conclusiones Capítulo II.....	83

CAPÍTULO III: Estudio en ratones viejos de la duración de las células mieloides expandidas por tratamiento con CpG-ODN+IFA	85
Evaluación de arginasa en las células mieloides de ratones viejos a distintos días luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA.....	88
Estudio de la función supresora de las células mieloides de ratones viejos 40 días después del tratamiento con CpG-ODN+IFA	93
Análisis de la expansión de MDSC en ratones viejos 80 días después del tratamiento con CpG-ODN+IFA.....	94
Conclusiones del capítulo III	97

CAPÍTULO IV: Activación de MDSC in vitro con CpG-ODN y CpG-ODN+IFN-γ	98
Evaluación del metabolismo de L-arginina en MDSC diferenciadas <i>in vitro</i> y estimuladas con CpG-ODN o CpG-ODN+IFN-γ	103
Evaluación de la función supresora de las MDSC diferenciadas <i>in vitro</i> y estimuladas con CpG-ODN+IFN-γ	107
Conclusión capítulo IV.....	110

DISCUSIÓN.....	111
-----------------------	------------

CONCLUSIÓN GENERAL	121
---------------------------------	------------

MATERIALES Y MÉTODOS	122
Ratones	123
Oligodeoxinucleótidos sintéticos.....	123
Medios de cultivo	124
Tratamiento de ratones.....	124
Métodos de ensayo.....	125
Obtención de suspensiones celulares	125
1. MDSC derivadas de médula ósea.....	125
2. Células de bazo	126
3. Células de sangre periférica	126
4. Células de médula ósea	127
5. Purificación de células mieloides y linfocitos T de bazo	127
Cultivo celular	129
1. MDSC diferenciadas de médula ósea	129
2. Bazo	129
3. Co-cultivo de linfocitos T y células mieloides.....	130
Proliferación celular	132
1. Incorporación de timidina tritiada.....	132
2. Método de dilución de CFSE.....	132
Citometría de flujo	133
1. Determinación de Acs de superficie.....	133
2. Ensayo de apoptosis.....	133
3. Determinación intracelular de arginasa I	134
4. Determinación intracelular de la expresión de pSTAT3 y pSTAT6	134
Determinación de citoquinas mediante un ELISA sándwich	137
Determinación de la actividad de arginasa.....	138

Determinación de la producción de ON	139
Determinación de proteínas	140
Análisis estadístico.....	140
Soluciones.....	141
1. Soluciones Buffer	141
Solución buffer salino de fosfatos (PBS).....	141
Solución salina balanceada de Hank's (HBSS)	141
2. Soluciones usadas para contar células	141
3. Medios de cultivo	142
4. Soluciones madre utilizadas para citometría de flujo	142
5. Soluciones utilizadas para medir citoquinas por ELISA.....	142
6. Soluciones utilizadas para medir la actividad de arginasa.....	143
7. Soluciones utilizadas para la determinación de ON.....	144
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS.....	157

RESUMEN

Durante el envejecimiento se produce una desregulación de la respuesta inmune que se traduce en una mayor susceptibilidad a contraer infecciones, cáncer y enfermedades inflamatorias; observándose también una respuesta menos eficaz a la vacunación. Frente a estados inflamatorios perjudiciales causados por una estimulación excesiva del sistema inmune como en infecciones, cáncer, u otros, la médula ósea libera células mieloides inmaduras a la sangre. En nuestro trabajo de tesis observamos que ratones viejos normales presentan elevados números de células mieloides con fenotipo CD11b⁺Gr1⁺, las cuales presentan un mayor tiempo de vida media que las mismas células de ratones jóvenes.

Cuando los ratones viejos son tratados con oligodeoxinucleótidos sintéticos que contienen motivos CpG no metilados en un contexto particular de bases (CpG-ODN) emulsionados en adyuvante incompleto de Freund (IFA), CpG-ODN+IFA, se induce una expansión de células mieloides CD11b⁺Gr1⁺ en el bazo. El análisis de estas células demostró que poseen un fenotipo similar al de células mieloides supresoras. El estudio funcional nos permitió demostrar que las células mieloides purificadas de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA eran capaces de suprimir la proliferación de linfocitos T de ratones normales de forma similar a las células mieloides provenientes de ratones jóvenes con igual tratamiento. El principal mecanismo involucrado en su función supresora es la inducción de arginasa, una enzima que depleta el aminoácido L-arginina del medio extracelular provocando el bloqueo de la proliferación de las células T.

Adicionalmente, se evaluó la participación de IL-4 e IL-6 del microambiente de la célula T y de la célula mieloides supresora en la inducción de arginasa, tanto en ratones jóvenes como en viejos. Observamos que de acuerdo a la edad del ratón del que provienen las células mieloides, el requerimiento de las citoquinas mencionadas es diferente. Las células mieloides de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA requieren de la presencia de IL-4 e IL-6 juntas para la inducción de arginasa. En el caso de las células mieloides de ratones jóvenes tratados con CpG-ODN+IFA, la sola presencia de IL-4 o IL-6, individualmente, es suficiente para la inducción de arginasa, aunque cuando ambas citoquinas se encuentran presentes se potencia la inducción de esta enzima.

La expansión de la población de células con función supresora en ratones viejos se mantiene durante más tiempo (al menos hasta 40 días) luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA. En cambio, en los jóvenes estas células hacen un pico al día 10 post tratamiento y luego disminuyen junto con su función supresora.

Nuestros resultados demuestran que un estímulo inflamatorio como CpG-ODN+IFA es capaz de generar la expansión de células mieloides supresoras en ratones viejos, tal vez como una forma de modular la respuesta inmune frente a este estímulo. Los resultados también demuestran que las células mieloides supresoras de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA, si bien tienen características similares a las de jóvenes, se mantienen aumentadas durante más tiempo y responden de forma diferente a las citoquinas del microambiente para la inducción de arginasa.

Palabras claves:

- a) Envejecimiento
- b) Células mieloides supresoras
- c) Arginasa
- d) Inmunomodulación
- e) CpG-ODN

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

7-AAD: 7-amino-actinomicina D

Ac: Anticuerpo

ADAM: Desintegrina y metaloproteinasas A

ADN: Acido desoxirribonucleico

Ag: Antígeno

AKT: PKB (*del inglés proteín kinase B*)

ARG: Arginasa

ARN: Acido ribonucleico

ASC: Transportador de aminoácidos tipo asc

CAT: Transportadores de aminoácidos catiónicos (*del inglés Cationic amino acid transport*)

C.D: Célula dendrítica

CD: Cluster de diferenciación (*del inglés Cluster differentiation*)

C/EBP: *Del inglés "CCAAT/enhancer-binding protein*

Cél.: Célula

CFSE: Carboxifluoresceína succinimidil éster

Con A: Concanavalina A

COX: Ciclooxygenasa

CPA: Célula presentadora de antígeno

CpG-ODN: Oligodeoxinucleótido sintético que contiene motivos CpG no metilados

C.p.m: Cuentas por minuto

CREB: *Del inglés cyclic AMP-responsive element-binding protein*

CSF: Factor estimulante de colonia (*del inglés colony stimulating factor*)

CTL: Linfocito T citotóxico (*del inglés cytotoxic T lymphocyte*)

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético (*del inglés ethylenediaminetetraacetic acid*)

ELISA: Enzimoinmunoensayo en fase sólida (*del inglés enzyme linked immunosorbent assay*)

ERK: *Del inglés extracellular signal regulated kinase*

FCCP: *Del inglés carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone*)

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (*del inglés Fluorescein isothiocyanate*)

Flt3L: Ligando de tirosin-quinasa 3 tipo Fms (*del inglés Fms-like tyrosine kinase 3 ligand*)

GAL9: Galectina 9

Gm: Intensidad media de fluorescencia para una escala logarítmica

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*del inglés granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

GMP: Guanosín monofosfato cíclico

HBSS: Solución buffer de Hanks (*del inglés Hank's balanced salt solution*)

HLA: Antígenos leucocitarios humanos (*inglés de Human leukocyte antigen*)

HSC: Células madre hematopoyéticas (*del inglés Haematopoietic Stem Cells*),

IDO: Indolamina 2-3 dioxigenasa

IFA: Adyuvante incompleto de Freund (*del inglés Incomplete Freund's adjuvant*)

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

iMC: Célula mieloide inmadura

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible (*del inglés inducible nitric oxide synthase*)

IRAK: *Del inglés IL-1 receptor associated kinase*

JNK: *Del inglés jun N-terminal kinase*

Li: Linfocitos

LPS: Lipopolisacárido

MACS: Separación de células utilizando perlas magnéticas (*del inglés, Magnetic-activated cell sorting*)

MAPK: Quinasa activada por mitógenos (*del inglés mitogen-activated protein kinase*)

M-CSF: Factor estimulante de colonias de monocitos y macrófagos (*del inglés Monocyte colony stimulating factor*)

MDSC: Células mieloides heterogéneas supresoras (*del inglés Myeloid-derived suppressor cells*)

MFI: Intensidad de fluorescencia media

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (*del inglés Major histocompatibility complex*)

M.O: Médula ósea

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero (*del inglés mammalian target of rapamycin*)

MyD88: Gen de respuesta primaria de diferenciación mielóide 88 (*del inglés myeloid differentiation primary response gene 88*)

NA/LE: No contiene azida y bajo contenido de endotoxina

NCR: Receptores naturales de citotoxicidad (*del inglés Natural Cytotoxicity Receptors*)

NF- κ B: Factor nuclear κ B (*del inglés nuclear factor κ B*)

NK: *del inglés natural killer*

NOHA: N-hidroxi-L-arginina

NOS: Oxido nítrico sintasa

ODN: Oligodeoxinucleótidos sintéticos

ON: Óxido nítrico

OVA: Albúmina de huevo de gallina (*del inglés ovalbumin*)

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos (*del inglés Pathogen associated molecular patterns*)

PBS: Solución buffer de fosfatos (*del inglés phosphate balanced solution*)

PD-L: Ligando de muerte programada (*del inglés Programmed death-ligand*)

PECAM: Molécula de adhesión (*del inglés Platelet endothelial cell adhesion molecule*)

PG: Prostaglandina

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa (*del inglés phosphatidylinositide 3-kinase*)

PO: Enlace fosfodiéster

PRR: Receptor de reconocimiento de patrones (*del inglés pattern-recognition receptor*)

PS: Enlace fosforotioato

PYD: *Del inglés pyrin-domain*

RAGE: Receptores de productos de glicosilación avanzada

RE: Retículo endoplasmático

ROS: Especies reactivas del oxígeno (*del inglés reactive oxygen species*)

s.c.: Subcutáneo

S.F: Solución fisiológica

SFB: Suero fetal bovino

SOCS: Supresor de la señalización de citoquinas (*del inglés Suppressor of cytokine signaling*)

STAT: Factores transductores de señales y activadores de la transcripción (*del inglés Signal transducer and activator of transcription*)

TAM: Macrófagos asociados al tumor

TCR: Receptor de la célula T (*del inglés T cell receptor*)

TGF: Factor de Crecimiento Tumoral (*del inglés Tumoral Growth Factor*)

Th: Células T cooperadoras (*del inglés T helper*)

TIM3: *Del inglés immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3*

TLR: Receptores tipo Toll (*del inglés Toll-like receptors*)

TMRE: *Del inglés Tetramethylrhodamine, ethyl ester*

TNF: Factor de Necrosis Tumoral (*del inglés Tumor Necrosis Factor*)

T reg: Células T reguladoras

U: Unidades

VEGF: Factor de crecimiento endotelial (*del inglés vascular- endotelial growth factor*)

wt: Salvaje (*del inglés wild type*)

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

ESQUEMAS

Esquema 1: <i>Efectos del envejecimiento sobre la producción de linfocitos y la distribución de las células en los tejidos linfáticos secundarios.....</i>	8
Esquema 2: <i>El origen de las MDSC.....</i>	13
Esquema 3: <i>Mecanismos que ejercen las MDSC para inhibir la activación y proliferación de células T.....</i>	18
Esquema 4: <i>Metabolismo de L-arginina en mamíferos.....</i>	25
Esquema 5: <i>Diferenciación de MDSC derivadas de médula ósea con GM-CSF.....</i>	99

FIGURAS

Figura 1. Células mieloides CD11b ⁺ Gr1 ⁺ en sangre, médula ósea y bazo de ratones BALB/c viejos	43
Figura 2. Células mieloides CD11b ⁺ Gr1 ⁺ en bazo de ratones viejos C57BL/6	44
Figura 3. Apoptosis espontánea de células CD11b ⁺ Gr1 ⁺ de ratones viejos	46
Figura 4. Células mieloides CD11b ⁺ Gr1 ⁺ en el bazo de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA.....	48
Figura 5. Expresión de marcadores de fenotipo en células mieloides CD11b ⁺ Gr1 ⁺ de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA	50
Figura 6. Análisis de las subpoblaciones de células mieloides en ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA	52
Figura 7. Respuesta proliferativa de esplenocitos de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA	57

Figura 8. Función supresora de células mieloides de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA.....	58
Figura 9. Producción de ON en cultivo de esplenocitos de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA.....	60
Figura 10. Actividad de arginasa en esplenocitos de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA.....	61
Figura 11. Perfil de citoquinas en sobrenadantes de esplenocitos de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.....	62
Figura 12. Actividad de arginasa en células mieloides purificadas de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.....	64
Figura 13. Expresión de arginasa I en células mieloides de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.....	66
Figura 14. Inhibición de arginasa en co-cultivos de células mieloides de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA.....	67
Figura 15. Expresión de pSTAT6 en MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.....	69
Figura 16. IL-4 en sobrenadantes de co-cultivos de linfocitos T y MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.....	71
Figura 17. IL-6 en sobrenadantes de co-cultivos de células T y MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.....	73
Figura 18. Expresión de pSTAT3 en MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.....	74
Figura 19. Evaluación de la participación de IL-4 e IL-6 en la expresión de arginasa I en MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.....	77

Figura 20. Evaluación de la participación de IL-4 e IL-6 en la actividad de arginasa en MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.....	79
Figura 21. Influencia de IL-6 en la expresión de pSTAT3 en MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.....	81
Figura 22. IL-10 en sobrenadantes de co-cultivos de Li T y MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.....	82
Figura 23. Duración de la expansión de MDSC en ratones viejos luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA.....	87
Figura 24. Análisis de macrófagos y células dendríticas luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA.....	88
Figura 25. Actividad de arginasa en células mieloides y esplenocitos de ratones viejos 40 días después del tratamiento con CpG-ODN+IFA.....	90
Figura 26. IL-4 e IL-6 en cultivos de esplenocitos de ratones a distintos tiempos post-tratamiento con CpG-ODN+IFA.....	92
Figura 27. Función supresora de las células mieloides de ratones viejos 40 días post-tratamiento con CpG-ODN+IFA.....	94
Figura 28. Células mieloides en bazo de ratones viejos 80 días post-tratamiento con CpG-ODN+IFA.....	96
Figura 29: MDSC de ratones jóvenes y viejos generadas in vitro.....	102
Figura 30. Expresión de Ly6C y Ly6G en las MDSC diferenciadas in vitro	103
Figura 31. Actividad de arginasa en MDSC diferenciadas in vitro y estimuladas con CpG-ODN+IFN- γ	105
Figura 32. Producción de ON en MDSC diferenciadas in vitro y estimuladas con CpG-ODN+IFN- γ	106

Figura 33. Aumento de IL-6 en cultivos de MDSC diferenciadas in vitro y estimuladas con CpG-ODN+IFN- γ	107
Figura 34. Función supresora de MDSC diferenciadas con GM-CSF y estimuladas con CpG-ODN+IFN- γ	108
Figura 35. Purificación de células mieloides CD11b ⁺ de bazo	128

TABLAS

Tabla 1: Anticuerpos de superficie celular empleados en citometría de flujo	136
Tabla 2: Anticuerpos utilizados para ELISA de citoquinas	138

INTRODUCCIÓN

1. EL SISTEMA INMUNE EN EL ENVEJECIMIENTO

Como resultado de los avances en medicina, políticas de salud pública, y desarrollo socio-económico la expectativa de vida de las personas ha mostrado un importante aumento durante los últimos años. Aunque esta noticia es positiva también presenta nuevos retos para los individuos y la sociedad en general, ya que el envejecimiento se acompaña frecuentemente de enfermedades crónicas e infecciones que afectan negativamente la calidad de vida de los individuos.

El envejecimiento puede deteriorar múltiples órganos, sistemas y procesos, entonces ¿cuál de estos debe ser tratado para mejorar la calidad de vida de los individuos a medida que envejecen? Una de las consecuencias más significativas de la edad avanzada es la declinación del sistema inmune, lo que conlleva a una menor eficacia para responder a la vacunación y combatir infecciones (1). Es por esto que la habilidad para retardar o revertir los efectos del envejecimiento sobre el sistema inmune tendría resultados sumamente beneficiosos no sólo en el aumento de la esperanza de vida de los ancianos sino también en mejorar la calidad de la misma (2-3).

Se sabe que en humanos, y en otras numerosas especies, el sistema inmune sufre alteraciones relacionadas con el envejecimiento, fenómeno que se conoce como *inmunosenescencia* (4). Estos cambios reducen la calidad de vida de los ancianos ya que generan una mayor susceptibilidad para contraer enfermedades infecciosas, autoinmunidad, anemia, cáncer, etc. Muchas de estas

patologías fueron atribuidas a alteraciones que sufre el sistema inmune adaptativo con la edad y, sus principales mediadores: los linfocitos (5). Sin embargo el sistema inmune innato también se ve significativamente afectado, de hecho los efectos del envejecimiento sobre el sistema inmune comienzan en los escalones más altos de la jerarquía hematopoyética, con la disfunción de las células madre hematopoyéticas (HSC del inglés *Haematopoietic Stem Cells*), que al ser las que dan origen al linaje mieloide y linfoide, sus alteraciones reflejan los defectos observados en el sistema inmune innato y adaptativo (5).

Células madre hematopoyéticas en el envejecimiento

Los mecanismos subyacentes al envejecimiento del sistema hematopoyético son variados, e incluyen factores intrínsecos y extrínsecos asociados al ambiente envejecido que se combinan y afectan a las células efectoras. Evidencias recientes sugieren que las alteraciones moleculares y celulares que se producen con la edad en el compartimento de las HSC pueden contribuir significativamente a su deterioro durante el envejecimiento (6).

Las HSC poseen características que las hacen únicas: su capacidad de autorrenovación y su potencial de diferenciación. Por lo que la pérdida de actividad de estas células durante el envejecimiento resulta en el deterioro tisular (5).

El número de HSC en la médula ósea envejecida se ve aumentado entre 2 a 10 veces tanto en ratones como en humanos (5, 7); sin embargo bajo

condiciones de estrés y regeneración estas células puede exhibir numerosos defectos funcionales (5).

La pérdida de actividad funcional de las HSC de ratones viejos es concomitante con su elevada frecuencia en la médula ósea. Aún no se conocen con exactitud los mecanismos que generan el aumento de HSC en el envejecimiento. Ha sido propuesto un posible mecanismo de retroalimentación que regula el número de HSC y puede operar para compensar la pérdida de función de cada célula durante el envejecimiento, llevando a un incremento en el tamaño del conjunto de células madre (5-6). No obstante, esta hipótesis se encuentra desafiada por el hecho de que las HSC de jóvenes y las de viejos tienen una frecuencia de divisiones comparables.

Las células madre hematopoyéticas también exhiben cambios autónomos de potencial de diferenciación de linaje durante el envejecimiento mostrando atenuada producción celular de linaje eritroide y linfoide mientras que el potencial de producción celular de linaje mieloides se conserva o incluso se ve aumentado (5-10). A pesar del aumento del número de células mieloides que se originan a partir de las HSC envejecidas, su calidad se encuentra comprometida similar a lo que sucede en las HSC (5-6).

El perfil de expresión de células madre hematopoyéticas purificadas de ratones jóvenes y viejos reveló que las últimas tienen menor expresión de genes asociados a la especificidad y función linfoide mientras que genes involucrados en la función y especificidad mieloides se encontraban incrementados (7). Otra

explicación alternativa de la desviación de linaje durante el envejecimiento es que no se producen cambios en el potencial de diferenciación de las HSC individuales con la edad, pero si se encuentra alterada la composición del conjunto de HSC. En concordancia con esto, se ha observado en modelos murinos de envejecimiento, que el número de clones mieloides de HSC se encuentra aumentado comparado con el número de clones linfoides (5-6, 11).

Los laboratorios que estudian el envejecimiento de HSC concuerdan en que principalmente son los mecanismos intrínsecos de estas células los que regulan los cambios en su número durante el envejecimiento mientras que los factores extrínsecos tienen sólo un rol limitado (5). Entre los factores intrínsecos podemos nombrar por una parte, el daño oxidativo mediado principalmente por especies reactivas del oxígeno (ROS), que podría afectar la replicación y transcripción del ADN mitocondrial resultando en disfunción mitocondrial; por otra parte, el acortamiento de los telómeros que da lugar a terminaciones de cromosomas desprotegidas que son reconocidas como ADN dañado (12-13). Los últimos avances demuestran un deterioro de los programas epigenéticos que mantienen la función de las HSC, incluyendo cambios en la polaridad celular y la distribución de marcadores epigenéticos. Finalmente, entre los mecanismos extrínsecos que pueden impactar en el envejecimiento de las HSC se encuentran factores secretados por el propio nicho de estas células en la médula ósea o a nivel sistémico.

Inmunidad adaptativa en el envejecimiento

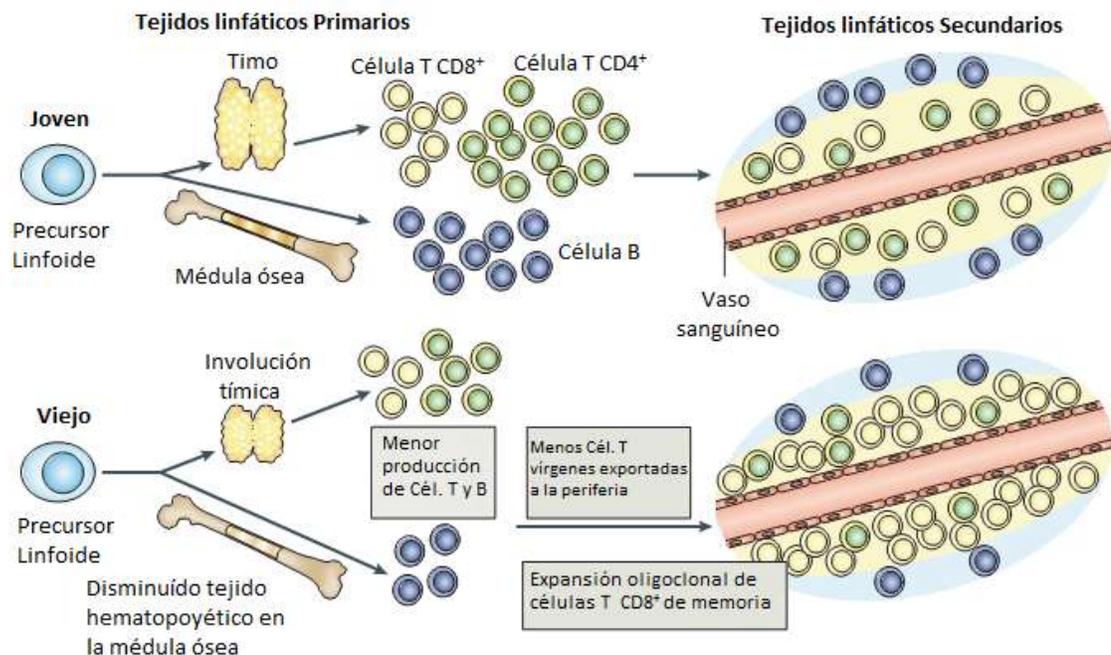
El desarrollo de las células T ocurre en el timo. El proceso de involución tímica se inicia poco antes del año de vida y a pesar de que la mayoría del parénquima es reemplazado por grasa a la mediana edad, restos del tejido funcional se conservan hasta por lo menos la sexta década tanto en humanos como en ratones. Como consecuencia, la producción y liberación al torrente sanguíneo de células T vírgenes declina a medida que avanza la edad (14) aunque esto no resulta en una disminución importante en el número de linfocitos T circulantes. Esto parece estar regulado por una proliferación homeostática de las células T, que se expanden en la periferia en respuesta a la linfopenia (15-16).

Con respecto a las células B, estudios en ratones han demostrado que la producción de estas células declina significativamente en el envejecimiento (17-19). Sin embargo, en humanos esto no se encuentra del todo establecido, aunque debido a que el volumen del tejido hematopoyético en la medula ósea disminuye (20) probablemente la linfopoyesis de la célula B podría verse afectada (2). De esta forma, aunque el número de células B periféricas no declina con la edad avanzada, sí se producen cambios en los compartimentos. El compartimento de linfocitos B está dominado por células que han tomado contacto con su antígeno y disminuye el repertorio de linfocitos B capaz de responder a nuevos desafíos antigénicos (21).

Durante el envejecimiento también se observan alteraciones en la función de las células de la inmunidad adaptativa. Aunque los niveles séricos de inmunoglobulinas se mantengan estables en individuos envejecidos, las células B producen anticuerpos con menor afinidad contra antígenos específicos y presentan menor habilidad a realizar el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas (22). Estos defectos resultan en una respuesta inmune humoral deteriorada que podrían ser intrínsecos de la célula B, aunque se ha demostrado que las células T CD4⁺ cooperadoras tienen alterada su función y también podrían estar contribuyendo al deterioro de la respuesta humoral (23).

En la edad avanzada, las células T CD8⁺ tienen una particular susceptibilidad a la expansión oligoclonal. Tal es así que el repertorio de células T CD8⁺ se inclina ampliamente hacia antígenos previamente encontrados, particularmente aquellos derivados del citomegalovirus (16, 24). De esta forma, la habilidad de la población de células T CD8⁺ queda limitada cuando tienen que responder frente a nuevos antígenos. Las células T CD4⁺ también presentan expansión oligoclonal pero en menor proporción que las CD8⁺ (25) (Esquema 1).

Numerosos trabajos han descrito alteraciones en los distintos niveles de la activación de los linfocitos T durante el envejecimiento (26-27). En consecuencia, tanto los linfocitos T vírgenes como los de memoria presentan una menor capacidad de respuesta antígeno específica (28-29) y frente a mitógenos (30). Otro defecto asociado al envejecimiento es la menor producción de IL-2, que es un factor importante en la activación de los linfocitos T (31-32).



Esquema 1: Efectos del envejecimiento sobre la producción de linfocitos y la distribución de las células en los tejidos linfáticos secundarios. Numerosos eventos contribuyen a la disminución del número y función de células de la inmunidad adaptativa durante el envejecimiento. La generación de células T disminuye como resultado de la involución tímica (la cual involucra reducción de la masa tímica medular y cortical y aumento del contenido graso). La producción de células B probablemente también disminuye con la edad debido a la reducción del contenido hematopoyético de la médula ósea. Por lo tanto, menos células T vírgenes, y posiblemente menos células B, son exportadas a la periferia. La expansión oligoclonal de la población de células T CD8⁺ comienza alrededor de la sexta década de vida, resultando en la reducción del repertorio de células T y un aumentado número de células T CD8⁺ de memoria ocupando los nichos de la periferia. *Adaptado de Dorshkind, 2009.*

Finalmente, ha sido documentado tanto en humanos (33) como en ratones (34-35) que, mientras en adultos jóvenes se encuentra un balance apropiado de las citoquinas Th1/Th2, en el organismo envejecido existe un marcado desbalance en la producción de citoquinas hacia Th2. Lo que genera una disminución de la respuesta inflamatoria que contribuye a la mayor susceptibilidad para contraer infecciones bacterianas, virales y enfermedades tumorales.

Inmunidad innata en el envejecimiento

Las células que median la inmunidad innata poseen distintos fenotipos durante el envejecimiento de acuerdo a su desarrollo y contexto de activación. Estudios en humanos mayores de 65 años y en ratones de aproximadamente 20 meses de edad, muestran que la activación del sistema inmune innato durante el envejecimiento resulta en una inflamación desregulada. Este estado involucra tanto una inflamación basal elevada, como el fracaso para montar una respuesta inmune eficaz frente a vacunas o a nuevos patógenos encontrados (36).

Los organismos de edad avanzada presentan elevados niveles de mediadores inmunes solubles, entre ellos, reactantes de fase aguda y citoquinas inflamatorias como IL-6, IL-1 β y Factor de Necrosis Tumoral (TNF) (37). Estos factores resultan en un estado inflamatorio subclínico asociado a la edad, del inglés "*Inflamm-ageing*" (38), que conduce al desarrollo y progresión de patologías relacionadas con el envejecimiento como la osteoporosis, y desordenes neurodegenerativos (5).

La mayoría de las poblaciones del sistema inmune innato parecen encontrarse estables en tamaño con la edad avanzada como es el caso de neutrófilos (39) y monocitos (40). Aunque los reportes son contradictorios, evidencia reciente indica que el estado de inflamación basal en individuos envejecidos no se encuentra asociado a un aumento en el número de células mieloides a pesar de la desviación que se produce en la diferenciación hacia este linaje (5).

Los **neutrófilos** son las primeras células en migrar hacia el sitio infectado con el patógeno. Estudios en humanos y ratones han demostrado que a medida que avanza la edad, la quimiotaxis de los neutrófilos se encuentra alterada, reduciendo no solo su migración hacia los sitios de inflamación sino también su egreso desde los tejidos inflamados. Estas células también presentan menor capacidad de fagocitar *Escherichia coli* o *Streptococcus pneumoniae* opsonizados (41-42) así como de matar los microorganismos fagocitados (43). La alteración de la función efectora del neutrófilo en el envejecimiento, se relaciona con su deteriorada función de transducción de señales (5, 44).

La citotoxicidad inducida por IFNs de tipo I de las **células NK** (del inglés Natural Killer) se encuentra disminuída en ratones envejecidos, al igual que la producción de IFN- γ y granzima B en respuesta a combinaciones específicas de citoquinas (45). En humanos durante el envejecimiento, las células NK CD56^{high}, (la principal subpoblación de células NK productoras de citoquinas como IFN- γ , TNF, etc.) disminuyen en proporción y presentan menor capacidad de secreción de citoquinas y quimioquinas. El compartimento de células NK CD56^{low} citotóxicas aumenta, pero la capacidad citotóxica de cada célula disminuye (36, 46-48).

Varios trabajos de **células presentadoras de antígeno** han demostrado un deterioro en su función durante el envejecimiento. Los macrófagos presentan una reducción en la producción de óxido nítrico en ratones envejecidos. La evaluación de la capacidad fagocítica durante el envejecimiento ha producido

resultados contradictorios. Mientras que varios estudios reportaron que la fagocitosis bacteriana se encontraba conservada en los macrófagos murinos (49-50), otros, que fueron realizados en monocitos y células dendríticas derivadas de monocitos de humanos, sugieren un deterioro de la fagocitosis asociado a la edad (51).

Ha sido reportado que células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones viejos fallaron en el control del crecimiento tumoral en un modelo de melanoma B16 a diferencia de las de ratones jóvenes (52). Aun no se determinó si la presentación de antígenos en humanos envejecidos es defectuosa, aunque algunos estudios han mostrado que en células dendríticas y monocitos no se encontraría afectada (53).

Otro grupo de células del sistema inmune innato que podrían tener un rol muy importante en el envejecimiento del sistema inmune son las células mieloides supresoras, MDSC (del inglés *Myeloid-Derived Suppressor Cells*). En la última década se ha ampliado su estudio y todavía son escasos los reportes que las caracterizan en el envejecimiento.

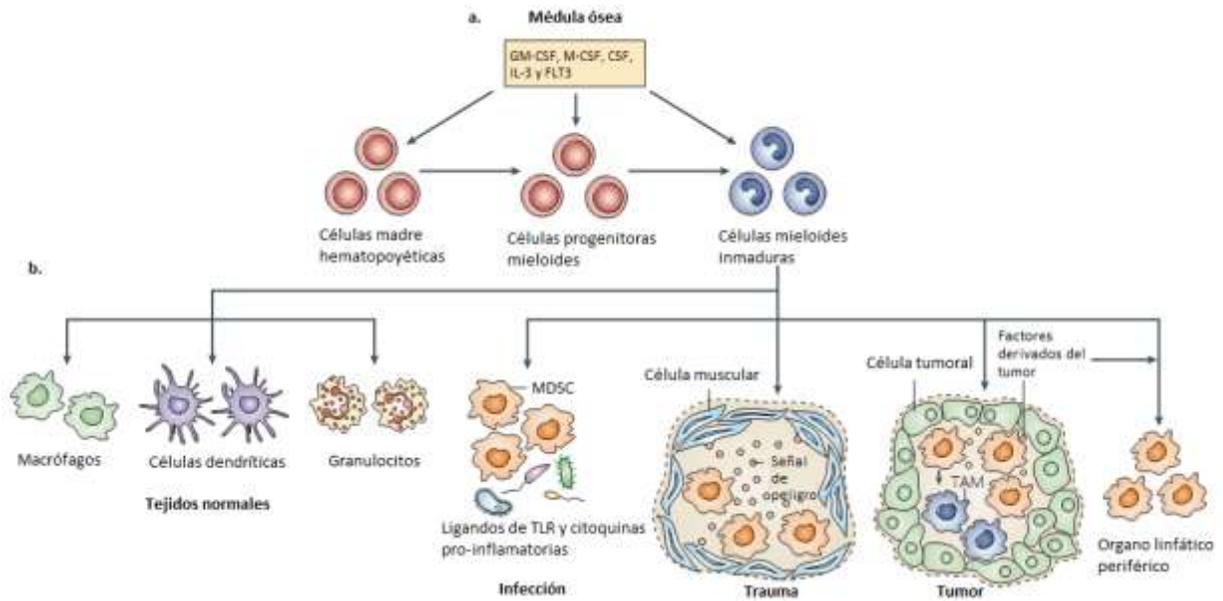
2. CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS (MDSC)

Las células mieloides se originan a partir de células madre hematopoyéticas pluripotenciales y se desarrollan a través de una secuencia de pasos de diferenciación hasta llegar a ser células mieloides maduras. Las MDSC

consisten en una población heterogénea de células mieloides inmaduras y progenitores mieloides. En individuos sanos se generan en la médula ósea y rápidamente se diferencian a varios subconjuntos de células mieloides más especializados: granulocitos, macrófagos y células dendríticas las cuales son esenciales para el normal funcionamiento del sistema inmune innato y adaptativo (54).

En contraste, en condiciones patológicas como cáncer, enfermedades infecciosas, sepsis, inflamación, trauma y algunas enfermedades autoinmunes, se produce un bloqueo parcial en la diferenciación de estas células mieloides en su camino a la maduración resultando en la expansión de la población de células mieloides inmaduras (55) (Esquema 2).

Las células MDSC fueron descritas hace más de 25 años en bazo y médula ósea de ratones con tumor (56-57); y en pacientes con cáncer (58-59), sin embargo, en los últimos años empezó a apreciarse su importancia como reguladores negativos de la respuesta inmune (55-56, 58).



Esquema 2: El origen de las MDSC. **a)** Las células mieloides inmaduras (IMC) son parte del proceso normal de mielopoyesis, el cual se lleva a cabo en la médula ósea y es controlado por un complejo programa de factores solubles, incluyendo citoquinas (tales como GM-CSF, M-CSF, SCF, IL-3, y FLT3 (del inglés FMS-related tyrosine kinase 3) y moléculas expresadas por distintas células. Las células madres hematopoyéticas se diferencian a progenitores mieloides comunes y luego a IMC. **b)** Normalmente, las IMC migran a diferentes órganos en la periferia, donde se diferencian a macrófagos, células dendríticas o granulocitos. Sin embargo, algunos factores que se producen en infecciones agudas o crónicas, trauma, sepsis o en el microambiente tumoral, promueven la acumulación de IMCs en estos sitios, previenen su diferenciación e inducen su activación. Estas células exhiben funciones inmunosupresoras y son conocidas como células mieloides supresoras (MDSC). Las MDSC se acumulan en órganos linfáticos periféricos en respuesta a distintos factores. También pueden diferenciarse a macrófagos asociados a tumor (TAM) en el microambiente tumoral. *Adaptado de Gabrilovich v col.. 2009*

Marcadores fenotípicos de las MDSC

Las MDSC comprenden una mezcla de células mieloides inmaduras con morfología de monocitos o granulocitos (60). El fenotipo de las MDSC ha sido bastante controversial y numerosos marcadores han sido usados para definirlos. En ratones estas células se caracterizan por la co-expresión de las moléculas de

superficie celular Gr1 y CD11b (también conocida como α M-Integrina). La médula ósea de ratones normales contiene aproximadamente 20-30% de células con este fenotipo, sin embargo en el bazo se encuentran en menor proporción, de 2 a 4% y están ausentes en los ganglios linfáticos (55, 61-62). El epítipo Gr1 se expresa en las moléculas Ly6G y Ly6C, la familia Ly-6 es un grupo de moléculas de bajo peso molecular que son glicoproteínas de superficie celular codificadas por un complejo de genes en el cromosoma 15. La aplicación de anticuerpos específicos para Ly6C y Ly6G revelaron 2 poblaciones diferentes de MDSC, un subconjunto con fenotipo CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low}, que morfológicamente tienen características de granulocitos polimorfonucleares y las MDSC CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high} con fenotipo monocítico (63).

En los últimos años varias moléculas de superficie han sido usadas para identificar mejor las subpoblaciones de MDSC, entre ellas CD80 (también conocida como B7.1) (64), CD115 (también conocida como el factor estimulante de colonias de macrófagos M-CSF) (65) y CD124 (también conocido como cadena α del receptor de IL-4 (IL-4R α) (66), además ha sido reportado que las MDSC que expresan estas moléculas tienen potente actividad inmunosupresora (65-66). Sin embargo la expresión de CD115 y CD124 podría encontrarse restringida sólo a algunos modelos tumorales (60). Otras moléculas que han sido relacionadas con la función supresora de las MDSC, son PD-L1 y PD-L2 que son receptores inhibitorios de la familia B7 (67). Teniendo en cuenta su estado de inmadurez, muchos investigadores utilizan como marcador a la molécula de adhesión PECAM-1 (CD31) debido a que se encuentra expresado en

progenitores y células mieloides inmaduras, así como la baja expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras (68-69).

En humanos normalmente las células mieloides inmaduras constituyen aproximadamente un 0,5% de las células mononucleares de sangre periférica. En éstos, las MDSC fueron inicialmente definidas como células HLA-DR-CD33⁺ (70) o CD14-CD11b⁺ (71), ambos fenotipos identificaban poblaciones celulares supresoras de las células T (72). Recientemente marcadores más rigurosos han definido a las subpoblaciones de las MDSC, incluyendo la expresión de CD14^{+/dull} (un marcador que inicialmente fue controversial pero actualmente es aceptado) en la subpoblación monocítica (73-74) y la de CD15 en la granulocítica (75-76).

Mecanismos supresores de las MDSC

Las actividades inmunosupresoras de las MDSC en la mayoría de las situaciones requieren contacto célula-célula lo que sugiere que funcionan a través de receptores de superficie celular y/o a través de la liberación de mediadores solubles de corta vida (55).

Las MDSC poseen numerosos mecanismos que influyen la respuesta inmune innata y adaptativa. Estos pueden ser agrupados en 4 grupos:

✓ ***Inducción de células T regulatorias***

Las MDSC promueven la expansión clonal específica de antígeno de las células T regulatorias naturales y también inducen la conversión de células T CD4⁺ vírgenes a células T regulatorias inducidas. Si bien los mecanismos involucrados no están completamente dilucidados podría estar participando el contacto célula-célula (incluyendo interacciones entre CD40 y CD40L) (77), la producción de factores solubles como IFN γ , IL-10, TGF β por las MDSC (65), y posiblemente también la expresión de arginasa I (78) (Esquema 3a).

✓ ***Depleción de aminoácidos esenciales para las células T***

Este grupo abarca la privación de nutrientes requeridos por los linfocitos para su crecimiento, diferenciación y proliferación. Principalmente la depleción de L-arginina debido que es metabolizada por arginasa I (79-80), y de L-cistienina a través de su secuestro y consumo (81). La depleción de estos aminoácidos causa disminución de la expresión de la cadena ζ del complejo del receptor de la célula T (TCR) y arresto de la proliferación de células T activadas (Esquema 3b).

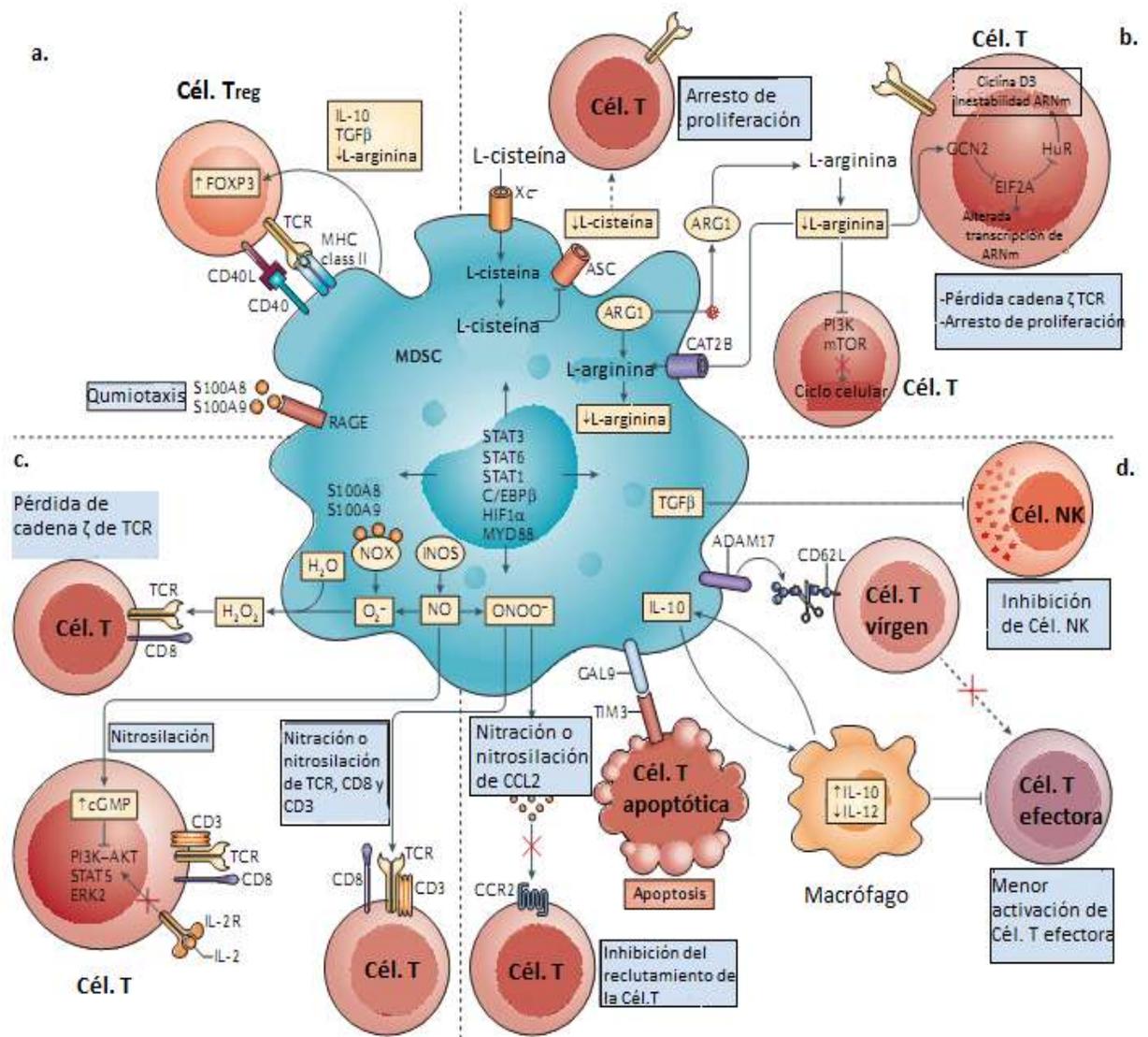
✓ ***Generación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno***

Dentro del primer grupo podemos mencionar la generación de estrés oxidativo el cual es causado por la producción de especies reactivas del oxígeno, ROS, (del inglés *Reactive Oxygen Species*) y especies reactivas del nitrógeno por parte de las MDSC. El peróxido de hidrógeno y los peroxinitrítos son producidos

por las actividades combinadas y cooperativas de las enzimas NADPH oxidasa, arginasa I, y óxido nítrico sintasa en subgrupos de MDSC y conducen a distintos bloqueos moleculares en las células T que van desde la pérdida de la expresión de la cadena ζ del TCR (82) y la interferencia de señalización del receptor de IL-2 (83), hasta la nitración y subsecuente pérdida de sensibilidad del TCR (84) (Esquema 3c).

✓ **Bloqueo de tráfico y viabilidad de linfocitos**

El último grupo comprende la interferencia en el tráfico y la viabilidad de los linfocitos. La expresión de ADAM17 (proteína 17 que contiene un dominio desintegrina y metaloproteinasa) en la membrana plasmática de las MDSC disminuye la expresión de CD62L (L-selectina) en la superficie de las células T CD4⁺ y CD8⁺ vírgenes limitando su recirculación a los ganglios linfáticos (85). En modelos tumorales, la modificación de CCL2 por los peroxinitritos derivados de las MDSC, es un proceso que afecta la migración de las células T CD8⁺ efectoras hacia el núcleo tumoral (86). Además las MDSC expresan galectina 9, que se une a TIM3 (del inglés *immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3*) en las células T y les induce apoptosis (87). También ha sido reportado que las MDSC reducen el número e inhiben la función de las células NK humanas y de ratón principalmente a través de mecanismos que dependen del contacto de membranas, es decir a través de TGF β unido a la membrana en el caso de las MDSC de ratón y a través de la interacción del receptor de células NK, NKp30 (también conocido como NCR) (88) (Esquema 3d).



Esquema 3: Mecanismos que ejercen las MDSC para inhibir la activación y proliferación de células T. Las MDSC pueden inhibir eficientemente la respuesta T antitumoral a través de numerosos mecanismos. **a)** Las MDSC pueden inducir el desarrollo de células T regulatorias (Treg) o expandir poblaciones ya existentes de Treg. Las proteínas S100A8 y S100A9 están involucradas en la quimiotaxis de las MDSC y otras células mieloides, estos efectos son mediados en parte a través de la activación de receptores de productos de glicación avanzada (RAGE). Además, S100A8 y S100A9 junto con gp91phox son parte del complejo NADPH oxidasa que es responsable de la aumentada producción de ROS por las MDSC. **b)** Las MDSC privan a las células T de aminoácidos esenciales para su crecimiento y diferenciación. **c)** Las MDSC liberan moléculas oxidativas, tales como peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y peroxinitritos (ONOO⁻). Los peroxinitritos causan nitración y nitrosilación de componentes del complejo de señalización del TCR y el H₂O₂ genera la pérdida de la cadena ζ del TCR, inhibiendo la activación de la célula T. **d)** Las MDSC pueden interferir en la migración y viabilidad de las células T. La metaloproteínasa ADAM17 cliva CD62L, el cual es necesario para la migración de la célula T a los ganglios linfáticos, y galectina 9 (GAL9) puede unirse a TIM3 en la célula T e inducirle apoptosis. Como la inducción de las vías supresoras que se detallan en la figura son reguladas por factores de transcripción comunes, estas vías pueden operar en más de un tipo de MDSC. *Abreviaturas:* ARG1, arginasa I; ASC, transportador de aminoácidos tipo asc.; CAT2B, isoforma 1 del 2 transportador de aminoácidos cationicos (transportador de L-arginina); CCL2, Ligando 2 de quimioquinas CC; CCR2, Receptor 2 de quimioquinas CC; C/EBPβ (del inglés CAAT/enhancer-binding protein-β); EIF2A, factor 2A de iniciación de translación eucariota; ERK2 (quinasa 2 regulada por señal extracelular); FOXP3 (del inglés forkhead box P3); HIF1α, (Factor 1α inducido-hipoxia); HuR, Antígeno Hu- R (ELAVL1); IL-2R, receptor de IL-2; iNOS, (del inglés inducible nitric oxide synthase); mTOR (del inglés mammalian target of rapamycin); MYD88 (del inglés myeloid differentiation primary-response protein 88); NK, Células Natural killer; PI3K, fosfatidil inositol 3 quinasa; STAT (del inglés signal transducer and activator of transcription); TGFβ (transforming growth factor-β); Xc⁻, cystine-glutamate transporter. **Adaptado de Gabrilovich y col., 2012.**

Mecanismos de expansión y activación de las MDSC

Numerosos factores pueden inducir la expansión de las MDSC, entre ellos la ciclooxigenasa 2, prostaglandinas (89-90) , SCF (del inglés *stem cell factor*) (89) , M-CSF (del inglés *Macrophage colony-stimulating factor*), IL-6 (91), GM-CSF (del inglés *granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*) (91), VEGF (del inglés *vascular- endotelial growth factor*) (92) que promueven la hemopoyesis y contribuyen al bloqueo de maduración de las células mieloides. Muchos de estos factores convergen en la familia de proteínas JAK (del inglés

Janus Kinase) y del transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3) que son moléculas de señalización relacionadas a la supervivencia, proliferación, diferenciación y apoptosis celular (93). Ha sido reportado que en animales con tumor, las MDSC presentan mayores niveles de STAT3 fosforilado (94). La activación de STAT3 se encuentra asociada a un aumento en la supervivencia y proliferación de progenitores mieloides probablemente mediante el aumento de expresión de la ciclina D1, MYC y survivina. Si esta activación es anormal y persistente puede impedir la diferenciación y maduración de las células mieloides expandiendo la población de MDSC (55). También se observó que STAT3 puede inducir la expresión de proteínas S100 que se unen al calcio en las MDSC, tanto S100A8 como S100A9, las cuales pueden impedir su diferenciación. La NADPH oxidasa es también otro blanco importante de STAT3 ya que la inducción de los componentes p47 de NADPH oxidasa mediada por STAT3 aumenta los niveles de ROS haciendo a las MDSC más supresoras (95). Adicionalmente STAT3 regula el factor de transcripción C/EBP β (del inglés *CCAAT/enhancer-binding protein- β*), el cual controla la mielopoiesis en individuos sanos (96) y tiene un rol central en la diferenciación de progenitores mieloides a MDSC funcionales (97).

La familia de Receptores Tipo Toll (TLR, del inglés *Toll-like receptors*) también tiene un importante rol en el desarrollo de células mieloides principalmente mediante la activación de MYD88 (del inglés *Myeloid differentiation primary-response protein 88*) y la posterior inducción de NF- κ B (del inglés *nuclear factor- κ B*), el cual es fundamental para la movilización de

células mieloides al sitio de infección, injuria o crecimiento tumoral (98). También ha sido reportado que el LPS combinado con IFN γ promueve la expansión de poblaciones de MDSC probablemente inhibiendo su diferenciación a células dendríticas (99). Por su parte, TGF- β derivado de células tumorales puede inducir la acumulación de células mieloides (90).

Durante estados inflamatorios como en modelos tumorales los factores solubles pro-inflamatorios derivados del tumor como IL-1 β , IL-6, S100A8 and S100A9 (97) así como citoquinas liberadas por las células T activadas tales como IFN γ , IL-4, IL-10 e IL-13 (66) inician los caminos inmunosupresores que comprometen a las células mieloides inmaduras a convertirse en MDSC.

Además de los factores comprometidos en su expansión, las MDSC requieren de factores que induzcan su activación. Estos son producidos principalmente por células T activadas, por el estroma tumoral, por productos bacterianos o virales o como resultado de muerte de células tumorales (68). Entre estos factores, podemos incluir IFN- γ , ligandos de TLR, IL-4, IL-13 y TGF- β , entre otros, los cuales activan varias vías de señalización en las MDSC que involucran a STAT6, STAT1 y NF- κ B (55).

La vía de señalización de IL-4R α (también conocido como CD124) y STAT6, el cual se activa por la unión de IL-4 o IL-13 a IL-4R α , tiene un rol importante en la actividad supresora de las MDSC. La activación de la vía de señalización de IL-4R α induce la expresión de arginasa I en MDSC (100). IL-4 e

IL-13 inducen la función supresora de las MDSC al incrementar la actividad de arginasa I (101).

La activación de TLR no solo está implicada en la expansión sino también en la activación de las MDSC, por ejemplo TLR4 regula la potencia supresora de estas células a través de un mecanismo dependiente de NF- κ B (102).

Las MDSC en el envejecimiento

Como hemos mencionado anteriormente la desregulación que sufre el sistema inmune durante el envejecimiento contribuye al mayor riesgo de contraer cáncer, enfermedades infecciosas y autoinmunes.

En la actualidad hay pocos estudios que abarcan el impacto del envejecimiento en las MSDCs y sus consecuencias en la inmunidad a edad avanzada.

¿Podrían las MDSC de viejos tener mayor capacidad supresora y por lo tanto contribuir a la alteración de la respuesta inmune en los ancianos? Enioutinna y colaboradores demostraron que las células CD11b⁺Gr1⁺ se encontraban aumentadas en ratones envejecidos y que fenotípicamente eran similares a las MDSC aisladas de ratones sépticos. Incluso la estimulación de células de bazo de ratones viejos causaba acumulación de células mieloides proinflamatorias que expresaban TNF, IL-6 e IL-12(p40), pero también tenían alta expresión de iNOS y de arginasa I y de esta manera suprimían la proliferación de la célula T y la producción de IL-12(103).

De esta forma algunos autores postulan que la acumulación de MDSC con la edad puede contribuir a algunas de las disfunciones inmunes y patologías observadas en el envejecimiento. Heithoff y colaboradores mostraron que ratones jóvenes al ser inmunizados con la vacuna bivalente para Salmonella, desarrollaron inmunidad cruzada frente a aislados clínicos de esta bacteria; por el contrario, los ratones viejos tenían 10 veces mayor número de bacterias en el bazo y murieron antes que los jóvenes, como se encontraron mayores porcentajes de células CD11b⁺Gr1⁺ en estos ratones viejos, concluyeron que estas contribuían a su menor capacidad para combatir la infección (104).

No podemos dejar de lado la importancia que adquieren estas células en la incidencia de cáncer en la edad avanzada. De esta manera fue reportado un aumento de MDSC en distintos modelos tumorales en ratones envejecidos (105); y también se observó en un modelo de melanoma murino que la depleción de MDSC en ratones envejecidos mejoraba la inmunidad antitumoral (106).

3. METABOLISMO DE L-ARGININA

La L-arginina es un aminoácido dibásico que juega un rol central en diversos sistemas biológicos incluyendo el sistema inmune. La fuente primaria de L-arginina es la dieta, pero también puede ser sintetizada de novo a partir de citrulina. En determinadas situaciones patológicas, la biosíntesis de L-arginina no puede compensar el agotamiento o la ingesta insuficiente y, por

lo tanto la dieta es el factor determinante más importante de los niveles plasmáticos de L-arginina. Por esta razón, L-arginina es generalmente considerado un aminoácido semi-esencial (o condicionado)(107-108).

L-arginina es sustrato de 4 enzimas que existen como múltiples isoformas: arginasas (Arginasa I y II), óxido nítrico sintasas (NOS1, NOS2, NOS3) Arginina glicin amidinotransferasa (AGAT), y L-arginina descarboxilasa (ADC) (109).

La L-arginina de la dieta es absorbida por células epiteliales y atraviesa la membrana plasmática mediante un sistema de transportadores de aminoácidos cationicos (CAT) (110). En la célula, la L-arginina es metabolizada por las enzimas NOS para producir citrulina y óxido nítrico el cual juega un rol importante en la respuesta citotóxica y en la vasodilatación (111). Alternativamente, las enzimas arginasa I y arginasa II metabolizan la L-arginina a L-ornitina y urea, el primero es precursor de la producción de poliaminas esenciales para la proliferación celular y el segundo es un mecanismo importante para la desintoxicación de degradación de proteínas (112). Arginasa I y arginasa II son codificadas en dos genes distintos y difieren no sólo en el tipo de células en que se expresan sino también en su regulación y en su localización subcelular, pero catalizan la misma reacción bioquímica (113) (Esquema 4).

citoquinas Th1 y Th2 y por vías bioquímicas intracelulares complejas que incluyen retroalimentación negativa y competencia por el mismo sustrato.

La expresión de arginasa I e iNOS en macrófagos murinos es diferencialmente regulada por citoquinas Th1 y Th2 (114). La estimulación de macrófagos con IFN- γ aumenta exclusivamente iNOS, mientras que IL-4, IL-10 e IL-13 (101, 115), TGF- β o GM-CSF(116) inducen la isoforma citosólica arginasa I. Por su parte, la isoforma mitocondrial arginasa II, de expresión constitutiva en macrófagos, no es significativamente modulada por citoquinas Th1 o Th2 (117).

La inhibición de arginasa I conduce al aumento de la expresión de iNOS y consecuentemente promueve la producción de óxido nítrico (118). Por el contrario la inducción de arginasa inhibe la actividad de iNOS y contribuye a la fisiopatología de diversas enfermedades como disfunción vascular y asma (119). El mecanismo de inhibición de iNOS por arginasa I parece estar mediado por la depleción del sustrato que bloquea la translación de iNOS. Bajos niveles de óxido nítrico inducen nitrosilación de residuos cisteína de arginasa I lo que aumenta la actividad biológica de esta enzima reduciendo la disponibilidad de L-arginina y por lo tanto bloquea la expresión de iNOS (120). De esta forma, N $^{\omega}$ -hidroxi-L-arginina (NOHA), un intermediario de la biosíntesis de ON mediada por iNOS, es un inhibidor fisiológico de arginasa, mientras que las poliaminas, producidas vía arginasa-ornitina decarboxilasa (ODC), son conocidas inhibidores de iNOS.

Las proteínas CAT son los principales transportadores responsables del ingreso de L-arginina desde el medio extracelular al interior de las células. Con respecto a su expresión en células mieloides se sabe que los macrófagos murinos expresan constitutivamente CAT-1 e incrementan la expresión de CAT-2B bajo estímulos que inducen activación clásica o alternativa (117), por lo que junto a un aumento del catabolismo a través de la inducción de iNOS o arginasa, se activa también un aumento de la capacidad de captación de la célula; se ha reportado también que macrófagos peritoneales estimulados con IL-4 e IL-13 aumentan la expresión de arginasa I y CAT-2B lo que resulta en un incremento en el ingreso de la L-arginina al interior celular (109).

L-arginina y respuesta inmune de los linfocitos T

Considerables hallazgos sugieren una estrecha correlación entre la disponibilidad de L-arginina y la regulación de la proliferación de los linfocitos T (100). Son numerosos los trabajos que demuestran que un aumento en el metabolismo de este aminoácido en MDSC puede resultar en el deterioro de la respuesta de linfocitos T en una amplia variedad de modelos de stress inmune (121-122). Ambas enzimas, iNOS y arginasa, tienen un alto potencial para suprimir ciertas funciones de los linfocitos T. La inducción de cada una de estas enzimas por separado resulta en un bloqueo reversible de la proliferación de las células T.

Por un lado, ON previene la proliferación de los linfocitos T por interferir con la vía de señalización del receptor de IL-2 (IL-2R) (83), inhibe la expresión

de antígenos leucocitarios humanos (HLA) clase II (123) e induce apoptosis de linfocitos T. Por otro lado, la inducción de arginasa en las MDSC genera un aumento en el catabolismo de L-arginina, resultando en la depleción de este aminoácido en el microambiente. La escasez de L-arginina bloquea la proliferación de los linfocitos T a través de diversos mecanismos, entre ellos, una disminución en la expresión de la subunidad CD3 ζ del complejo TCR-CD3 sobre la membrana (79) y el arresto en la fase Go-G1 del ciclo celular, por prevenir el aumento en la expresión de ciclina D3 y la quinasa dependiente de ciclina 4 (124).

Cuando ambas enzimas, arginasa e iNOS, son inducidas simultáneamente, característica peculiar de las MDSC, o por lo menos en un subgrupo de esta población heterogénea de células supresoras, se favorece la producción de peroxinitritos generados por iNOS bajo condiciones de L-arginina limitante. Por mecanismos de nitración de tirosinas sobre diversas proteínas, los peroxinitritos inducen apoptosis de linfocitos T (125). Así, iNOS y arginasa pueden actuar por separado o sinérgicamente *in vivo* para controlar las respuestas inmunes.

Como mencionamos anteriormente la actividad supresora de las MDSC se encuentra asociada al metabolismo de L-arginina que sirve como sustrato de arginasa I e iNOS, enzimas que se encuentran altamente expresadas en las MDSC resultando en la inhibición de la función de la célula T (122). De esta manera podemos decir que la disponibilidad de L-arginina y la regulación de la

proliferación de la célula T se da a raíz de que la actividad de arginasa I en las MDSC metaboliza la L-arginina, siendo ésta depletada del microambiente extracelular (124).

4 .MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR CPG-ODN

Los receptores del sistema inmune innato de reconocimiento de patrones denominados PRRs (del inglés *Pattern-recognition receptors*) son codificados en la línea germinal para detectar y clasificar la infección a través del reconocimiento de patrones moleculares conservados asociados a patógenos microbianos (PAMP, del inglés *Pathogen associated molecular patterns*) (126-127). La familia mejor caracterizada de PRR son los TLR. Algunos de los TLR se expresan en la superficie celular (TLR1, 2, 4, 5, 6 y 10) y otros son intracelulares (endosomales) como es el caso de los receptores que reconocen ácidos nucleicos: TLR3, 7, 8 y 9. Se cree que la localización endosomal de estos receptores permite la detección eficaz de ácidos nucleicos procariontes, mientras que previene la estimulación “accidental”, específicamente de TLR9, por motivos CG en el ADN propio. Cada TLR tiene una función distinta en términos del reconocimiento de los PAMP y de la respuesta inmune (128).

El ligando natural para TLR9, el motivo CpG del ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano, puede ser imitado por hebras simples de oligodeoxinucleótidos hipometilados (CpG-ODN) que son estables, de bajo

costo y de fácil producción, propiedades que los convierte en un atractivo modelo para el estudio de la inmunidad innata y la inmunoprotección.

CpG-ODN

Tokunaga y colaboradores establecieron por primera vez la inmunogenicidad del ADN procariota cuando se descubrió que una pequeña fracción de ADN del bacilo *Mycobacterium bovis* cepa Calmette-Guerin (BCG), era capaz de inducir IFN tipo I generando la activación de células NK (129). Luego, Krieg y colaboradores establecieron que la respuesta inmune es generada sólo cuando los motivos CG (citosina-guanina) se incluyen en la fracción de ADN y su inmunogenicidad se ve afectada cuando éstos se encuentran metilados. Esta secuencia CG no metilada es más frecuente en el ADN bacteriano que en el genoma de vertebrados. Debido a que la mayoría de las secuencias CG en mamíferos están metiladas, la capacidad del sistema inmune para reconocer sólo aquellas que no se encuentran metiladas es una característica muy importante que le permite a nuestro organismo, diferenciar el ADN procariota del propio. Además, en este mismo trabajo, los autores demuestran que se obtiene el mismo efecto inmunoestimulante, utilizando un oligodeoxinucleótido sintético que contiene motivos CpG (citosina unida por enlace fosforotioato a guanina conocido como CpG-ODN (PS)) no metilados (130). Para ser inmunoestimulante las secuencias CG deben encontrarse en un contexto particular de bases por eso se habla de “motivos CpG”. Puede decirse que los CpG-ODN son cadenas sintéticas simples de ADN que contienen los dinucleótidos

citocina-guanina no metilados. Posteriormente, Hemmi y colaboradores establecieron que TLR9 es el receptor que reconoce ADN rico en secuencias CpG no metiladas (131).

La expresión de los distintos TLR es heterógena en las diferentes células que forman parte de la inmunidad innata (132). En lo que respecta a TLR9, éste se expresa en humanos principalmente en células B y células dendríticas plasmacitoideas en condiciones basales. Algunos estudios también han reportado la expresión de este receptor tanto en neutrófilos, monocitos, células natural killer como en células epiteliales pulmonares luego de un estímulo (133-135). Por otra parte, los ratones, en condiciones basales, expresan TLR9 no sólo en células B y células dendríticas plasmocitoideas, sino también en monocitos y células dendríticas convencionales (136).

De acuerdo a la secuencia, la longitud, el número y posición de los motivos CpG, las modificaciones químicas, y las estructuras secundaria y terciaria han sido descritas distintas clases de ODN estimulatorios, CpG-ODN clase A, clase B y clase C. El **CpG-ODN clase B**, el utilizado en este trabajo de tesis, codifica para múltiples motivos CpG en un esqueleto fosforotioato, modificación que evita su degradación por nucleasas y aumenta su actividad de 10 a 100 veces comparado con el ODN fosfodiéster.

CpG-ODN clase B



Especialmente el motivo 5'-GTCGTT-3' induce la mejor respuesta en células del sistema inmune humano mientras que 5'-GACGTT-3' es la secuencia estimuladora óptima en ratones (conocido corrientemente como CpG-ODN 1826) (137). CpG-ODN clase B, es el que está actualmente en uso en la mayoría de los ensayos clínicos realizados en humanos (138).

En estado basal, el TLR9 se encuentra predominantemente a nivel del retículo endoplasmático (RE). La estimulación de una célula con CpG-ODN requiere su internalización. El mecanismo de acción de CpG-ODN ha sido extensamente estudiado (136, 139-142). La activación de TLR9 por CpG-ODN resulta en la migración del factor de transcripción NF- κ B al núcleo y de esta forma induce la transcripción de genes pro-inflamatorios (136, 142)

CpG-ODN en la inmunidad innata y adaptativa

CpG-ODN activa una cascada immunoestimuladora que finaliza con la maduración, diferenciación y proliferación de múltiples células inmunes, incluyendo linfocitos B y T, células NK, monocitos, macrófagos y células dendríticas. En conjunto, estas células secretan citoquinas y quimioquinas que crean un ambiente inmunológico de características pro-inflamatorias, dado por la secreción de IL-1, IL-6, IL-18 y TNF, con un perfil desviado hacia una respuesta Th1 (caracterizada por la secreción de IL-12 e IFN- γ).

Cuando las células B son estimuladas por el oligodeoxinucleótido secretan citoquinas, tales como: IL-6, IL-10 e IL-12, involucradas en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa (143).

Por otro lado, las células dendríticas plasmocitoideas estimuladas con CpG-ODN, secretan citoquinas tales como: IFNs y TNF. Además, secretan IL-12 que promueve la diferenciación de células T cooperadoras (Th) 0 a Th1 (productoras de IFN- γ) e inducen la migración de estas últimas para interactuar con las células B que se diferencian a células plasmáticas (143).

Debido a las propiedades inmunoestimuladoras que presenta, CpG-ODN es utilizado como agente terapéutico inmunoprotector en enfermedades infecciosas, alergia, cáncer y como un potente adyuvante de vacunas (136, 138). Han sido muy estudiados los efectos de CpG-ODN como adyuvante solo o formulado en nanopartículas, o en partículas tipo virus en diversos modelos animales (144). CpG-ODN favorece una respuesta inmune de tipo Th1 y su aplicación combinada con bajos niveles de formulaciones de tipo oleosas aumenta la respuesta inmune simultáneamente con la reducción del daño tisular asociado con el uso de adyuvantes Th1 convencionales (145).

Las propiedades adyuvantes de CpG-ODN son resultado de:

- Aumento en la función de las células presentadoras de antígeno.
- Inducción de un microambiente de citoquinas y quimioquinas que favorecen la inmunidad específica de antígeno.

- Aumento en la captación del antígeno mediado por receptores que reconocen ADN sobre las células presentadoras de antígeno.

Sin embargo, el hecho de que CpG-ODN sea un potente inmunoestimulante plantea posibles problemas en cuanto a su seguridad. Por ejemplo, el tratamiento con CpG-ODN claramente puede exacerbar la autoinmunidad en modelos murinos de lupus, esclerosis múltiple, colitis y artritis (136).

Propiedades contraregulatorias de CpG-ODN

Consideraciones evolutivas sugieren que la vía de TLR9 no hubiera evolucionado como un mecanismo de defensa inmunológico importante a menos que su activación fuese regulada de alguna manera, a fin de limitar el riesgo de inducir autoinmunidad. Así, han surgido mecanismos específicos de control para regular un desvío excesivo en las respuestas de CpG-ODN a diferentes niveles de la señalización de TLR9 y de la inducción de citoquinas, añadiendo complejidad a la activación inmune mediada por TLR9. En efecto, estudios realizados en varios modelos experimentales han demostrado que la estimulación de TLR9 induce su propia regulación a través de mecanismos como la inducción de IFN- α (146) o la secreción de IFN- γ (147). Otra citoquina que actúa como reguladora negativa de la respuesta de CpG-ODN es IL-10. Niveles altos de IL-10 resultan en una fuerte disminución en la secreción de IFN- α por las DC plasmacitoideas (137). Otros factores que regulan las respuestas a TLR9 están representados por algunos componentes que

interactúan con las vías de señalización de TLR9. La inducción de SOCS, MKP-1 (fosfatasa de MAPK), la activación de ERK y la disminución en la expresión de IRAK también han sido descritas como moderadores negativos de las respuestas dadas por CpG-ODN (136-137). La comprensión de estos mecanismos podría permitir aumentar la eficacia terapéutica de los CpG-ODN. Entre otros factores que regulan las respuestas a TLR9, se reportó en macrófagos murinos en presencia de CpG-ODN, un aumento de la expresión de la enzima anti-inflamatoria ciclooxigenasa-2 (COX-2) junto con la enzima pro-inflamatoria iNOS (lo que genera una respuesta menos inflamatoria que cuando se activa iNOS sola) resultando en la producción de prostaglandina E2 y óxido nítrico (ON) respectivamente (148-150)

ANTECEDENTES DE NUESTRO GRUPO

En trabajos previos de nuestro grupo hemos demostrado que CpG-ODN es capaz de inducir la activación de la enzima arginasa en macrófagos derivados de médula ósea (151). La activación de arginasa mediada por CpG-ODN+IFN- γ presenta las siguientes características:

- Es específica de la secuencia CG y dependiente de la maduración/acidificación de los endosomas, características típicas de la activación a través del TLR9.
- Ocurre junto a la inducción de iNOS.
- Es dependiente de IFN- γ pero sería independiente de un efecto autócrino de IL-10.

- Es dependiente de la activación de las MAPK p38 y ERK pero no de JNK.

Posteriormente demostramos que el tratamiento *in vivo* de ratones jóvenes BALB/c con CpG-ODN emulsionado en el Adyuvante incompleto de Freund, IFA, (del inglés *Freund's Incomplete Adjuvant*) resulta en la generación de una respuesta inmunoreguladora caracterizada por un aumento en la actividad de arginasa y reducción de la proliferación de los linfocitos T en el bazo de estos ratones. Además, este efecto sobre la proliferación de los linfocitos T se correlaciona con la disminución en los niveles de la subunidad ζ del CD3 en el complejo TCR-CD3. Los bazos de los ratones tratados con CpG-ODN+IFA se observaron aumentados en tamaño y con alteraciones histológicas, reflejado en la pérdida de la arquitectura normal, y cambios numéricos en las poblaciones celulares comparados a los bazos de los ratones no tratados. Todos estos cambios se correlacionaron con una gran acumulación de células de linaje mieloide que co-expresan los Gr1 y CD11b. Las células CD11b⁺Gr1⁺ presentes en el bazo de los ratones tratados con CpG-ODN+IFA son una población de fenotipo heterogéneo, de origen mieloide. Funcionalmente estas células presentan actividad de la enzima arginasa y habilidad para manipular el metabolismo de L-arginina. De esta forma, suprimen la proliferación de los linfocitos T, es decir que poseen un papel regulador de la respuesta inmune (80).

Todos estos datos aportan solidez a favor de un papel contra-regulador de CpG-ODN *in vivo*. A partir de estos antecedentes, en este trabajo de tesis

hemos decidido evaluar la respuesta inmunoreguladora que se genera en ratones viejos luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA, y caracterizar las células que podrían mediar en esta respuesta.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto inmunomodulador de CpG-ODN en el envejecimiento en relación a la expansión de células mieloides supresoras (MDSC).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar fenotípicamente las células mieloides supresoras en ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA.
2. Evaluar la función supresora de las células mieloides de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA a través de la inducción de la enzima arginasa.
3. Evaluar la duración de la expansión de las células mieloides supresoras en ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA
4. Estudiar la función supresora de las de MDSC derivadas de médula ósea de ratones jóvenes y viejos luego del estímulo in vitro con CpG-ODN y CpG-ODN+IFN- γ .

RESULTADOS

CAPÍTULO I

***CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MIELOIDES EN
RATONES VIEJOS TRATADOS CON CpG-ODN+IFA***

MODELO DE ENVEJECIMIENTO

El estudio del envejecimiento en seres humanos es complicado por varios motivos, entre ellos cuestiones éticas, el largo período natural de vida, influencias ambientales y otros factores limitantes. Además, el estudio del envejecimiento en el sistema inmune en humanos ha conducido a resultados discrepantes, esto puede ser por una parte debido a que los donantes puedan tener alguna patología de base que influya en la respuesta inmune y de allí, en los resultados de la investigación. Por esto, es de gran importancia que para el estudio del sistema inmune en el envejecimiento éste se independice de la influencia de enfermedades y del uso de medicación. Existe un protocolo de uso internacional, el SENIEUR, que designa como jóvenes a personas entre 25 y 34 años y ancianas a aquellas con más de 65 años. Este protocolo utiliza tantos criterios de exclusión para limitar los estudios a los individuos más sanos, que un porcentaje mayor del 85% de la población de ancianos queda fuera de los estudios. Luego, los pocos individuos ancianos seleccionados de acuerdo a dichos estrictos criterios deben ser considerados como referencia de toda una población (152).

Se han desarrollado varios modelos animales para estudiar las bases fisiológicas y patologías relacionadas al envejecimiento. Estos modelos animales deben tratar de imitar los cambios fisiológicos que ocurren en los organismos, controlando influencias intrínsecas y extrínsecas. Los modelos que emplean mamíferos como los roedores, aunque tengan un tiempo de vida más corto que los humanos, pueden ser modificados genéticamente y son buenos para estudiar

el envejecimiento (153). Aunque los ratones difieren de los humanos en algunos aspectos, son bastantes similares en numerosos aspectos fisiológicos, funcionales y aunque en menor grado también anatómicos. Los sistemas inmunológicos, músculo-esquelético, endócrino y digestivo de ratones y humanos son similares tanto en su arquitectura como en su función (153). Adicionalmente, el estudio en ratones permite controlar estrictamente su base genética, dieta, estado de salud y del ambiente en el que se encuentran; además los tejidos de estos animales pueden ser analizados en todas las etapas del proceso de envejecimiento (154).

En nuestro laboratorio utilizamos como modelo experimental de envejecimiento ratones hembra BALB/c de 18 a 20 meses de edad y como controles ratones jóvenes de 2 a 3 meses de edad (151, 155-156).

Estudio de células mieloides CD11b⁺Gr1⁺ en órganos y tejidos de ratones viejos

En estos últimos años recién está emergiendo información acerca de las MDSC y su rol en el envejecimiento, pero aún son escasos los trabajos que han sido publicados sobre el tema.

En primer lugar nos propusimos determinar si los ratones viejos de nuestro bioterio presentaban elevada proporción de células mieloides con fenotipo CD11b⁺Gr1⁺ en los distintos órganos y tejidos linfáticos con respecto a animales jóvenes. Obtuvimos sangre, médula ósea y bazo de ratones BALB/c de

ambas edades y por análisis de citometría de flujo observamos que el porcentaje de células CD11b⁺Gr1⁺ se encontraba incrementado tanto en sangre como en médula ósea de los animales viejos (Fig. 1 A-B). Asimismo, observamos mayor porcentaje y número absoluto de células mieloides en el bazo de estos ratones (Fig. 1C)

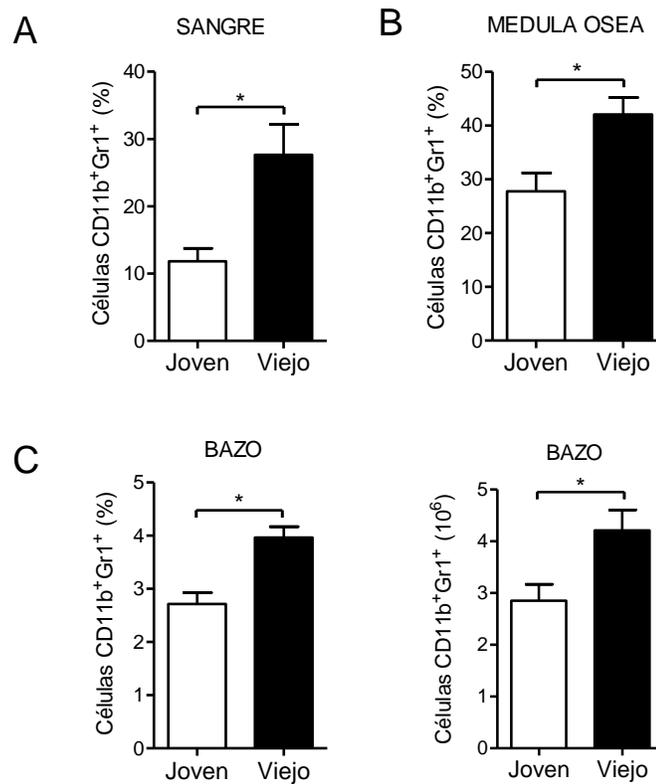


FIGURA 1. Células mieloides CD11b⁺Gr1⁺ en sangre, médula ósea y bazo de ratones BALB/c viejos.

Células de ratones jóvenes y viejos fueron teñidas con los anticuerpos anti-CD11b y anti-Gr1 y analizadas mediante citometría de flujo. (A) Porcentaje de células CD11b⁺Gr1⁺ en sangre y (B) médula ósea. (C) Porcentaje (izquierda) y número absoluto (derecha) en bazo. Los datos están presentados como promedio \pm SEM (n=4ratones/grupo) y son representativos de 3 experimentos independientes. *p<0,05. Los valores de *p* fueron calculados utilizando la prueba t de Student.

Adicionalmente analizamos el porcentaje de células mieloides en el bazo de ratones viejos de la cepa C57BL/6 y también observamos un aumento en el porcentaje de células con fenotipo CD11b⁺Gr1⁺ con respecto a los jóvenes (Fig. 2). Sin embargo en esta cepa se observa relativamente menor porcentaje de células mieloides a ambas edades que en la cepa BALB/c. Por esta razón decidimos continuar nuestros estudios en ratones BALB/c.

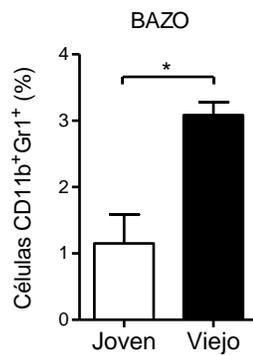


FIGURA 2. Células mieloides CD11b⁺Gr1⁺ en bazo de ratones viejos C57BL/6.

Se obtuvieron esplenocitos de ratones jóvenes y viejos, y se tiñeron con los anticuerpos anti-CD11b y anti-Gr1. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo y se muestra el porcentaje de células CD11b⁺Gr1⁺. Los datos están presentados como promedio±SEM (n=4ratones/grupo) y son representativos de 2 experimentos independientes. *p<0,05. Los valores de *p* fueron calculados utilizando la prueba t de Student

Evaluación de apoptosis espontánea de células mieloides de ratones viejos

Aunque la elevada proporción de células mieloides CD11b⁺Gr1⁺ en el bazo de ratones viejos puede estar asociada a que durante el envejecimiento el

potencial de diferenciación celular se encuentra desviado hacia el linaje mieloide, nosotros pensamos que este incremento también podría estar relacionado a un aumento de la vida media de estas células en animales envejecidos, similar a lo que sucede en otras células del sistema inmune (157). Para resolver esta pregunta, esplenocitos de ratones jóvenes y viejos normales fueron cultivados en medio suplementado durante 18 horas sin estímulo, al cabo de ese tiempo mediante la técnica de dilución de TMRE se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de apoptosis espontánea de estas células. Como se puede observar en la Figura 3, se detectó un menor porcentaje de células mieloides de ratones viejos en estado de apoptosis (en el gate de TMRE^{low}) que las de ratones jóvenes (Fig. 3 A-B). Estos experimentos fueron realizados a tiempos más cortos (6hs), y se obtuvieron resultados similares (no mostrado). Estos resultados denotan que la mayor resistencia a la apoptosis espontánea que tienen las células mieloides de ratones viejos, podría ser una de las razones por las que estas células se encuentran aumentadas en los distintos órganos y tejidos de estos animales. Aunque se requieren estudios complementarios para terminar de confirmar esta hipótesis.

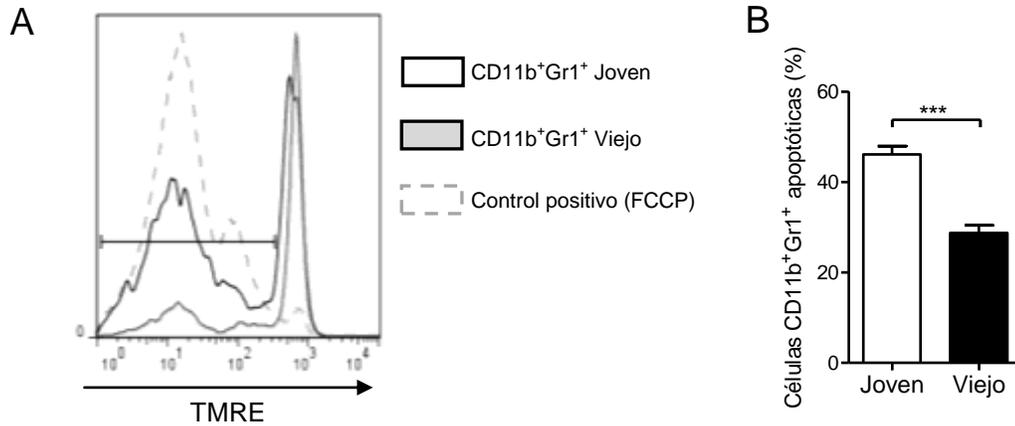


FIGURA 3. Apoptosis espontánea de células CD11b+Gr1+ de ratones viejos.

Se obtuvieron esplenocitos de ratones jóvenes y viejos y luego de 18hs en cultivo sin estímulo, se tiñeron con anticuerpos anti-CD11b, anti-Gr1 y TMRE y se analizaron por citometría de flujo. (A) Histograma representativo de la dilución de TMRE en la región de células CD11b+Gr1+. (B) Porcentaje de células CD11b+Gr1+ apoptóticas (TMRE^{low}). Células incubadas con FCCP fueron usadas como control positivo. Datos representativos de 2 experimentos independientes, promedio±SEM (n=4 ratones/grupo) ***p<0,001. Los valores de *p* fueron calculados utilizando la prueba t de Student

Estudio del número de células mieloides en ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA

Como mencionamos antes, hemos demostrado que la administración de CpG-ODN+IFA por vía s.c. en ratones jóvenes, induce una acumulación en el bazo de células mieloides de fenotipo heterogéneo, caracterizadas por la expresión de CD11b+Gr1+.

A fin de evaluar si un estímulo inflamatorio como CpG-ODN+IFA era capaz de inducir la expansión de la población de células mieloides en el bazo de

ratones viejos de manera similar a lo que sucedía en jóvenes, se trataron ratones de ambas edades con CpG-ODN+IFA. Al cabo de 10 días se obtuvieron los esplenocitos y por citometría de flujo se evaluó el número de células CD11b⁺Gr1⁺. Como se observa en la Figura 4, luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA se produce un incremento tanto del porcentaje (Fig. 4 A-B), como del número absoluto (Fig. 4 C) de células mieloides en ratones viejos. Como vimos anteriormente, basalmente el bazo de los ratones viejos posee una mayor proporción de células mieloides que el de jóvenes (Fig. 1C). Luego de la inyección CpG-ODN+IFA los números de estas células llegan a niveles similares en ambas edades, con lo que la expansión de células mieloides en ratones viejos 10 días después del tratamiento con CpG-ODN+IFA es menor que en sus contrapartes jóvenes (Fig. 4D).

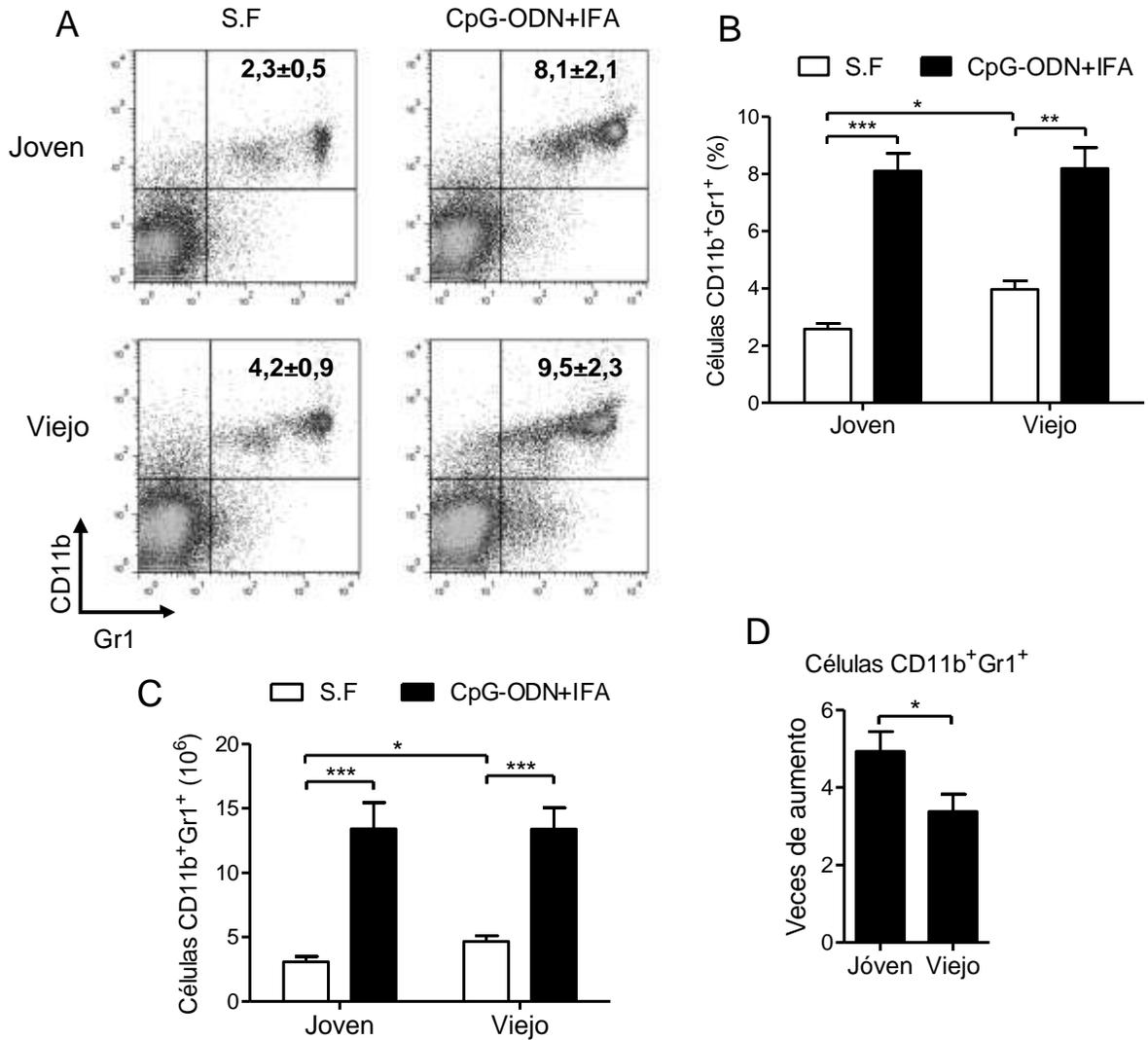


FIGURA 4. Células mieloides CD11b⁺Gr1⁺ en el bazo de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA.

Luego de 10 días del tratamiento con CpG-ODN+IFA se obtuvieron esplenocitos de ratones jóvenes y viejos y se tiñeron con los anticuerpos anti-CD11b y anti-Gr1. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo. (A) Gráfico Dot plot representativo de células CD11b⁺Gr1⁺, (B) porcentaje y (C) número absoluto células CD11b⁺Gr1⁺ en el bazo. (D) Veces de incremento de células CD11b⁺Gr1⁺ luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA. Los datos están presentados como promedio±SEM (n=4ratones/grupo) representativos de 3 experimentos independientes. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Los valores de p fueron calculados utilizando en (B-C) la prueba de ANOVA de 2 vías seguido del post-test de Bonferroni y en (D) la prueba t de Student.

Análisis del fenotipo de las células mieloides de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA

Debido a que las MDSC son un conjunto fenotípicamente heterogéneo de células mieloides con función supresora, han sido utilizadas varias moléculas de superficie para identificarlas mejor.

A fin de caracterizar a las células mieloides que se acumulan en el bazo de ratones envejecidos 10 días luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA, células CD11b⁺Gr1⁺ fueron analizadas por citometría de flujo para evaluar la expresión de CD31, un marcador de célula mieloides inmadura, CD124, PDL-1 y PDL-2 ambos ligandos de PD1 (una molécula coestimuladora que juega un rol inhibitorio en la regulación de la activación de células T en la periferia), MHC clase II y la molécula coestimuladora CD86. Como se puede observar en la Figura 5, las células mieloides provenientes de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA presentaron mayor expresión de CD124 y CD31, así como una reducción en la expresión de MHC clase II con respecto a células provenientes de ratones tratados con solución fisiológica (Fig. 5). Por el contrario, los niveles de expresión de CD86, PD-L1 y PD-L2 en células mieloides de ambos grupos de ratones no presentaron diferencias significativas (Fig. 5). Con respecto a los niveles de expresión de PD-L1 y PD-L2, Youn y colaboradores indicaron que estas moléculas no estarían directamente relacionadas con la función supresora de las MDSC (60). En resumen, el análisis de las células mieloides CD11b⁺Gr1⁺ que se expanden en el bazo de ratones viejos al administrarles CpG-ODN+IFA

refleja que tienen características de células inmaduras con un fenotipo similar al de las células mieloides supresoras (MDSC) encontradas en animales con tumor (60).

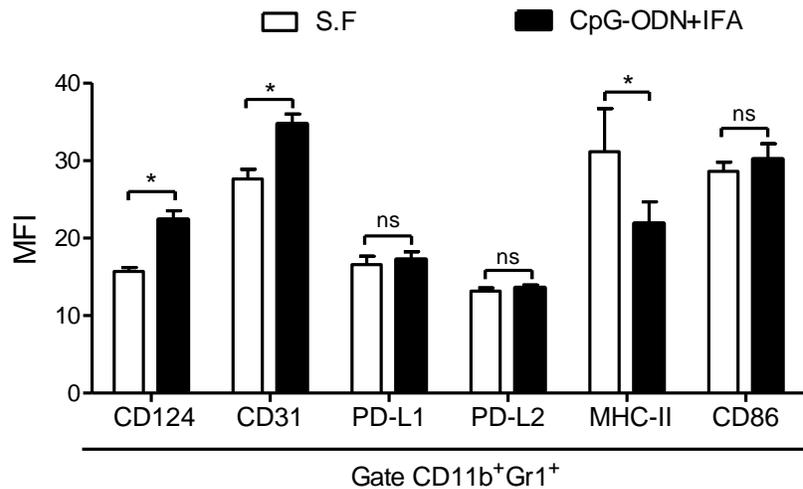


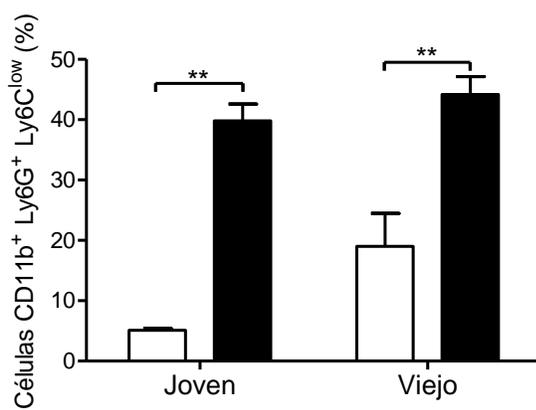
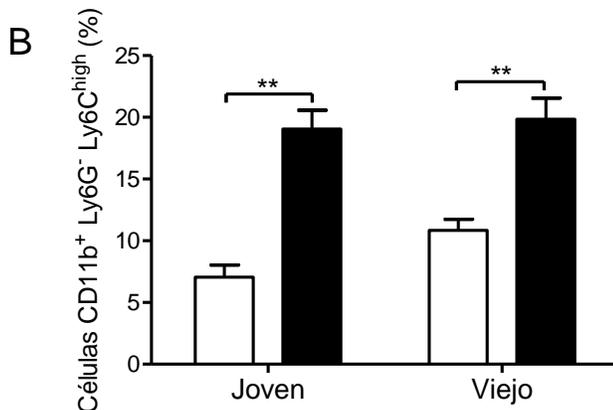
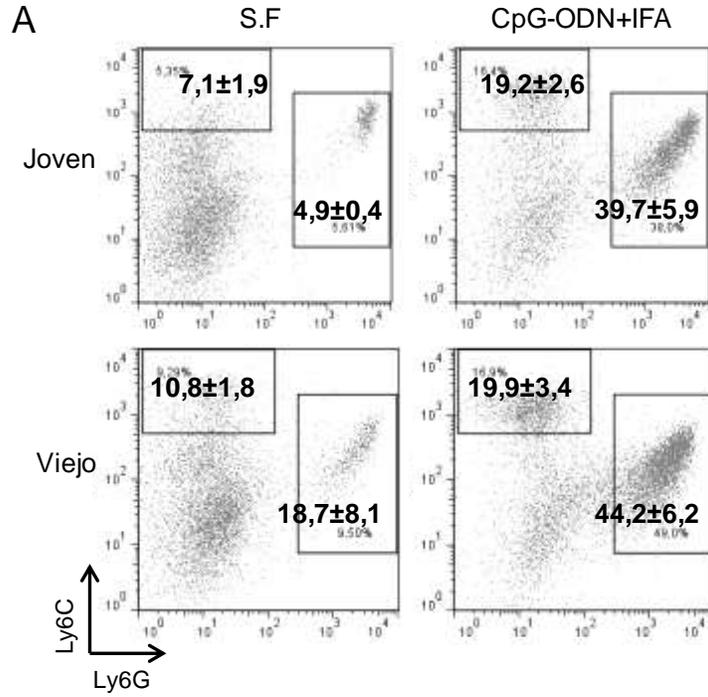
FIGURA 5. Expresión de marcadores de fenotipo en células mieloides CD11b⁺Gr1⁺ de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA.

Diez días luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA se obtuvieron esplenocitos, se tiñeron con anti-CD11b, anti-Gr1, anti-CD124, anti-CD31, anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-MHC-II, y anti-CD86 y luego fueron analizadas por citometría de flujo. Se representa Intensidad de Fluorescencia Media (MFI) para cada una de las moléculas en la población CD11b⁺Gr1⁺. Los datos se representan como promedio±SEM de 3 experimentos independientes (n=4ratones/grupo). *p<0,05. Los valores de *p* fueron calculados utilizando la prueba de ANOVA de 2 vías seguido del post-test de Bonferroni.

Análisis de las subpoblaciones de células mieloides expandidas por CpG-ODN+IFA en ratones viejos

Reportes recientes de estudios en ratones han indicado que las MDSC pueden ser divididas en 2 subpoblaciones basándonos en la expresión de los

dos epitopes a los que se unen los anticuerpos específicos para Gr1: Ly6G y Ly6C. La subpoblación granulocítica presenta fenotipo CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low} mientras que la monocítica presenta fenotipo CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high}. Con el objetivo de determinar qué población era la que se encontraba involucrada en la expansión de estas células en bazo de ratones viejos luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA, se analizaron por citometría de flujo esplenocitos obtenidos de ratones jóvenes y viejos 10 días después del tratamiento. Observamos que tanto la población granulocítica como la monocítica se encontraban aumentadas en el bazo de animales viejos, sin embargo la granulocítica fue la población que presentó mayor aumento (Fig. 6 A-B). Resultados similares fueron observados en células provenientes de ratones jóvenes tratados (Fig. 6 A-B). Cabe destacar que en los ratones jóvenes ambos subgrupos de células mieloides mostraron un mayor incremento con respecto a sus contrapartes envejecidas luego del tratamiento, esto se debe a que como habíamos demostrado anteriormente, los ratones viejos presentan mayor número de estas células antes del tratamiento (Fig. 6C).



□ S.F ■ CpG-ODN+IFA

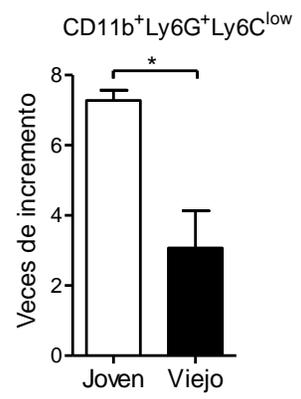
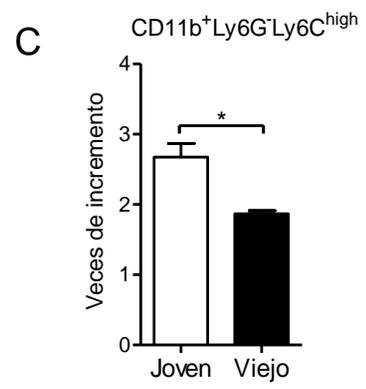


FIGURA 6. Análisis de las subpoblaciones de células mieloides en ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA.

Luego de 10 días del tratamiento con CpG-ODN+IFA se obtuvieron los esplenocitos de ratones jóvenes y viejos y se tiñeron con anti-CD11b, anti-Ly6C y anti-Ly6G. Las células se analizaron por citometría de flujo. (A) Dot plot representativo y (B) porcentaje de células CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{high} (monocíticas) y CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low} (granulocíticas). (C) Se representa las veces de incremento del % de cada subpoblación luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA para ambas edades. Los datos se presentan como promedio±SEM representativo de 3 experimentos independientes (n=4ratones/grupo) *p<0,05; **p<0,01. Los valores de *p* fueron calculados utilizando en (B) la prueba de ANOVA de 2 vías seguido del post-test de Bonferroni y en (C) la prueba de t de Student.

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO I

En este primer capítulo se demostró que las células mieloides CD11b⁺Gr1⁺ se encuentran aumentadas en sangre, bazo y médula ósea de ratones viejos normales. Además, observamos que las células mieloides del bazo de ratones viejos tienen una mayor resistencia a la apoptosis espontánea.

Luego de un estímulo inflamatorio, como CpG-ODN+IFA, la población de células CD11b⁺Gr1⁺ se expande en el bazo de ratones viejos. El análisis de esta población celular nos permitió determinar que presentan una mayor expresión de CD124 y CD31, y menor expresión de MHC-II con respecto a sus contrapartes tratadas con solución fisiológica, concluyendo que estas células presentan un fenotipo característico de MDSC. Tanto la subpoblación monocítica como la granulocítica componen el conjunto de células mieloides expandidas en ratones viejos CpG-ODN+IFA, siendo la granulocítica la que presenta mayor incremento luego del tratamiento, como sucede en jóvenes.

CAPÍTULO II

***ESTUDIO DE LA FUNCIÓN SUPRESORA DE LAS
CÉLULAS MIELOIDES DE RATONES VIEJOS
TRATADOS CON CpG-ODN+IFA***

Evaluación de la actividad supresora de las células mieloides de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA

Como mencionamos anteriormente, la principal característica de las MDSC es su actividad supresora sobre la proliferación de las células T. Por esto nos preguntamos si las células mieloides que se expanden en ratones viejos luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA eran capaces de suprimir la proliferación de células T. Para responder esta pregunta, luego de 10 días del tratamiento de ratones jóvenes y viejos con CpG-ODN+IFA o solución fisiológica (S.F) se obtuvo el bazo y los esplenocitos totales se cultivaron con Concanavalina A (Con A), un mitógeno capaz de estimular células T de ratones. Luego de 72 hs de cultivo observamos que los esplenocitos de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA presentaban menor proliferación que los que provenían de los ratones tratados con solución fisiológica (Fig. 7). Los niveles de supresión en cultivos de ratones viejos eran similares a los de sus contrapartes jóvenes. Sin embargo, como ha sido establecido por numerosos autores, entre los defectos de la función inmune relacionados al envejecimiento se encuentra el deterioro de respuesta proliferativa de los linfocitos T (158). De acuerdo con esto, nuestros resultados muestran menor nivel de proliferación de las células T de animales viejos tratados con solución fisiológica respecto a los de sus contrapartes jóvenes (Fig. 7).

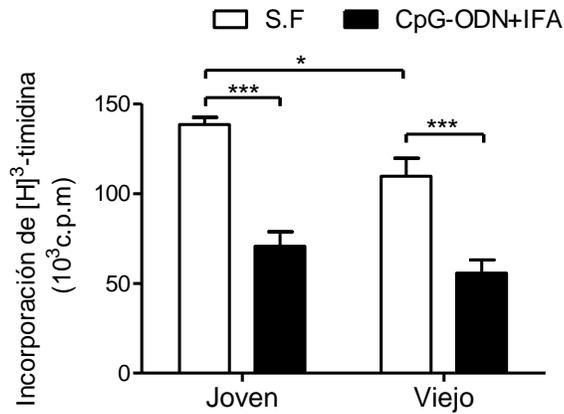


FIGURA 7. Respuesta proliferativa de esplenocitos de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA.

Esplenocitos de ratones jóvenes y viejos, tratados 10 días antes con solución fisiológica (S.F) o CpG-ODN+IFA fueron cultivados con medio o Con A (5µg/ml) por triplicado, durante 72 hs. Dieciocho hs antes de la recolección se agregó [³H]-Timidina (1µCi/pocillo). La incorporación de timidina se midió en un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresan en cuentas por minuto (c.p.m) bajo la estimulación con Con A menos c.p.m basal. Los datos representan el promedio±SEM de los resultados de 3 experimentos independientes (n=4ratones/grupo). *p<0,05; ***p< 0,001. Los valores de *p* fueron calculados utilizando la prueba de ANOVA de 2 vías seguido del post-test de Bonferroni.

Posteriormente analizamos si la menor respuesta proliferativa de los esplenocitos provenientes de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA con respecto a sus controles tratados con solución fisiológica estaba dada por la expansión de células mieloides supresoras en el bazo de estos ratones. Para resolver esta cuestión, se purificaron las células mieloides del bazo de los ratones tratados con CpG-ODN+IFA y se co-cultivaron con células T previamente activadas con anti-CD3/anti-CD28. En todos los co-cultivos las células T utilizadas como “respondedoras” fueron obtenidas de ratones BALB/c singénicos normales jóvenes para descartar defectos relacionados al

envejecimiento en estas células. En la Figura 8 se puede observar que los linfocitos T co-cultivados con las células mieloides purificadas de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA proliferan menos que los que estuvieron en contacto con las células de ratones viejos inyectados con solución fisiológica. De esta manera podemos confirmar que estas células son capaces de suprimir la proliferación de los linfocitos T, por lo que podemos llamarlas MDSC. De acuerdo a los niveles de proliferación hallados también podemos remarcar que la capacidad supresora por célula de las MDSC provenientes de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA es similar a la de sus contrapartes jóvenes (Fig. 8).

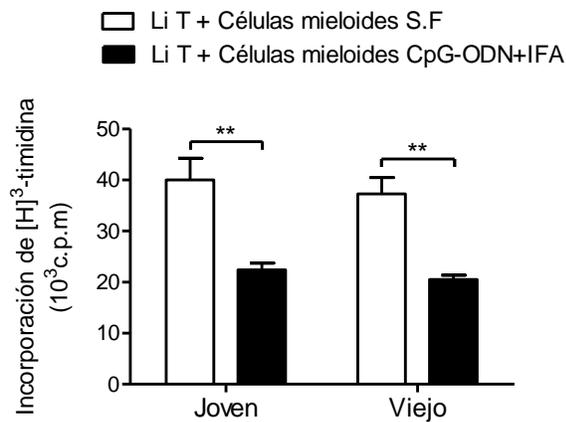


FIGURA 8. Función supresora de células mieloides de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA.

Se purificaron células mieloides CD11b⁺ del bazo de ratones jóvenes y viejos, tratados 10 días antes con solución fisiológica (S.F) o CpG-ODN+IFA y se co-cultivaron (relación 1:1) durante 48hs con linfocitos T (Li T) CD90⁺ purificados de ratones jóvenes normales previamente activadas con antiCD3/CD28. Dieciocho horas antes de la recolección se agregó [³H]-Timidina (1μCi/pocillo). La incorporación de timidina se midió en un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresan en cuentas por minuto (c.p.m) bajo la estimulación con anti-CD3/CD28 menos c.p.m basal. Los datos representan el promedio±SEM de los resultados de 3

experimentos independientes (n=4ratones/grupo). **p<0,01. Los valores de *p* fueron calculados utilizando la prueba de ANOVA de 2 vías seguido del post-test de Bonferroni.

Evaluación del metabolismo de L-arginina

Como hemos mencionado anteriormente, existe una estrecha correlación entre la disponibilidad de L-arginina y la regulación de la proliferación de los linfocitos T (100). El aumento del metabolismo de este aminoácido en MDSC puede resultar en el deterioro de la respuesta de linfocitos T ya que ambas enzimas implicadas en este proceso, iNOS y arginasa, tienen un alto potencial para suprimir ciertas funciones de estas células.

A fin de estudiar las vías implicadas en el metabolismo de L-arginina, en primer lugar evaluamos los niveles de óxido nítrico (indirectamente como nitritos), como indicador de la actividad de iNOS, en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos provenientes de ratones viejos tratados 10 días antes con CpG-ODN+IFA o solución fisiológica. En los cultivos provenientes de ratones viejos tratados detectamos mayores niveles de nitritos con respecto a los que provenían de ratones inyectados con solución fisiológica. La concentración de nitritos en sobrenadantes de cultivo de ratones viejos fue similar al observado en el de jóvenes (Fig. 9).

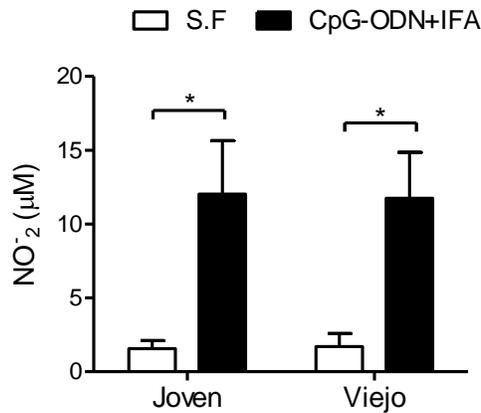


FIGURA 9. Producción de ON en cultivo de esplenocitos de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA.

Se obtuvieron esplenocitos de ratones jóvenes y viejos luego de 10 días del tratamiento con S.F o CpG-ODN+IFA y se cultivaron con medio o Con A (5 µg/mL) por 72 hs. En los sobrenadantes se determinó la concentración de ON por el método colorimétrico de Griess. Los resultados se expresan como concentración de ON bajo la estimulación con Con A menos la basal. Estos datos representan el promedio±SEM de los resultados obtenidos en 3 experimentos independientes (n=3ratones/grupo). *p< 0,05. Los valores de *p* fueron calculados utilizando la prueba de ANOVA de 2 vías seguido del post-test de Bonferroni.

Nuestro próximo objetivo fue evaluar la vía de arginasa en los esplenocitos de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA. Como se puede observar en la Figura 10, la actividad de arginasa en lisados de esplenocitos provenientes de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA se encuentra significativamente aumentada con respecto a la de esplenocitos de animales tratados con solución fisiológica, alcanzando niveles similares a los de esplenocitos de ratones jóvenes con igual tratamiento (Fig. 10).

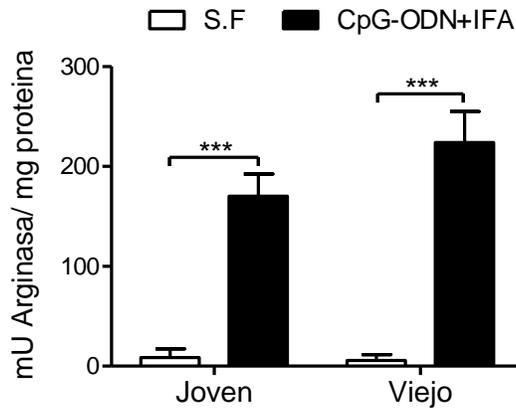


FIGURA 10. Actividad de arginasa en esplenocitos de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA.

Se obtuvieron esplenocitos de ratones jóvenes y viejos tratados 10 días antes con solución fisiológica (S.F) o CpG-ODN+IFA y se cultivaron con medio o Con A (5 µg/ml) por 72 hs, luego las células fueron lisadas para determinar la actividad de arginasa por el método colorimétrico descrito por Corraliza y colaboradores (159). Los resultados se expresan como la actividad bajo la estimulación con Con A menos la actividad basal. Se grafica mU de actividad de la enzima normalizados de acuerdo al contenido proteico del lisado respectivo. Los datos representan el promedio±SEM de 4 experimentos independientes (n= 4 por grupo). ***p< 0,001. Los valores de *p* fueron calculados utilizando la prueba de ANOVA de 2 vías seguido del post-test de Bonferroni.

Complementariamente se analizó el perfil de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de ratones tratados con CpG-ODN+IFA. Como se muestra en la Figura 11, se detectó un incremento de IFN-γ en esplenocitos de ratones jóvenes y viejos tratados (Fig. 11 A). Con respecto a la secreción de IL-10, esta sigue un patrón diferente según la edad de los ratones; en los cultivos de esplenocitos de ratones viejos tratados se observa una disminución de los niveles de IL-10 con respecto a sus controles solución fisiológica; en cambio, en los cultivos de esplenocitos de animales jóvenes se presenta la situación inversa ya que IL-10 aumenta luego del tratamiento (Fig.

11 B). Observamos aumentados niveles de IL-6 en cultivos de esplenocitos de ratones jóvenes después del tratamiento con CpG-ODN+IFA, pero no hallamos diferencias significativas en los de ratones viejos. Sin embargo es interesante señalar que los niveles de IL-6 en cultivos de esplenocitos de animales viejos normales (solución fisiológica), es mayor que en sus contrapartes jóvenes, probablemente debido al estado inflamatorio basal asociado al envejecimiento (Fig. 11 C). Por último, la secreción de IL-4 solo se halló aumentada en esplenocitos de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA (Fig. 11 D).

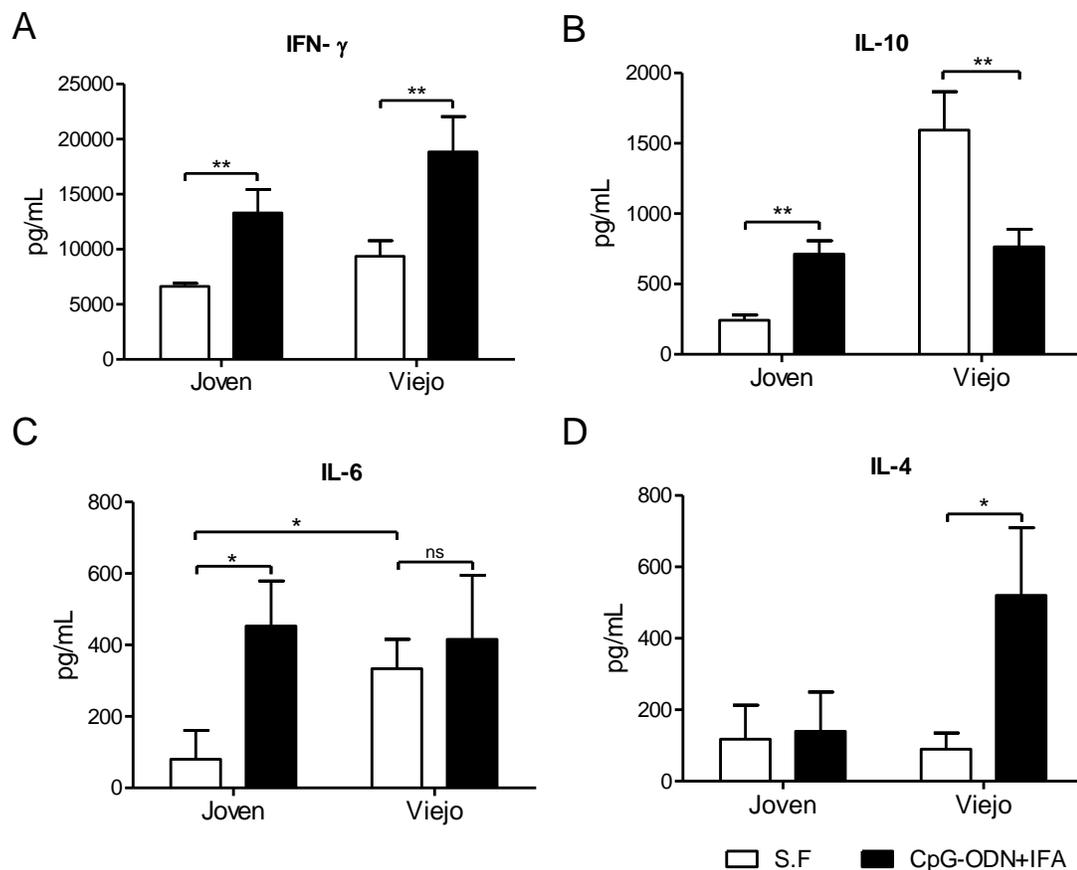


FIGURA 11. Perfil de citoquinas en sobrenadantes de esplenocitos de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.

Se obtuvieron esplenocitos de ratones jóvenes y viejos tratados 10 días previos con solución fisiológica (S.F) o CpG-ODN+IFA y se cultivaron con medio o Con A (5 µg/ml) por 72 hs y luego se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo donde se midió IFN-γ, IL-10, IL-4 e IL-6 por ELISA de captura. Los resultados se expresan como la concentración de cada citoquina bajo la estimulación con Con A menos la concentración basal. Los datos representan el promedio±SEM de 3 experimentos independientes (n=4/ grupo). *p< 0,05; **p<0,01.

Evaluación de la actividad y expresión de arginasa en las células mieloides de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA

En los estudios realizados en ratones jóvenes tratados con CpG-ODN+IFA, arginasa era la enzima principalmente comprometida en la función inmunoreguladora de las MDSC, que suprimían la proliferación de las células T.

Con el objetivo de evaluar si el incremento de actividad de arginasa observado en los esplenocitos de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA reflejaba la inducción de esta enzima en la población de MDSC o si habían otras poblaciones celulares involucradas, se purificaron las células mieloides de ratones tratados y de sus controles (solución fisiológica) y se co-cultivaron con células T activadas. Al cabo de 48hs de co-cultivo se determinó la actividad de arginasa en los lisados celulares. Observamos que las células mieloides provenientes de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA incrementaban significativamente la actividad de arginasa con respecto a sus contrapartes tratadas con solución fisiológica, alcanzando niveles similares a los de las MDSC

purificadas de ratones jóvenes. Como control, se co-cultivaron linfocitos T con la fracción de células CD11b⁻ de los bazo de ratones viejos CpG-ODN+IFA (es decir el resto de los esplenocitos sin células mieloides) y no se detectó actividad de arginasa en los lisados de estas células. Estos resultados sugieren que la actividad de arginasa observada en los esplenocitos de los ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA se debe a su inducción en las MDSC (Fig. 12).

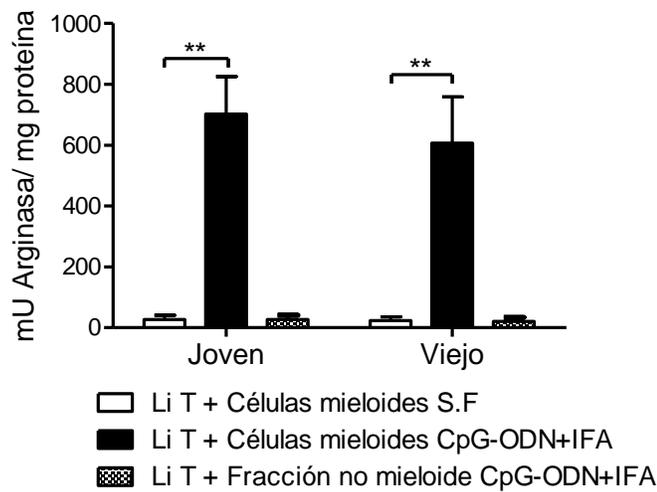


FIGURA 12. Actividad de arginasa en células mieloides purificadas de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.

Se purificaron células mieloides CD11b⁺ del bazo de ratones jóvenes y viejos tratados 10 días antes con solución fisiológica (S.F) o CpG-ODN+IFA y se co-cultivaron (relación 1:1) durante 48hs con linfocitos T (Li T) CD90⁺ purificados de ratones jóvenes normales, activadas con antiCD3/CD28. Luego se realizaron lisados celulares para determinar la actividad de arginasa. Como control, la fracción negativa de esplenocitos de ratones tratados con CpG-ODN+IFA también se co-cultivaron con Li T (Fracción no mioide). Los resultados se expresan como la actividad bajo estimulación menos la actividad basal. Se grafica mU de actividad de la enzima normalizados de acuerdo al contenido proteico del lisado respectivo. Los datos representan el promedio±SEM de 3 experimentos independientes (n= 4 por grupo). **p<0,01. Los valores de *p* fueron calculados utilizando la prueba de ANOVA de 2 vías seguido del post-test de Bonferroni.

Posteriormente para completar este análisis, nos propusimos investigar si el aumento de actividad de la enzima arginasa en las células mieloides de animales viejos tratados con CpG-ODN+IFA (así como en las de jóvenes) se correlacionaba con una inducción de su expresión proteica en estas células. Por lo tanto mediante ensayos de citometría de flujo, determinamos la expresión intracelular de la proteína arginasa I en las células mieloides provenientes de ratones viejos luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA. Para esto, esplenocitos fueron cultivados durante 48hs con Con A y al cabo de ese tiempo se tiñeron para las marcas de superficie, con los anticuerpos anti-Gr1 y anti-CD11b y posteriormente se fijaron y permeabilizaron las células para luego teñirlas con el anticuerpo anti-arginasa I. En la Figura 13 se observa un aumento de la expresión de la enzima en estudio en células provenientes de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA, respecto a sus contrapartes solución fisiológica, representados mediante la intensidad de fluorescencia media (MFI). Sin embargo, las células mieloides de ratones viejos control (solución fisiológica) expresaron mayores niveles de arginasa que sus contrapartes jóvenes, con lo cual el aumento de expresión de esta enzima es menor con respecto al observado en las de jóvenes (Fig. 13)

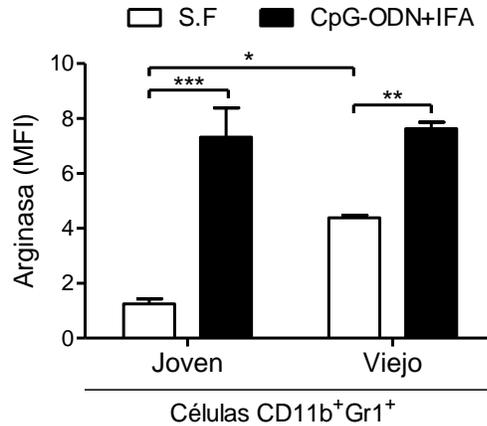


FIGURA 13. Expresión de arginasa I en células mieloides de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.

Se obtuvieron esplenocitos de ratones jóvenes y viejos tratados 10 días previos con solución fisiológica (S.F) o CpG-ODN+IFA y se cultivaron con medio o Con A (5 µg/ml) por 48 hs, luego las células fueron teñidas con los anticuerpos de superficie anti-CD11b y anti-Gr1, fijadas, permeabilizadas y teñidas intracelularmente con anti-Arginasa I. Los resultados se expresan como intensidad media de fluorescencia (MFI) de Arginasa en la población de células CD11b+Gr1+. Los datos representan el promedio±SEM de 3 experimentos independientes (n= 4 por grupo). *p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001. Los valores de *p* fueron calculados utilizando la prueba de ANOVA de 2 vías seguido del post-test de Bonferroni.

A continuación nos propusimos evaluar si las células mieloides de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA, que presentan alta actividad de arginasa podrían depletar L-arginina del microambiente, siendo este al menos uno de los mecanismos responsables de la supresión de la proliferación de las células T. Con este objetivo, realizamos co-cultivos de células mieloides purificadas de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA con linfocitos T previamente activados con anti-CD3/anti-CD28 en los que agregamos un inhibidor potente y selectivo de arginasa denominado nor-NOHA (160). Como puede observarse en

la Figura 14, el inhibidor restableció los niveles de proliferación en los co-cultivos con células mieloides de los ratones viejos CpG-ODN+IFA. Con estos resultados, y teniendo en cuenta que la restauración de la proliferación con el agregado del Nor-NOHA fue casi completa, podemos sugerir que arginasa es el principal mecanismo supresor activado en las células mieloides de los ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA, aunque no podemos descartar la existencia de otros mecanismos supresores activados en estas células (Fig. 14).

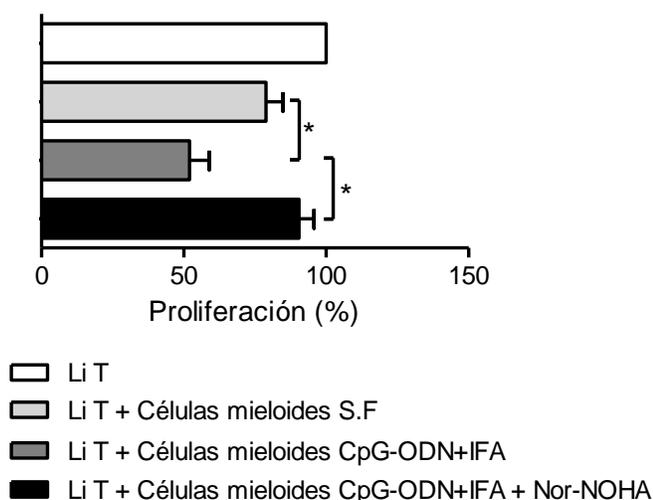


FIGURA 14. Inhibición de arginasa en co-cultivos de células mieloides de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA.

Se purificaron células mieloides CD11b⁺ del bazo de ratones jóvenes y viejos tratados 10 días antes con solución fisiológica (S.F) o CpG-ODN+IFA y se co-cultivaron (relación 1:1) durante 48hs con linfocitos T (Li T) CD90⁺ purificados de ratones jóvenes normales previamente activadas con antiCD3/CD28. En algunos pocillos se agregó el inhibidor de arginasa, nor-NOHA. Dieciocho hs antes de la recolección se agregó [³H]-Timidina (1μCi/pocillo). La incorporación de timidina se midió en un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresan como porcentaje (%) de proliferación en relación con el % de proliferación de Li T solos activados (que representan el 100% de proliferación). Los datos representan el promedio±SEM de los

resultados de 2 experimentos independientes (n=4ratones/grupo). *p<0,05. Los valores de p fueron calculados utilizando la prueba de ANOVA de una vía seguido del post-test de Bonferroni.

Estudio del mecanismo de inducción de arginasa en MDSC de ratones jóvenes y viejos tratados con CpG-ODN+IFA

Las MDSC pueden ser activadas en respuesta a señales del microambiente en el que se encuentran. Estos factores que son secretados principalmente por células T activadas y/o células del estroma tumoral y su secreción generalmente es inducida por diferentes productos virales, bacterianos o como resultado de la muerte de células tumorales. Entre estos factores podemos mencionar IL-4, e IL-6. Estas citoquinas activan diferentes vías de señalización en las MDSC que involucran STAT6 y STAT3 respectivamente (55).

Evaluación de la vía STAT6- IL-4

Ha sido establecido que la vía de activación de STAT-6 por IL-4 induce la expresión de arginasa-I en MDSC (55). A fin de evaluar si la activación de STAT6 se encontraba involucrada en la inducción de arginasa en las células mieloides de ratones jóvenes y viejos tratados con CpG-ODN+IFA analizamos los niveles de activación de STAT6 en estas células. Estos estudios fueron realizados paralelamente en las células mieloides provenientes de ratones jóvenes y viejos tratados con CpG-ODN+IFA ya que en jóvenes esto no se encontraba aún estudiado. Se realizó una cinética a distintos tiempos de co-cultivo de células mieloides con linfocitos T y mediante citometría de flujo intracelular se

analizaron los niveles de STAT6 fosforilado (pSTAT6) en las células mieloides. En la Figura 15 se pueden observar las intensidades de fluorescencia media (MFI) de pSTAT6 en las células CD11b⁺Gr1⁺ a cada tiempo menos la MFI detectada al tiempo cero (valor basal). Observamos que, luego de 240 min de co-cultivo, las células mieloides de ratones jóvenes y viejos tratados con CpG-ODN+IFA presentaban mayor activación de STAT6 con respecto a sus controles provenientes de ratones tratados con solución fisiológica. También hallamos que las células mieloides de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA tenían mayor pSTAT6 que sus contrapartes jóvenes (Fig. 15).

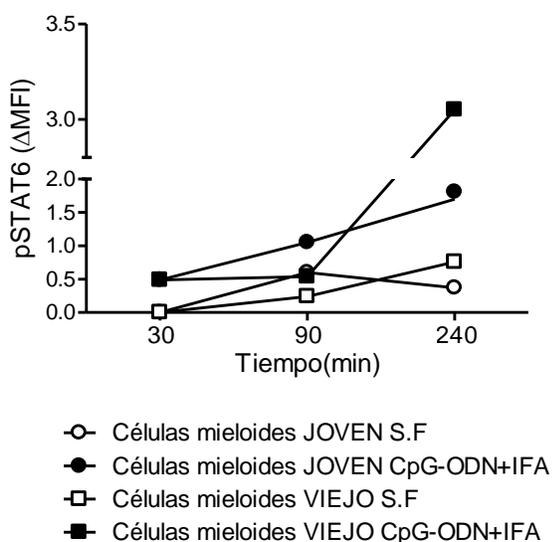


FIGURA 15. Expresión de pSTAT6 en MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.

Se purificaron células mieloides CD11b⁺ del bazo de ratones jóvenes y viejos tratados 10 días antes con solución fisiológica (S.F) o CpG-ODN+IFA y se co-cultivaron con linfocitos T (Li T) CD90⁺ purificados de ratones jóvenes normales previamente activadas con antiCD3/CD28. A los minutos: 30, 90 y 240 del co-cultivo se recogieron las células, se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con anti-CD11b, anti-Gr1 y anti-pSTAT6 (pY641) y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se expresan como intensidad de fluorescencia media (MFI) de pSTAT6 en células

CD11b⁺Gr1⁺ a los distintos tiempos menos el MFI al tiempo cero (Δ MFI). Los datos presentan el promedio \pm SEM de 1 experimento representativo de 2 independientes (n=4ratones/grupo).

Teniendo en cuenta los niveles de activación de STAT6 encontrados en las células mieloides de ratones CpG-ODN+IFA decidimos evaluar la concentración de IL-4 en los sobrenadantes de los co-cultivos ya que esta citoquina es una de las principales involucradas en la activación de STAT6 y consiguiente inducción de arginasa. Como se puede observar en la Figura 16, los niveles de IL-4 se encontraban aumentados cuando las células T estaban co-cultivadas con células mieloides de ratones de ambas edades tratados con solución fisiológica o CpG-ODN+IFA en comparación a cuando las células T se encontraban solas. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas en las concentraciones de IL-4 entre los cultivos de células mieloides de ratones tratados con CpG-ODN+IFA y las de solución fisiológica (Fig. 16).

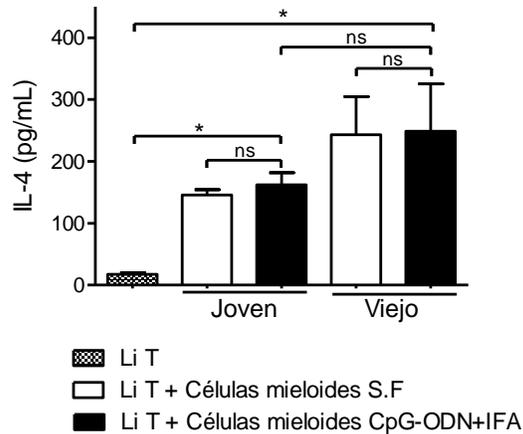


FIGURA 16. IL-4 en sobrenadantes de co-cultivos de linfocitos T y MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.

Se purificaron células mieloides CD11b⁺ del bazo de ratones jóvenes y viejos tratados 10 días antes con solución fisiológica (S.F) o CpG-ODN+IFA y se co-cultivaron (relación 1:1) durante 48hs con linfocitos T (Li T) CD90⁺ purificados de ratones jóvenes normales previamente activadas con antiCD3/CD28. En los sobrenadantes se determinó IL-4 por ELISA de captura. Se grafica la concentración de IL-4 en los sobrenadantes de cultivos estimulados menos los basales de cada condición. Los datos representan el promedio±SEM de 3 experimentos independientes (n=4ratones/grupo). *p<0,05. Los valores de *p* fueron calculados utilizando la prueba de ANOVA de 2 vías seguido del post-test de Bonferroni.

Si bien no se encontraron diferencias en los niveles de IL-4 entre los co-cultivos de células mieloides de ratones CpG-ODN+IFA y los tratados con solución fisiológica, si se detectó una mayor activación de STAT6 en estas células cuando provenían de ratones CpG-ODN+IFA. Esto podría explicarse por la presencia de otra citoquina en el medio extracelular como IL-13 que podría activar STAT6 en las MDSC, o bien por un aumento de la sensibilidad de estas células a la activación por IL-4. En concordancia con esto último, nosotros hemos encontrado que las células mieloides de ratones jóvenes y viejos tratados con

CpG-ODN+IFA tenían aumentada expresión de CD124 (IL-4R α) (Fig.5 y (80)). Este aumento en la expresión del receptor de IL-4 podría estar promoviendo la activación de STAT6 en estas células a diferencia de lo que sucede en las que provienen de ratones tratados con solución fisiológica. En concordancia con esto, una reciente publicación demostró que IL-6 actuaba en macrófagos de forma autócrina induciendo directamente la expresión de IL-4R α y de esta forma las células respondían a IL-4 con la consecuente activación de STAT6 (161).

Evaluación de la vía STAT3- IL-6

Recientes estudios han demostrado que IL-6, entre otras citoquinas, era responsable de la inducción de arginasa mediada por la activación de STAT3 en distintas células mieloides (162-164). A continuación medimos IL-6 en los sobrenadantes de los co-cultivos de células mieloides con linfocitos T y detectamos que esta citoquina se encontraba significativamente aumentada en los cultivos de células mieloides provenientes de ratones tratados con CpG-ODN+IFA de ambas edades con respecto a sus controles solución fisiológica (Fig. 17).

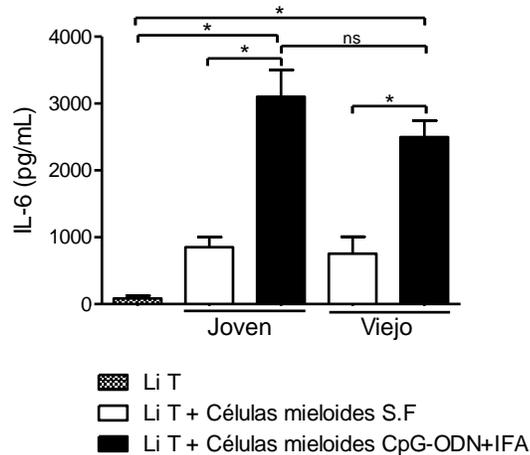


FIGURA 17. IL-6 en sobrenadantes de co-cultivos de células T y MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.

Se purificaron células mieloides CD11b⁺ del bazo de ratones jóvenes y viejos tratados 10 días antes con solución fisiológica (S.F) o CpG-ODN+IFA y se co-cultivaron (relación 1:1) durante 48hs con linfocitos T (Li T) CD90⁺ purificados de ratones jóvenes normales previamente activadas con antiCD3/CD28. Se determinó IL-6 por ELISA de captura en los sobrenadantes. Se grafica la concentración de IL-6 en los sobrenadantes de cultivos estimulados menos los basales de cada condición. Los datos representan el promedio±SEM de 3 experimentos independientes (n=4ratones/grupo). *p<0,05. Los valores de *p* fueron calculados utilizando la prueba de ANOVA de 2 vías seguido del post-test de Bonferroni.

Con el fin de evaluar si también había una mayor activación de STAT3 en las células mieloides de ratones CpG-ODN+IFA, se realizó nuevamente una cinética de co-cultivos de estas células con linfocitos T y a distintos tiempos se evaluaron por citometría intracelular los niveles de fosforilación de STAT3. Como se puede observar en la Figura 18, luego de 30 minutos de co-cultivo, las células mieloides provenientes de ratones tratados con CpG-ODN+IFA presentaron mayor fosforilación de STAT3 (pSTAT3) que sus contrapartes

tratadas con solución fisiológica, en correlación con los niveles de IL-6 observados en los co-cultivos de estas células. También es importante señalar que las células mieloides de ratones viejos, tratados con CpG-ODN+IFA o con solución fisiológica presentaron mayores niveles de pSTAT3 que sus contrapartes jóvenes (Fig. 18).

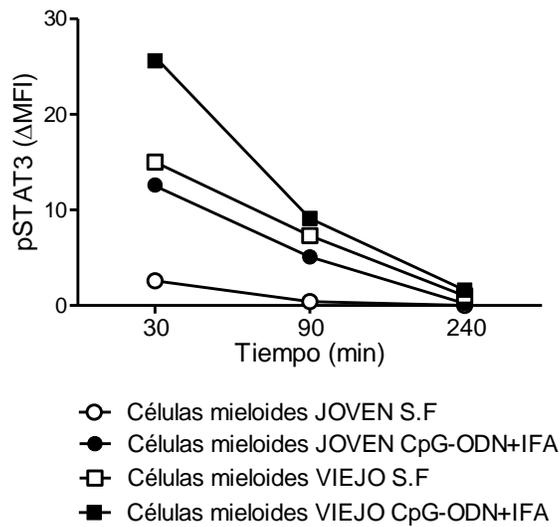


FIGURA 18. Expresión de pSTAT3 en MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.

Se purificaron células mieloides CD11b⁺ del bazo de ratones jóvenes y viejos tratados 10 días antes con solución fisiológica (S.F) o CpG-ODN+IFA y se co-cultivaron con linfocitos T (Li T) CD90⁺ purificados de ratones jóvenes normales que habían sido activadas con antiCD3/CD28. Luego de 30, 90 y 240 minutos se recogieron células del co-cultivo, fijaron, permeabilizaron y se tiñeron con anti-CD11b, anti-Gr1 y anti-pSTAT3 (pY705) y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se expresan como intensidad de fluorescencia media (MFI) de pSTAT3 en células CD11b⁺Gr1⁺ a los distintos tiempos menos el MFI al tiempo cero (ΔMFI). Los datos presentan el promedio±SEM de 1 experimento representativo de 2 independientes (n=4ratones/grupo).

Evaluación de la participación de IL-4 e IL-6 del microambiente en la inducción de arginasa

La mayor activación de STAT6 y STAT3 en las células mieloides provenientes de ratones tratados con CpG-ODN+IFA con respecto a sus controles solución fisiológica, se correlacionan con la inducción tanto de la expresión proteica como de la actividad de la enzima arginasa en estas células. Por ello, nuestro próximo objetivo fue determinar si la presencia de IL-4 e IL-6, juntas o individualmente, en el microambiente de las células mieloides de ratones tratados eran importantes para su activación e inducción de arginasa.

A continuación, evaluamos la participación de IL-4 e IL-6 del medio extracelular en la expresión proteica de arginasa I en las células mieloides, para lo que realizamos co-cultivos de estas células con linfocitos T. En determinados pocillos agregamos anticuerpos neutralizantes para cada una de las citoquinas o para ambas y al cabo de 24 hs determinamos por citometría de flujo intracelular la expresión de arginasa I en las MDSC.

Como ya habíamos observado las células mieloides de ratones jóvenes tratados con CpG-ODN+IFA presentaban mayor expresión de arginasa I con respecto a sus controles solución fisiológica. En los co-cultivos de estas células, la neutralización de IL-4 o de IL-6 solas redujo de forma similar la expresión de arginasa I. Sin embargo, la neutralización conjunta de IL-4 e IL-6 redujo aún más la expresión de arginasa I en estas células mieloides de ratones jóvenes tratados con CpG-ODN+IFA. Estos resultados sugieren que tanto IL-4 como IL-6 solas son

capaces de inducir la expresión de arginasa I en las células mieloides de ratones jóvenes CpG-ODN+IFA aunque a niveles menores que cuando se encuentran ambas citoquinas presentes en el microambiente celular (Fig.19 A-B).

Con respecto a las células mieloides provenientes de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA, como vimos en resultados anteriores y también podemos observar en la Figura 19, estas células tienen mayor expresión de arginasa I que sus controles provenientes de ratones solución fisiológica. Cuando los anticuerpos neutralizantes para IL-4 o IL-6 fueron agregados por separado a los co-cultivos la expresión de arginasa I se vió significativamente reducida. El agregado de ambos anticuerpos neutralizantes juntos generó similar reducción de expresión de la enzima que cuando se agregaban los anticuerpos por separado. Estos resultados sugieren que la presencia de IL-4 e IL-6 son importantes para la inducción de la expresión de arginasa I en las células mieloides de ratones viejos CpG-ODN+IFA (Fig. 19 A-B). La especificidad de los anticuerpos neutralizantes se controló con el agregado de anticuerpos IgG no relacionados. En los sobrenadantes de cultivo donde se habían agregado anticuerpos neutralizantes se evaluó la concentración de las citoquinas por ELISA para comprobar la neutralización de las mismas (datos no mostrados).

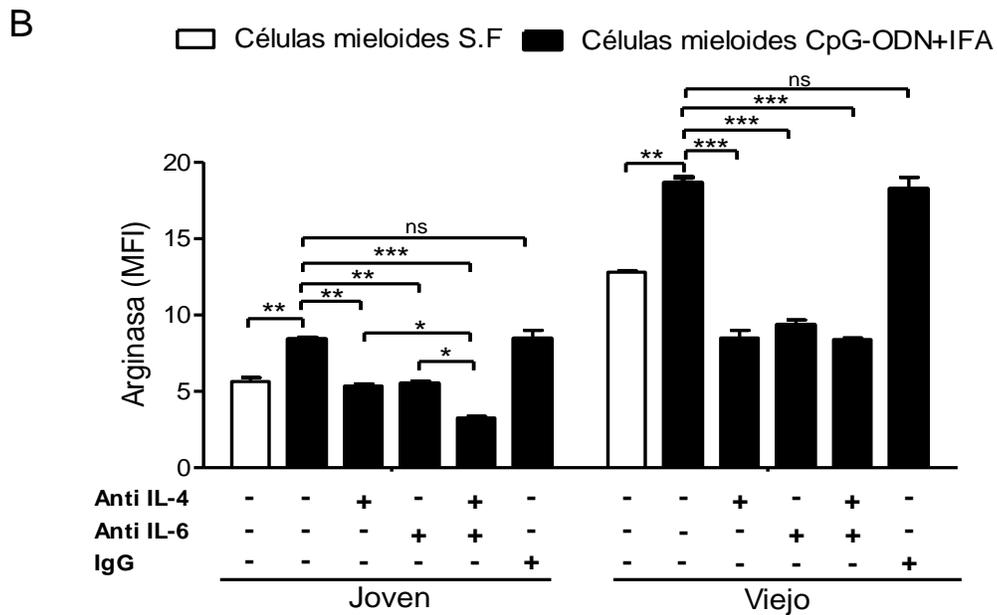
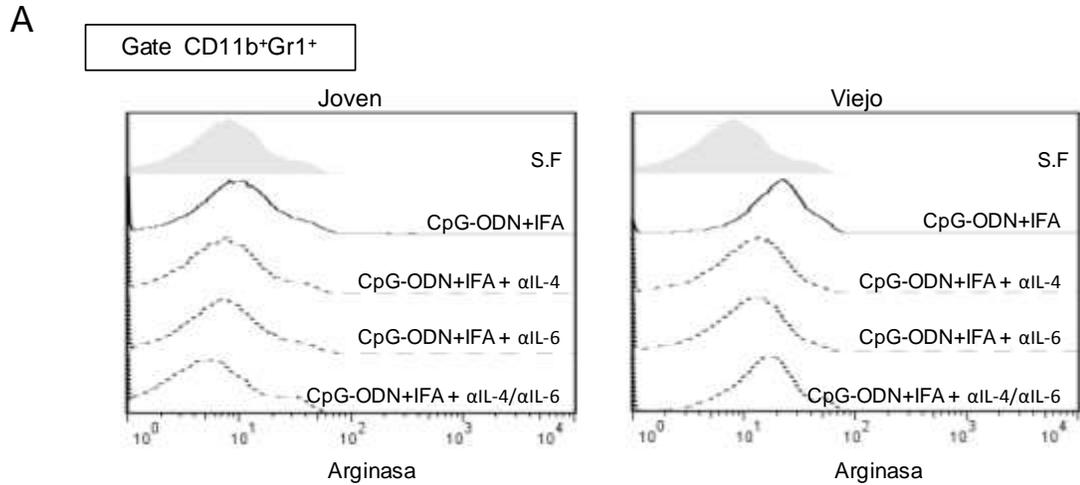


FIGURA 19. Evaluación de la participación de IL-4 e IL-6 en la expresión de arginasa I en MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.

Se purificaron células mieloides CD11b⁺ del bazo de ratones jóvenes y viejos tratados 10 días antes con solución fisiológica (S.F) o CpG-ODN+IFA y se co-cultivaron (relación 1:1) durante 24hs con linfocitos T (Li T) CD90⁺ purificados de ratones jóvenes normales previamente activadas con antiCD3/CD28. En algunos pocillos se agregaron anticuerpos neutralizantes anti-IL4, anti-IL6 cada uno por separado, o los dos juntos según se indica, o un anticuerpo IgG no relacionado. Luego del cultivo las células fueron teñidas con los anticuerpos de superficie anti-

CD11b y anti-Gr1, fijadas, permeabilizadas y teñidas intracelularmente con anti-arginasa I y analizadas mediante citometría de flujo. (A) Histograma representativo de la expresión de arginasa I en la población de células CD11b⁺Gr1⁺. (B) Grafico de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de arginasa I en la población de células CD11b⁺Gr1⁺. Los datos representan el promedio±SEM de 2 experimentos independientes (n=4ratones/grupo). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Los valores de *p* fueron calculados utilizando la prueba de ANOVA de 2 vías seguido del post-test de Bonferroni.

Teniendo en cuenta que, muchos autores han basado sus estudios en el requerimiento de citoquinas para la inducción de la expresión de arginasa pero no evaluaron si esto afectaba directamente su actividad (162), nosotros decidimos completar nuestros estudios evaluando si la neutralización de IL-4 y/o IL-6 también afectaba la actividad enzimática.

Para ello, realizamos nuevamente co-cultivos de células mieloides de ratones de ambas edades tratados con CpG-ODN+IFA, con linfocitos T y en algunos pocillos se agregaron anticuerpos neutralizantes para IL-4 y/o IL-6. Luego de 48hs de co-cultivo realizamos lisados celulares y determinamos la actividad de arginasa. Pudimos observar que la inducción de arginasa en las células mieloides provenientes de ratones jóvenes tratados con CpG-ODN+IFA se encontraba reducida cuando agregábamos a los cultivos el anticuerpo neutralizante para IL-4 o para IL-6. Sin embargo, cuando ambos anticuerpos neutralizantes fueron agregados juntos, la actividad de arginasa disminuyó completamente. Con lo que podemos sugerir que en las células mieloides de ratones jóvenes tratados con CpG-ODN+IFA tanto IL-4 como IL-6 son capaces de

inducir actividad de arginasa pero cuando están juntas se potencia la inducción de esta enzima (Fig. 20).

Por otra parte, la inducción de actividad de arginasa que observábamos en las células mieloides provenientes de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA, se veía disminuida casi completamente cuando IL-4 o IL-6 eran neutralizadas por separado. Con esto sugerimos que, a diferencia de lo que sucede en jóvenes, la presencia de ambas citoquinas en el microambiente en el que se encuentran las células mieloides de ratones viejos CpG-ODN+IFA es esencial para la inducción de la actividad de arginasa, ya que la presencia de una u otra citoquina por separado no logra generar su inducción (Fig. 20).

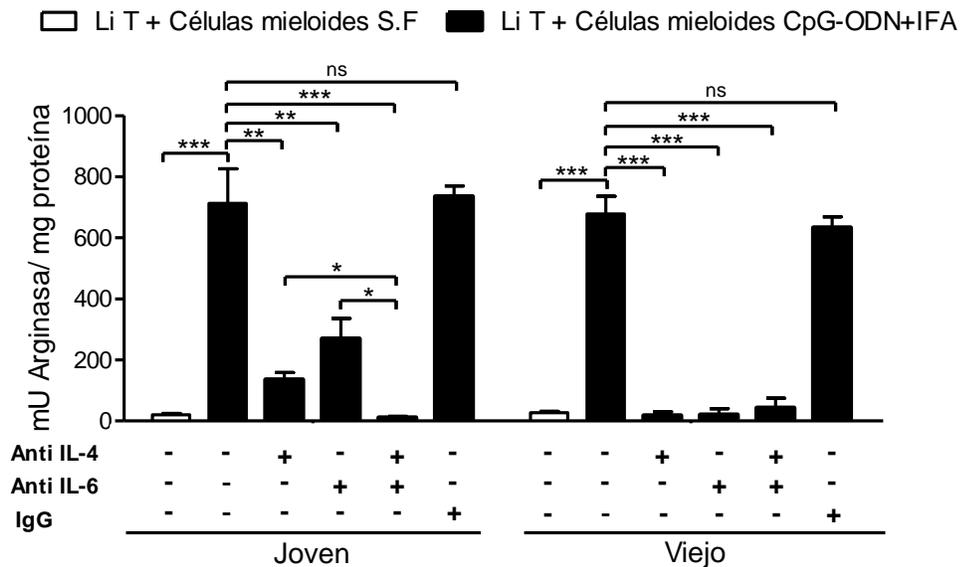


FIGURA 20. Evaluación de la participación de IL-4 e IL-6 en la actividad de arginasa en MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.

Se purificaron células mieloides CD11b⁺ del bazo de ratones jóvenes y viejos tratados 10 días antes con S.F o CpG-ODN+IFA y se co-cultivaron (relación 1:1) durante 48hs con Li T CD90⁺ purificados de ratones jóvenes normales previamente activados con antiCD3/CD28. En algunos

pocillos se agregaron anticuerpos neutralizantes anti-IL4, anti-IL6 cada uno por separado o los dos juntos según se indica, o una IgG no relacionada. Se realizaron lisados celulares para determinar la actividad de arginasa. Los resultados se expresan como la actividad bajo estimulación menos la actividad basal. Se grafica mU de actividad de la enzima normalizados de acuerdo al contenido proteico del lisado respectivo. Los datos representan el promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes (n=4ratones/grupo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Los valores de p fueron calculados utilizando la prueba de ANOVA de 2 vías seguido del post-test de Bonferroni.

Como mencionamos antes, recientemente ha sido reportado que la activación de STAT3 mediada por IL-6 promueve la inducción de arginasa en células de linaje mieloide (162-164) decidimos evaluar si la neutralización de IL-6 en el medio de cultivo repercutía en la fosforilación de STAT3 en las células mieloides de ratones tratados con CpG-ODN+IFA de ambas edades. Para esto se realizaron co-cultivos de estas células con linfocitos T y en algunos pocillos se agregó el anticuerpo neutralizante de IL-6. Al cabo de 30 minutos de co-cultivo se analizó por citometría de flujo intracelular la expresión de pSTAT3 en las células mieloides. En la Figura 21 se puede observar que al neutralizar IL-6 en los cultivos se reduce la fosforilación de STAT3 en las células mieloides de ratones jóvenes y viejos tratados con CpG-ODN+IFA, lo que se correlaciona con la disminución de actividad y expresión de arginasa que se produce en estas células cuando se neutraliza IL-6 (Fig. 21)

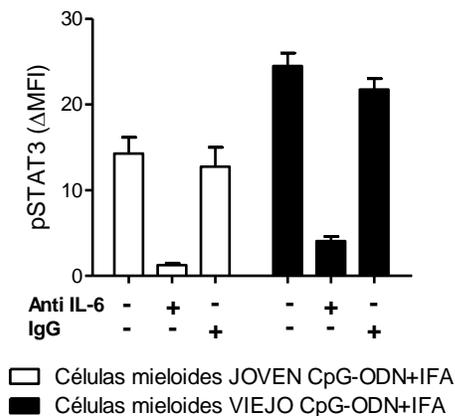


FIGURA 21. Influencia de IL-6 en la expresión de pSTAT3 en MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.

Se purificaron células mieloides CD11b⁺ del bazo de ratones jóvenes y viejos tratados 10 días antes con S.F o CpG-ODN+IFA y se co-cultivaron con linfocitos T (Li T) CD90⁺ purificados de ratones jóvenes normales previamente activadas con antiCD3/CD28. Luego de 30 minutos se recogieron las células del co-cultivo, se fijaron, permeabilizaron y se tiñeron con anti-CD11b, anti-Gr1 y anti-pSTAT3 (pY705) y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se expresan como intensidad de fluorescencia media (MFI) de pSTAT3 en células CD11b⁺Gr1⁺ a 30 minutos menos el MFI al tiempo cero (ΔMFI). Los datos representan el promedio±SEM de 1 experimento representativo de 2 independientes (n=4ratones/grupo).

Adicionalmente, estudiamos los niveles de IL-10 en los co-cultivos, ya que esta es otra citoquina que podría estar también implicada en la fosforilación de STAT3. En la Figura 22 se puede observar que los niveles de IL-10 se encontraban disminuídos en los co-cultivos de células provenientes de ratones tratados con CpG-ODN+IFA con respecto a sus controles de solución fisiológica de ambas edades (Fig. 22). Los niveles reducidos de IL-10 en los co-cultivos de

células mieloides provenientes de ratones tratados con CpG-ODN+IFA pueden deberse al aumento de citoquinas inflamatorias que, como ha sido demostrado por otros autores (165) podrían regular de forma negativa la secreción de IL-10.

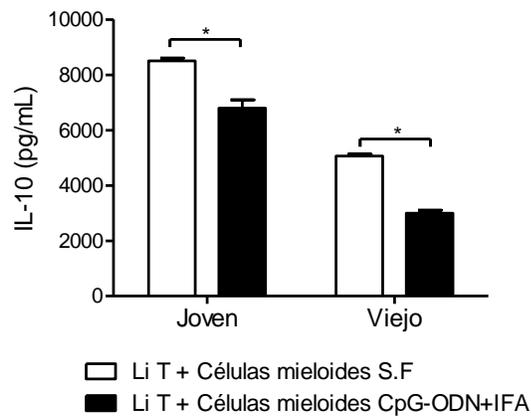


FIGURA 22. IL-10 en sobrenadantes de co-cultivos de Li T y MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA.

Se purificaron células mieloides CD11b⁺ del bazo de ratones jóvenes y viejos tratados 10 días antes con solución fisiológica (S.F) o CpG-ODN+IFA y se co-cultivaron (relación 1:1) durante 48hs con linfocitos T (Li T) CD90⁺ purificados de ratones jóvenes normales que habían sido activadas con antiCD3/CD28. Luego se determinó IL-10 por ELISA de captura en los sobrenadantes de cultivo. Se grafica la concentración de IL-10 en los sobrenadantes de cultivos estimulados menos los basales de cada condición. Los datos representan el promedio±SEM de 2 experimentos independientes (n=4ratones/grupo). *p<0,05. Los valores de *p* fueron obtenidos mediante la prueba de ANOVA de 2 vías seguido del post-test de Bonferroni.

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO II

1. El análisis funcional de las células mieloides de bazo de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA nos permitió determinar lo siguiente:
 - Estas células son capaces de suprimir la proliferación de linfocitos T estimulados de forma inespecífica. La capacidad supresora por célula, es similar a las de ratones jóvenes tratados con CpG-ODN+IFA.
 - Cuando analizamos el metabolismo de L-arginina en estas células pudimos comprobar que:
 - Presentan inducción de expresión proteica y actividad enzimática de arginasa I a niveles similares de las de ratones jóvenes tratados.
 - La inducción de arginasa es el principal mecanismo supresor que ejercen para disminuir la proliferación de los linfocitos T.
2. El estudio del mecanismo de inducción de arginasa en células mieloides de ratones jóvenes y viejos tratados con CpG-ODN+IFA nos permitió comprobar que:
 - Las señales del microambiente en el que se encuentran los linfocitos T con las células mieloides de ratones tratados con CpG-ODN+IFA son importantes para activar la enzima arginasa.

- Células mieloides de ratones tratados con CpG-ODN+IFA de ambas edades presentan mayor expresión de STAT3 y STAT6 fosforilado que sus contrapartes de ratones tratados con solución fisiológica.
- IL-4 e IL-6 del microambiente están implicadas en la inducción de arginasa en estas células:

En células mieloides provenientes de ratones JOVENES tratados con CpG-ODN+IFA: La presencia de IL-4 o IL-6 por separado en el medio extracelular inducen expresión y actividad de arginasa. Aunque la mayor inducción se da cuando ambas citoquinas están presentes en el microambiente.

En células mieloides provenientes de ratones VIEJOS tratados con CpG-ODN+IFA: La presencia de IL-4 o IL-6 por separado en el medio extracelular no es suficiente para inducir expresión ni actividad de arginasa, solo la presencia de las dos citoquinas en el microambiente induce arginasa en estas células mieloides.

CAPÍTULO III

***ESTUDIO EN RATONES VIEJOS DE LA DURACIÓN DE
LAS CÉLULAS MIELOIDES EXPANDIDAS POR
TRATAMIENTO CON CpG-ODN+IFA***

Estudios en humanos y en ratones demuestran que durante el envejecimiento se produce un fenómeno de inflamación basal crónica de bajo nivel, caracterizado por la presencia de elevados niveles de citoquinas proinflamatorias, conocido como inflamm-ageing (36-37). Esta condición inflamatoria puede inducir en órganos linfáticos de ratones viejos la acumulación de MDSC como un intento del organismo de prevenir o reducir el daño provocado por la prolongada inflamación. En general, todo mecanismo de acción genera una reacción que lo regule, por esto algunos autores sugieren que la inflamación lleva a que se genere una respuesta protectora sobre las MDSC que les otorga resistencia a la apoptosis inducida por agentes extrínsecos, resultando en MDSC con mayor tiempo de vida media in vivo (46). Debido a que hemos observado que existe una menor proporción de células mieloides de animales viejos con apoptosis espontánea que en los jóvenes (Fig. 3), nos preguntamos si luego de un estímulo como CpG-ODN+IFA esta población podría permanecer expandida durante un mayor período de tiempo en estos ratones. Para esto, animales jóvenes y viejos recibieron una sola inyección de CpG-ODN+IFA 0, 10, 25 o 40 días previos al estudio. Como indicamos previamente, la población de células mieloides CD11b⁺Gr1⁺ de ratones viejos aumentaba a niveles similares a la de jóvenes hacia el día 10 post- tratamiento, pero al día 25 e incluso 40 luego de la inyección estas células se mantenían significativamente elevadas en ratones viejos. En cambio en animales jóvenes llegaban a un pico al día 10 y luego comenzaba a descender; encontrándose en niveles similares a los

de un animal no tratado (o al día cero) 25 días después de la inyección con CpG-ODN+IFA (Fig.23)

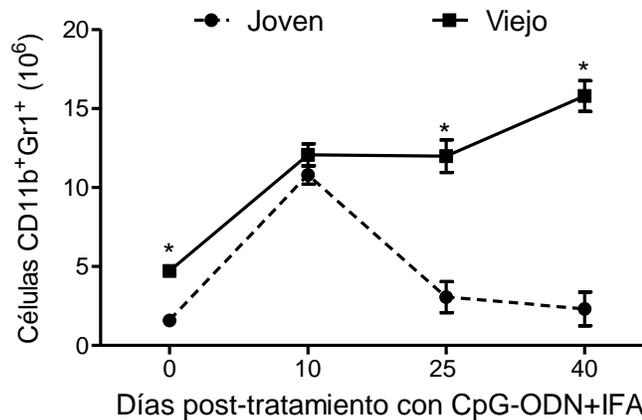


FIGURA 23. Duración de la expansión de MDSC en ratones viejos luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA.

Luego de 0, 10, 25, y 40 días del tratamiento con CpG-ODN+IFA se obtuvieron esplenocitos de ratones jóvenes y viejos y se tiñeron con anti-CD11b y anti-Gr1; los porcentajes de estas células en cada condición fueron analizados por citometría de flujo. Los datos son presentados como promedio \pm SEM y son representativos de 3 experimentos independientes (n= 4 ratones/grupo). *p<0,05. Los valores de p fueron obtenidos mediante la aplicación de la prueba ANOVA de 2 vías y el post-test de Bonferroni.

En paralelo, también evaluamos en el bazo de los ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA, otras poblaciones celulares de origen mieloide ya que estas también podrían verse afectadas. Como podemos observar en la Figura 24, no se detectaron cambios en la población de macrófagos ni en la de células dendríticas a los distintos tiempos luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA (Fig. 24)

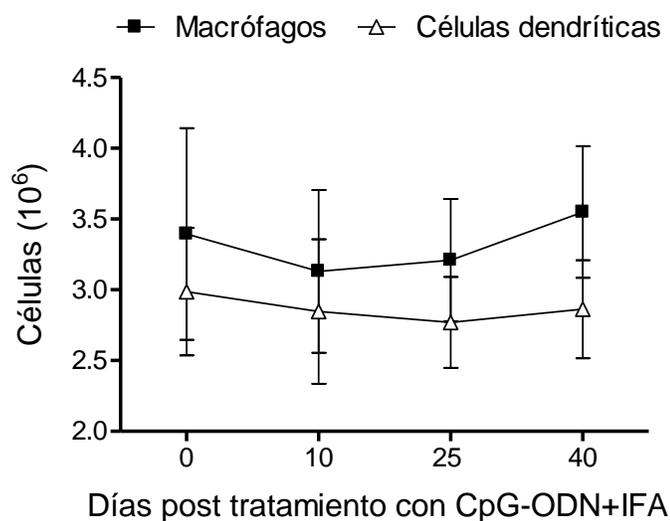


FIGURA 24. Análisis de macrófagos y células dendríticas luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA.

En los días 0, 10, 25, y 40 días después del tratamiento con CpG-ODN+IFA se obtuvieron esplenocitos de ratones viejos y se tiñeron con anticuerpos anti-CD11b, anti-CD11c (Células dendríticas) y anti-F4/80 (macrófagos); los porcentajes de estas células fueron analizados por citometría de flujo. Los datos son presentados como promedio±SEM y son representativos de 2 experimentos independientes (n=4 ratones/grupo).

Evaluación de arginasa en las células mieloides de ratones viejos a distintos días luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA

A continuación, nos preguntamos si además de la expansión de las células mieloides en ratones viejos su función supresora también se conserva durante más tiempo luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA. Para contestar esta pregunta, realizamos co-cultivos de linfocitos T previamente activados, con células mieloides purificadas de ratones jóvenes y viejos que habían sido tratados 40 días antes con solución fisiológica o con CpG-ODN+IFA. Luego de 48hs se realizaron lisados celulares para determinar actividad de arginasa. En la

Figura 25 A se puede observar que las células mieloides de ratones viejos que continuaban expandidas 40 días después del tratamiento con CpG-ODN+IFA conservaban también su actividad de arginasa aumentada. En cambio, en ratones jóvenes, en los que las células mieloides se encontraron a niveles basales 40 días después del tratamiento con CpG-ODN+IFA, no presentaron aumento de actividad de arginasa (Fig. 25 A). Complementariamente, en lisados de esplenocitos totales extraídos de ratones viejos 25 y 40 días después del tratamiento con CpG-ODN+IFA también encontramos mayor actividad de arginasa a diferencia de lo que sucede en esplenocitos de ratones jóvenes (Fig. 25 B).

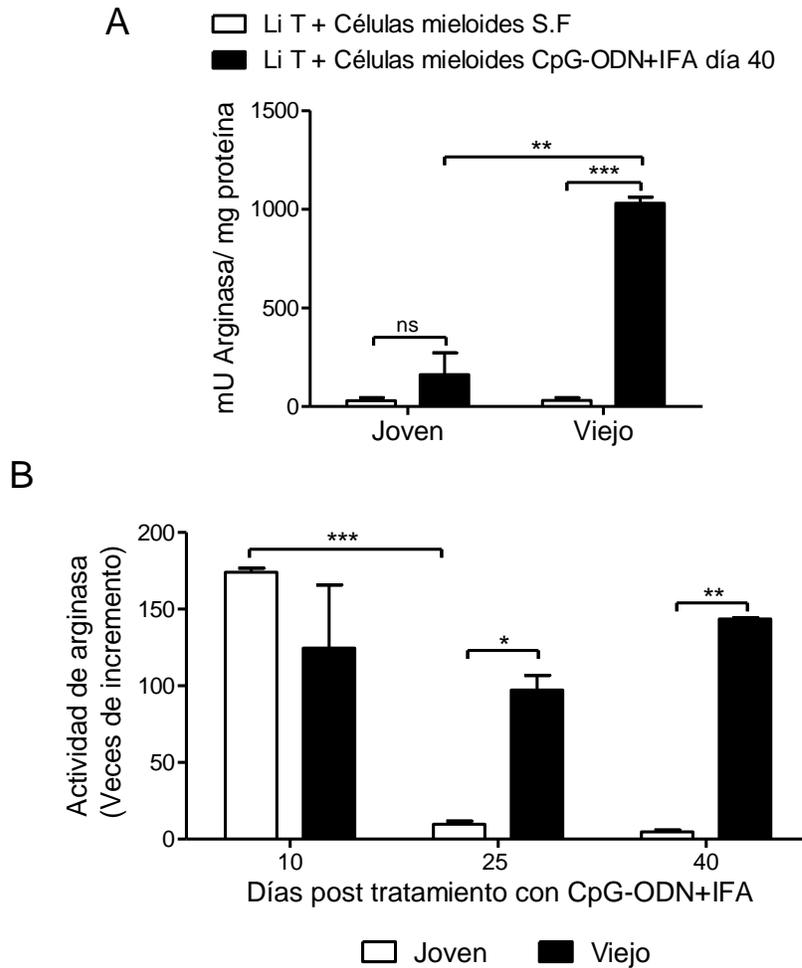


FIGURA 25. Actividad de arginasa en células mieloides y esplenocitos de ratones viejos 40 días después del tratamiento con CpG-ODN+IFA.

(A) Se co-cultivaron linfocitos T (Li T) purificados de ratones jóvenes normales con células mieloides purificadas de ratones jóvenes o viejos luego de 40 días del tratamiento con CpG-ODN+IFA. Después de 48hs de co-cultivo se lisaron las células para medir actividad de arginasa. (B) Esplenocitos totales de ratones jóvenes y viejos tratados 10, 25 y 40 días antes con CpG-ODN+IFA se cultivaron en presencia de Con A o solo con RPMI. Luego de 72hs de cultivo se realizaron los lisados para evaluar la actividad de arginasa. (A) Los resultados se expresan como la actividad bajo la estimulación menos la actividad basal. Se grafica mU de actividad de la enzima normalizados de acuerdo al contenido proteico del lisado respectivo. (B) Se grafica las veces de incremento de la actividad de arginasa de esplenocitos de ratones CpG-ODN+IFA con

respecto a los cultivos de esplenocitos tratados con solución fisiológica. Los datos representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes (n=4/grupo). *p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001. Los valores de *p* fueron obtenidos mediante la aplicación de la prueba ANOVA de 2 vías y el post-test de Bonferroni

Además, evaluamos los niveles de IL-4 e IL-6 en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos totales donde habíamos evaluado la actividad de arginasa y observamos que IL-4 solamente se encontraba aumentada en cultivos de esplenocitos de ratones viejos tratados 10, 25 o 40 días antes con CpG-ODN+IFA coincidiendo con el aumento de actividad de arginasa, en cambio en ratones jóvenes no se observó aumento (Fig. 26 A). Los niveles de IL-6, ya se encontraban aumentados en los esplenocitos de ratones viejos tratados con solución fisiológica con respecto a sus contrapartes jóvenes y no aumentaron luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA. En los esplenocitos de jóvenes, luego de 10 días del tratamiento con CpG-ODN+IFA los niveles de IL-6 incrementaban significativamente y luego bajaban al día 25 a valores basales, coincidiendo también con la actividad de arginasa en estas células (Fig. 26 B).

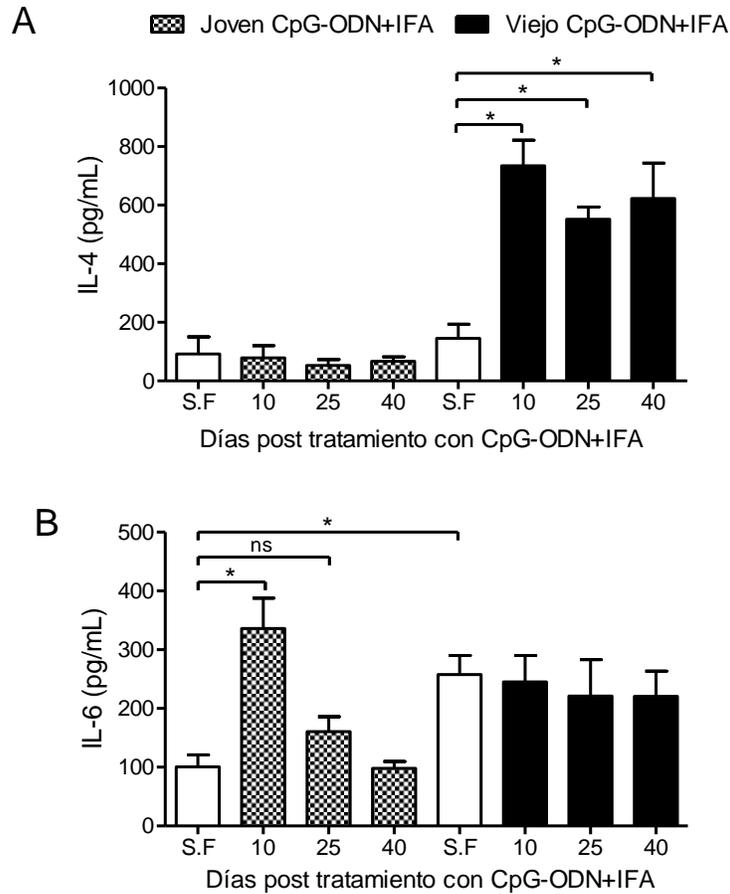


FIGURA 26. IL-4 e IL-6 en cultivos de esplenocitos de ratones a distintos tiempos post-tratamiento con CpG-ODN+IFA.

Luego de 10, 25 o 40 días del tratamiento con CpG-ODN+IFA o solución fisiológica (S.F) se obtuvieron esplenocitos y se realizaron cultivos estimulados con Con A o solo con RPMI. Luego de 72hs se analizaron citoquinas por ELISA de captura en los sobrenadantes de cultivo. Los resultados se expresan como la concentración de cada citoquina bajo la estimulación con Con A menos la concentración basal. (A) Se representan los niveles de IL-4 y (B) de IL-6. Los datos representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes (n= 4/ grupo) * p < 0,05. Los valores de p fueron obtenidos mediante la aplicación de la prueba ANOVA de 2 vías y el post-test de Bonferroni.

Estudio de la función supresora de las células mieloides de ratones viejos 40 días después del tratamiento con CpG-ODN+IFA

Al observar que las células mieloides de ratones viejos conservaban actividad de arginasa elevada 40 días después del tratamiento con CpG-ODN+IFA, pensamos que estas podrían continuar teniendo función supresora sobre la proliferación de los linfocitos T. Para comprobar esta hipótesis realizamos co-cultivos de linfocitos T de animales jóvenes normales con células mieloides provenientes de ratones jóvenes y viejos que habían sido tratados 10 o 40 días antes con CpG-ODN+IFA. En la Figura 27 se observa que las células mieloides de ratones viejos que habían sido tratados 40 días antes con CpG-ODN+IFA, aún presentaban capacidad supresora sobre los linfocitos T, y la supresión observada era similar a las de las células provenientes de ratones que habían sido tratados 10 días antes. Por el contrario, las células mieloides de ratones jóvenes que habían sido tratados 40 días antes, y que no presentaban aumentada actividad de arginasa, tampoco eran capaces de suprimir la proliferación de las células T (Fig. 27).

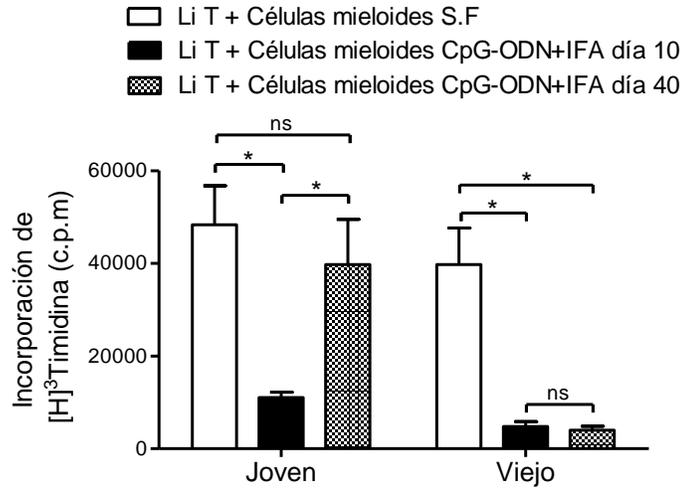


FIGURA 27. Función supresora de las células mieloides de ratones viejos 40 días post-tratamiento con CpG-ODN+IFA.

Se co-cultivaron linfocitos T (Li T) provenientes de ratones jóvenes normales previamente activados con anti-CD3/CD28, con células mieloides purificadas de ratones jóvenes o viejos tratados con CpG-ODN+IFA 10 o 40 días antes. Dieciocho horas antes de la recolección se agregó [³H]-Timidina (1μCi/pocillo). La incorporación de timidina se midió en un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresan en cuentas por minuto (c.p.m) bajo la estimulación con anti-CD3/CD28 menos c.p.m basal. Los datos representan el promedio±SEM de los resultados de 2 experimentos independientes (n=4ratones/grupo) *p<0,05. Los valores de p fueron obtenidos mediante la aplicación de la prueba ANOVA de 2 vías y el post-test de Bonferroni.

Análisis de la expansión de MDSC en ratones viejos 80 días después del tratamiento con CpG-ODN+IFA

Finalmente, teniendo en cuenta la desregulación que sufre el sistema inmune durante el envejecimiento, y consecuentemente la mayor susceptibilidad a contraer infecciones y cáncer (166) nos cuestionamos si la población de células mieloides que se mantenía expandida mayor tiempo en ratones viejos que en jóvenes luego del estímulo inflamatorio de CpG-ODN+IFA eran capaces de

contraerse. La expansión desmedida de estas células podría agravar la respuesta inmune de los animales viejos. Para esto, ratones jóvenes y viejos fueron tratados con CpG-ODN+IFA y luego de 80 días evaluamos los niveles de células mieloides en el bazo. En la Figura 28 podemos observar, que al día 80 los porcentajes de estas células se encontraban similares a los de animales tratados al día 0 (Fig. 28). Con lo que podemos concluir que si bien el estímulo generado por CpG-ODN+IFA en ratones viejos determina una expansión de células mieloides durante mayor tiempo que en los jóvenes, esta expansión no es indefinida sino que necesita de tiempos mayores para volver a su estado basal.

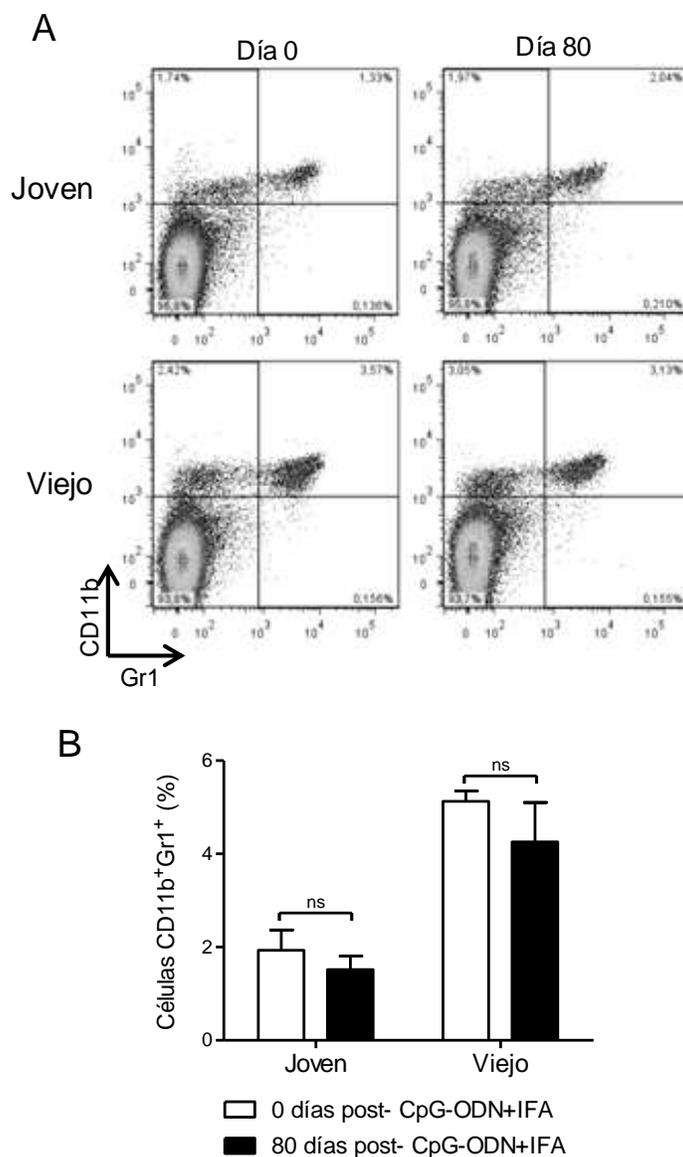


FIGURA 28. Células mieloides en bazo de ratones viejos 80 días post-tratamiento con CpG-ODN+IFA.

Cero u 80 días luego del tratamiento de ratones jóvenes y viejos con CpG-ODN+IFA, se obtuvieron los esplenocitos se tiñeron con anti-CD11b y anti-Gr1 y se analizaron por citometría de flujo. (A) Dot plot representativo y (B) porcentajes de células CD11b⁺Gr1⁺. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes (n=4ratones/grupo). Los valores de *p* fueron obtenidos mediante la aplicación de la prueba ANOVA de 2 vías y el post-test de Bonferroni.

CONCLUSIONES CAPÍTULO III

En este capítulo se demostró que las células mieloides que se expanden luego de un estímulo inflamatorio como CpG-ODN+IFA en ratones viejos siguen una cinética distinta a las de animales jóvenes.

- *En ratones jóvenes*, el tratamiento con CpG-ODN+IFA causa un aumento del número de células mieloides que alcanza un pico al día 10 y comienza a bajar regresando a niveles basales al día 25.
- *En ratones viejos*, el tratamiento con CpG-ODN+IFA provoca una expansión de células mieloides hacia el día 10, esta población se conserva aumentada hasta por lo menos 40 días después. Sin embargo, 80 días luego del tratamiento estas células vuelven a sus niveles basales. Su expansión no es indefinida.

Las MDSC de ratones viejos conservan su función supresora hasta por lo menos *40 días* después del tratamiento con CpG-ODN+IFA:

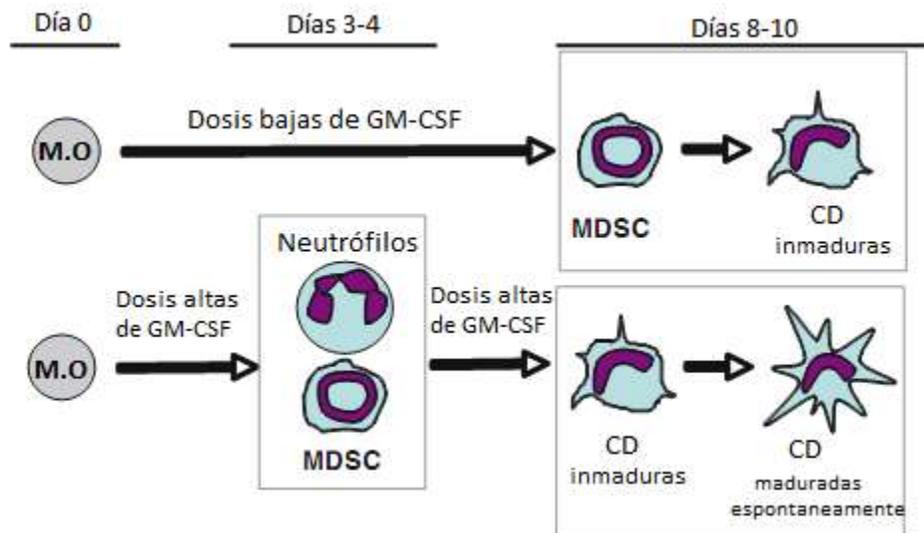
- Conservan la capacidad de suprimir la proliferación de linfocitos T de ratones jóvenes normales en co-cultivos.
- Mantienen elevada actividad de arginasa.

CAPÍTULO IV

***ACTIVACIÓN DE MDSC IN VITRO CON CpG-ODN Y
CpG-ODN+IFN- γ***

Las células de la médula ósea murina pueden ser estimuladas para diferenciarse a células del sistema inmune. Dependiendo en la concentración de las citoquinas estimulatorias y la duración de la estimulación estas células van a poseer diferentes capacidades inmunológicas (61, 167-169).

Rössner y colaboradores desarrollaron un método para la generación de MDSC *in vitro* usando GM-CSF (170). Células con fenotipo similar a MDSC son generadas *in vitro* mediante la utilización de diferentes protocolos que varían la dosis y el tiempo de cultivo con GM-CSF. Altas concentraciones de GM-CSF durante 3-4 días favorecen la generación de MDSC que coinciden con el tiempo de diferenciación de los neutrófilos, mientras que bajas concentraciones de GM-CSF requieren 8-10 días para la generación de MDSC que coinciden en cultivo con células dendríticas inmaduras (61, 169) (Esquema. 5).



Esquema 5: Diferenciación de MDSC derivadas de médula ósea con GM-CSF. El cultivo de células de médula ósea murina durante 8-10 días con bajas dosis de GM-CSF genera MDSC

coincidiendo con la generación de CD. Por el contrario, altas dosis de GM-CSF durante 3-4 días favorecen el rápido desarrollo de MDSC, coincidiendo con la diferenciación de neutrófilos en los cultivos. Si las MDSC no son activadas al día 3-4 se terminan de desarrollar en CD. ***Adaptado de Ribechini, 2010.***

Las MDSC generadas *in vitro* comparten muchas características con sus contrapartes aisladas *ex-vivo*, como su capacidad para suprimir la proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺ mediante el contacto célula- célula, producción de ON, presencia de IFN- γ , etc. (61).

GM-CSF actúa a estadios tempranos de compromiso de linaje regulando la expansión y maduración de progenitores hematopoyéticos tempranos. Altas concentraciones de GM-CSF como las producidas por células T activadas (171), células NK (172) y células dendríticas durante respuestas inmunes llevan a la expansión, redistribución y función de células CD11b⁺Gr1⁺. Muchos tumores murinos y humanos secretan GM-CSF que induce la generación y acumulación de MDSC.

Greifenberg y colaboradores mostraron que el tratamiento de MDSC con LPS+IFN- γ , inhibe el desarrollo de células dendríticas y estimula las funciones de las MDSC tales como la liberación de óxido nítrico y la supresión de células T. Esto no se observó con LPS o IFN- γ por separado (99).

Con estos antecedentes nos propusimos evaluar primero si las células de médula ósea de ratones viejos eran capaces de diferenciarse a MDSC *in vitro* con GM-CSF como las de jóvenes. Además decidimos estudiar si el estímulo de MDSC

derivadas de médula ósea con CpG-ODN solo o combinado con IFN- γ era capaz de estimular las funciones supresoras de estas células.

Para ello, cultivamos células de médula ósea de ratones jóvenes y viejos durante 4 días con GM-CSF y evaluamos por citometría de flujo el porcentaje de células con fenotipo CD11b⁺Gr1⁺. Como se puede observar en la Figura 29 luego del cultivo con GM-CSF, tanto las células provenientes de médula ósea de ratones jóvenes como de viejos incrementan la proporción de células con fenotipo CD11b⁺Gr1⁺.

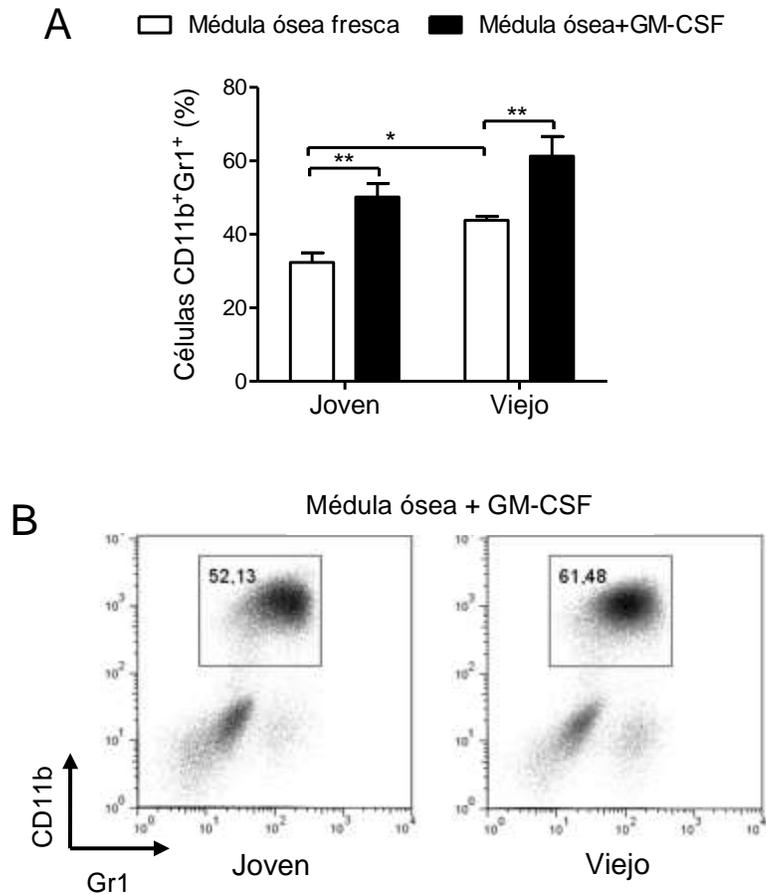


FIGURA 29: MDSC de ratones jóvenes y viejos generadas *in vitro*.

Se extrajeron células de médula ósea de ratones jóvenes y viejos BALB/c y se cultivaron durante 4 días con GM-CSF o se dejaron sin tratar (médula ósea fresca). Luego las células se tiñeron con anticuerpos anti-Gr1 y anti-CD11b y se analizaron por citometría de flujo. (A) Se representan los porcentajes de células CD11b+Gr1+ de médula ósea fresca y después de la incubación con GM-CSF. (B) Grafico Dot plot representativo de CD11b+Gr1+ de médula ósea de ratones jóvenes y viejos después de GM-CSF. Los datos están presentados como promedio±SEM de 3 experimentos independientes (n=4ratones/grupo) **p<0,01. Los valores de p fueron obtenidos mediante la aplicación de la prueba ANOVA de 2 vías y el post-test de Bonferroni

Posteriormente, evaluamos la expresión de Ly6C y Ly6G en las células mieloides diferenciadas con GM-CSF de médula ósea de ratones de ambas edades. Como se observa en la Figura 30, la población de células mieloides

derivadas de ratones de jóvenes y viejos está conformada por porcentajes similares de células CD11b⁺Ly6G⁺ y CD11b⁺Ly6C⁺ (Fig. 30)

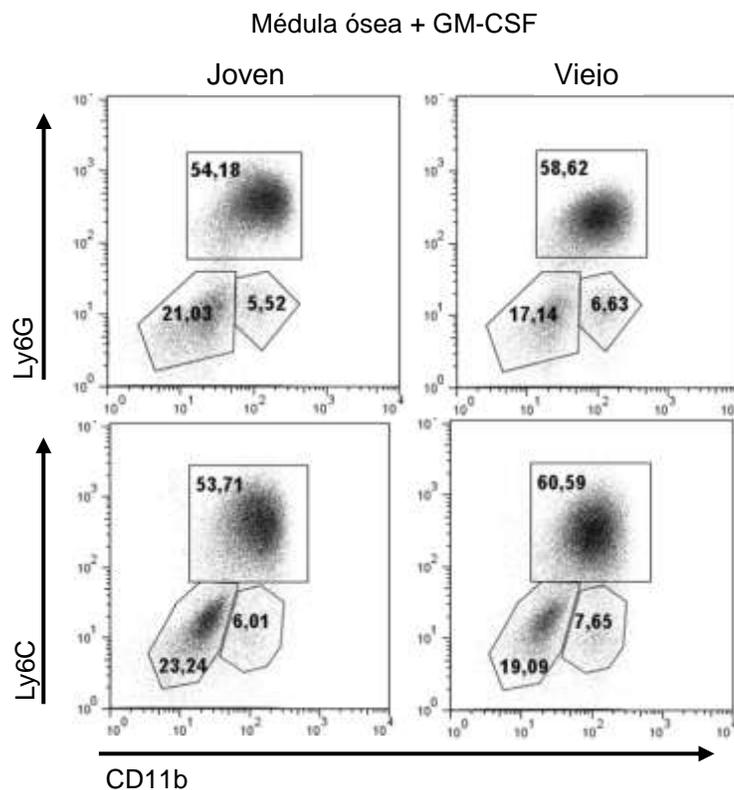


FIGURA 30. Expresión de Ly6C y Ly6G en las MDSC diferenciadas *in vitro*.

Se extrajeron células de médula ósea de ratones jóvenes y viejos BALB/c y se cultivaron durante 4 días con GM-CSF. Luego las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD11b, anti-Ly6G y anti-Ly6C y se analizaron por citometría de flujo. Grafico Dot plot representativo de CD11b⁺Ly6G⁺ y CD11b⁺Ly6C⁺ de médula ósea de ratones jóvenes y viejos después de GM-CSF.

Evaluación del metabolismo de L-arginina en MDSC diferenciadas *in vitro* y estimuladas con CpG-ODN o CpG-ODN+IFN- γ

Teniendo en cuenta antecedentes previos de nuestro grupo en los que macrófagos derivados de médula ósea de ratones al ser activados por CpG-ODN

inducían la activación de la enzima arginasa en presencia de IFN- γ (151) y considerando nuestros estudios *in vivo* en los que en ratones jóvenes y viejos tratados con CpG-ODN+IFA se expande la población de células mieloides con función supresora mediada por arginasa nos propusimos evaluar si CpG-ODN sólo o en combinación con IFN- γ es capaz de estimular esta enzima en las células mieloides derivadas de médula ósea de animales jóvenes y viejos.

Para concretar este objetivo, luego de 4 días de cultivo con GM-CSF, las células mieloides se lavaron y se estimularon durante 48hs con CpG-ODN, CpG-ODN+IFN- γ , IFN- γ o medio solo. Se realizaron los lisados celulares y al determinar la actividad de arginasa observamos que se encontraba significativamente aumentada solamente luego del estímulo con CpG-ODN+IFN- γ en células mieloides derivadas tanto de ratones jóvenes como viejos. CpG-ODN o IFN- γ por separado no fueron capaces de aumentar la actividad de arginasa (Fig. 31).

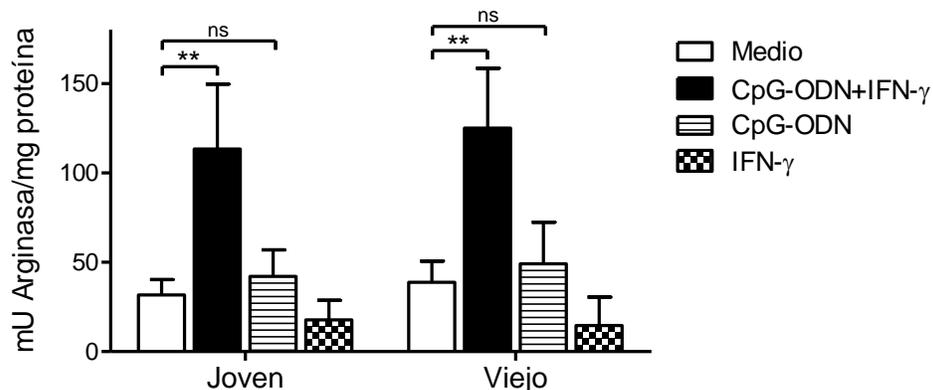


FIGURA 31. Actividad de arginasa en MDSC diferenciadas in vitro y estimuladas con CpG-ODN+IFN- γ .

Se extrajeron células de médula ósea de ratones jóvenes y viejos BALB/c y se cultivaron durante 4 días con GM-CSF. Luego las células se lavaron y se cultivaron con CpG-ODN, CpG-ODN+IFN γ , IFN- γ o medio solo durante 48hs. Se realizaron lisados celulares para medir actividad de arginasa. Se grafica mU de actividad de la enzima normalizados de acuerdo al contenido proteico del lisado respectivo. Los datos representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes (n=4 por grupo) **p< 0,01.

En paralelo, también evaluamos la producción de ON en las células mieloides derivadas de ratones jóvenes y viejos tratadas con CpG-ODN, CpG-ODN+IFN- γ o IFN- γ durante 48hs. En la Figura 32 se puede observar que sólo CpG-ODN+IFN- γ induce el incremento de la producción de ON en células mieloides de ratones de ambas edades. Si bien los niveles de ON detectados luego de la incubación con CpG-ODN+IFN- γ se encontraban significativamente incrementados, CpG-ODN e IFN- γ solos no fueron capaces de inducir aumento de ON en estas células (Fig. 32).

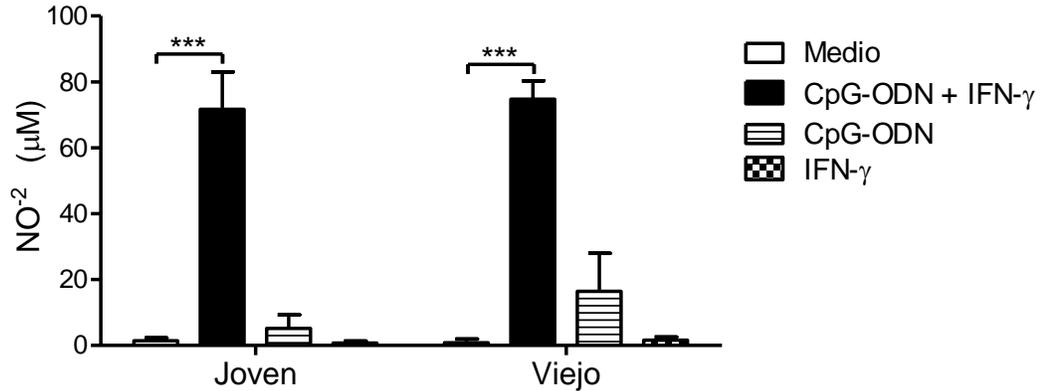


FIGURA 32. Producción de ON en MDSC diferenciadas in vitro y estimuladas con CpG-ODN+IFN-γ

Se extrajeron células de médula ósea de ratones jóvenes y viejos BALB/c y se cultivaron durante 4 días con GM-CSF. Luego se lavaron y se cultivaron con CpG-ODN, CpG-ODN+IFN γ , IFN- γ o medio solo durante 48hs. En los sobrenadantes de cultivo se midió la producción de óxido nítrico por el método de Greiss indirectamente al detectar nitritos (NO²⁻). Los datos representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes (n=4 por grupo). ***p< 0,001. Los valores de p fueron obtenidos mediante la aplicación de la prueba ANOVA de 2 vías y el post-test de Bonferroni.

Complementariamente, se evaluaron las concentraciones de IL-4 e IL-6 en los sobrenadantes de cultivos de células mieloides derivadas de médula ósea y posteriormente tratadas durante 48hs CpG-ODN o CpG-ODN+IFN- γ . Los niveles de IL-4 para todas las condiciones fueron menores al límite de detección (no mostrados). Los niveles de IL-6 se observaron incrementados en los sobrenadantes de los cultivos con CpG-ODN y el aumento fue aún mayor en los cultivos de las células mieloides de ratones de ambas edades estimuladas con CpG-ODN+IFN- γ (Fig. 33).

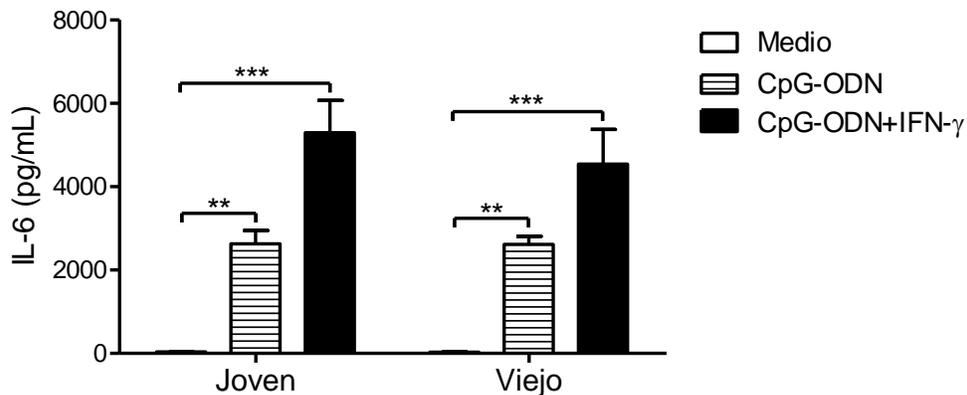


FIGURA 33. Aumento de IL-6 en cultivos de MDSC diferenciadas *in vitro* y estimuladas con CpG-ODN+IFN- γ .

Se extrajeron células de médula ósea de ratones jóvenes y viejos BALB/c y se cultivaron durante 4 días con GM-CSF. Luego se lavaron y se cultivaron con CpG-ODN, CpG-ODN+IFN γ , o medio solo durante 48hs. En los sobrenadantes de cultivo se midieron los niveles de IL-6 por ELISA de captura. Los datos representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes (n=4 por grupo). **p< 0,01 ***p< 0,001. Los valores de *p* fueron obtenidos mediante la aplicación de la prueba ANOVA de 2 vías y el post-test de Bonferroni

Evaluación de la función supresora de las MDSC diferenciadas *in vitro* y estimuladas con CpG-ODN+IFN- γ

Finalmente evaluamos la función supresora de las MDSC derivadas de médula ósea de ratones de ambas edades luego del tratamiento con CpG-ODN+IFN- γ que presentan inducción de arginasa y producción de ON. Para esto se realizaron cultivos de esplenocitos de ratones jóvenes normales marcados con CFSE, que se utilizaron como células respondedoras, con MDSC derivadas de médula ósea de ratones de ambas edades y posteriormente tratadas o no con CpG-ODN+IFN- γ . Como control se utilizaron las células respondedoras solas. En

la Figura 34 podemos observar que las MDSC de la médula ósea de ratones jóvenes y viejos generadas por tratamiento sólo con GM-CSF eran capaces de suprimir la proliferación de las células respondedoras, similar a lo observado previamente por otros autores (170). El tratamiento posterior de estas células con CpG-ODN+IFN- γ aumentó la capacidad supresora de estas células provenientes de ratones jóvenes y viejos (Fig. 34).

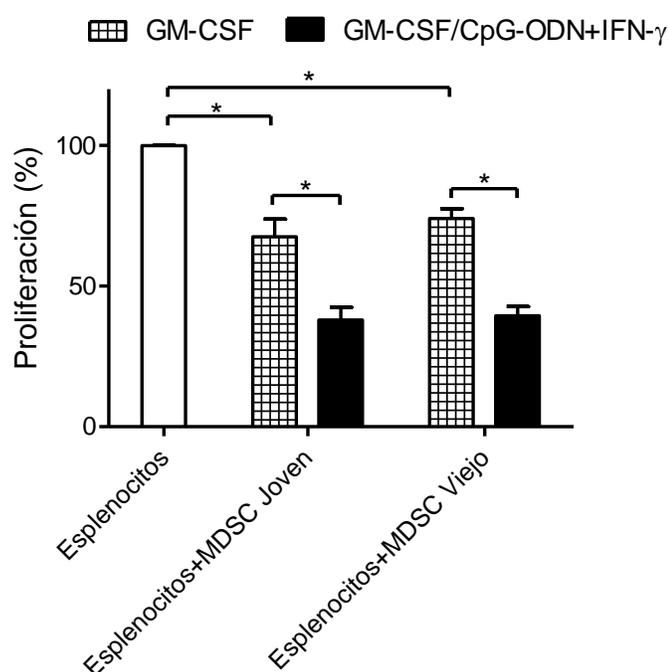


FIGURA 34: Función supresora de MDSC diferenciadas con GM-CSF y estimuladas con CpG-ODN+IFN- γ .

Se extrajeron células de médula ósea de ratones jóvenes y viejos BALB/c y se cultivaron durante 4 días con GM-CSF. Luego se lavaron y se cultivaron con CpG-ODN+IFN γ , o medio solo durante 48hs. Las células luego fueron lavadas y cultivadas con esplenocitos de ratones jóvenes marcadas con CFSE (relación 0,5:1) estimulados con Con A. Como control se utilizaron esplenocitos marcados con CFSE y estimulados con medio o Con A. Luego de 72hs se analizó la proliferación por citometría de flujo. La proliferación de Li T (CD3⁺) se analizó por dilución de CFSE. Los datos representan los porcentajes de proliferación en relación al control. Los datos

representan el promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes (n=4 por grupo) * $p < 0.05$. Los valores de p fueron obtenidos mediante la aplicación de la prueba ANOVA de 2 vías y el post-test de Bonferroni.

CONCLUSIONES CAPÍTULO IV

Con los resultados obtenidos en este capítulo, podemos concluir que:

- Se pueden generar MDSC *in vitro* a partir de células de médula ósea de ratones jóvenes y viejos incubadas con GM-CSF. Estas MDSC son capaces de suprimir la proliferación de células T.
- Adicionalmente, el tratamiento con CpG-ODN+IFN- γ de MDSC de ratones jóvenes y viejos generadas *in vitro* induce un aumento de la actividad de arginasa y de óxido nítrico sintasa en estas células reforzando su capacidad supresora.

DISCUSIÓN

La médula ósea es estimulada a liberar células mieloides inmaduras a la sangre con el fin de proteger al organismo frente a efectos inflamatorios perjudiciales causados por una estimulación excesiva durante infecciones, así como también para limitar la generación de respuestas autoinmunes frente a antígenos liberados por los tejidos, como por ejemplo durante un trauma. En este contexto y en concordancia con otros autores (103, 173), nosotros observamos que los tejidos y órganos linfoides de animales viejos poseen mayores números de células mieloides con fenotipo CD11b⁺Gr1⁺ (Fig. 1-2). En relación a esto, ha sido establecido que las células madre hematopoyéticas murinas presentan cambios en su potencial de diferenciación de linaje durante el envejecimiento, con una menor producción celular eritroide y linfoide mientras que la mioide se conserva o incluso se encuentra aumentada (6-7, 36, 174). Además, en este trabajo de tesis hemos demostrado que las células mieloides CD11b⁺Gr1⁺ de bazo de ratones viejos presentan mayor resistencia a la apoptosis espontánea que sus contrapartes jóvenes (Fig. 3), lo cual también podría ser una de las razones por las que se encuentra un aumento basal de la población de células mieloides en los ratones viejos.

Ha sido bien establecido que CpG-ODN posee buena capacidad para inducir una fuerte respuesta inmune pro-inflamatoria. Nosotros y otros autores hemos demostrado la habilidad de CpG-ODN de actuar como un potente adyuvante en ratones viejos, lo que resulta en la inducción de una eficaz respuesta inmune antígeno-específica(35, 155-156). Pero también, cada vez son más las publicaciones en las que se postulan mecanismos reguladores de la

acción inmunoestimulante de CpG-ODN, que actúan ayudando a limitar la intensidad y extensión de una fuerte respuesta inmune (175-177). Incluso, en trabajos previos de nuestro grupo, hemos demostrado que CpG-ODN combinado con IFN- γ es capaz de inducir arginasa en macrófagos murinos (178). Asimismo, en este trabajo de tesis también demostramos que en ratones de ambas edades, CpG-ODN+IFN- γ aumenta la capacidad supresora de MDSC obtenidas de médula ósea por tratamiento con GM-CSF (Fig. 34).

Previamente hemos demostrado que el tratamiento de ratones jóvenes con CpG-ODN+IFA, induce la expansión de una población de células mieloides con alta actividad de arginasa capaces de reducir la proliferación de células T al disminuir la expresión de la cadena ζ del CD3 en su TCR (80).

En este trabajo de tesis describimos por primera vez que luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA los ratones viejos presentan una expansión de células mieloides con función inmunoreguladora compatibles con MDSC (Fig. 4 y 8). Interesantemente, a diferencia de ratones jóvenes en los que las células mieloides llegan a un pico al día 10 después del tratamiento y luego descienden a niveles normales, en los animales viejos esta población aumenta hacia el día 10 y se conserva aumentada hasta 40 días después del tratamiento conservando su capacidad inmunosupresora y la inducción de arginasa (Fig. 23-25-29). Estos hallazgos sugieren que un estímulo inflamatorio como CpG-ODN+IFA puede expandir células mieloides con actividad supresora en el bazo de ratones viejos por un mayor periodo de tiempo que en los jóvenes, probablemente como una

manera de prevenir el daño inflamatorio patológico. Como evidencia del estado inflamatorio, nosotros hemos observado niveles aumentados de IL-6 en el suero de los ratones viejos luego de 10 días de la inyección con CpG-ODN+IFA (datos no mostrados), algo que no sucede en sus contrapartes jóvenes. Estudios en modelos humanos y murinos indican que durante el envejecimiento los niveles de citoquinas proinflamatorias y reactantes de fase aguda se encuentran elevados en estado basal debido al ya mencionado fenómeno de “inflamm-ageing” (36-37). Consistente con esto, nuestros hallazgos que demuestran que las células mieloides de ratones viejos normales son más resistentes a la apoptosis espontánea sugiriendo que tienen una vida media más prolongada. Esto podría relacionarse con la persistente expansión de estas células luego del estímulo inflamatorio que les genera el tratamiento con CpG-ODN+IFA. En concordancia, Chornoguz y colaboradores sugieren que la inflamación genera una protección sobre las MDSC frente a la apoptosis inducida, resultando en células con mayor tiempo de vida media (46). Además Ko y colaboradores también demostraron que hay una menor proporción de MDSC apoptóticas en el bazo de ratones con tumor 4T1 (179)

Una reciente publicación de Shirota y colaboradores demostró que la administración de CpG-ODN reducía la respuesta inmunosupresora y el número de MDSC monocíticas en un modelo tumoral de CT26 en ratones (180). A diferencia de nuestro trabajo, este estudio se encuentra basado en un modelo de tumores grandes y ya establecidos, donde tanto el número de MDSC como su actividad supresora se encontraban incrementados. La ruta de administración

de CpG-ODN también es importante, ya que estos autores lo administraron de forma local y no sistémica como lo hacemos nosotros, esto altera el microambiente tumoral y es clave para reducir el número y la actividad supresora de las MDSC.

Por otro lado, Zoglmeier y colaboradores observaron que la inyección de CpG-ODN en ratones con tumor induce la expansión de células con fenotipo CD11b⁺Gr1⁺ pero no incrementa su función supresora (181). Ellos administran CpG-ODN solo, mientras que en nuestro modelo es emulsionado en IFA, el cual es un sistema de liberación sostenida en el tiempo; esta puede ser una de las razones de las diferencias observadas en nuestro estudio.

Entre otros factores, uno de los defectos del sistema inmune relacionados al envejecimiento puede ser explicado por la disminución de la respuesta proliferativa de las células T (158, 182). Nuestros resultados demuestran que esplenocitos de ratones viejos tratados con solución fisiológica presentan niveles de proliferación reducidos y luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA, la respuesta proliferativa es aún menor (Fig. 7). En los estudios de co-cultivos, las células mieloides aisladas de animales viejos tratados con CpG-ODN+IFA eran capaces de suprimir la proliferación de linfocitos T purificados de ratones jóvenes normales (Fig. 8). En una relación célula- célula, las células mieloides de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA presentan la misma capacidad para suprimir la respuesta proliferativa de las células T que las de ratones jóvenes. La actividad supresora de las MDSC de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA es

mediada por la actividad de arginasa, ya que el agregado del inhibidor de esta enzima (nor-NOHA) a los cultivos restauró casi completamente la proliferación de las células T (Fig. 14), sugiriendo que arginasa es el mecanismo principal que emplean estas células para efectuar su actividad inmunosupresora. Estos resultados se correlacionan con resultados previos donde observamos un incremento de la captación de L-arginina por las MDSC de ratones jóvenes tratados con CpG-ODN+IFA, resultando en la depleción de este aminoácido del microambiente celular (80). Con nuestros resultados, no podemos descartar que existan otros mecanismos supresores independientes del metabolismo de L-arginina que podrían ser activados en estas células, sin embargo estarían cumpliendo un rol menor en la respuesta supresora.

Numerosos trabajos han reportado que señales y factores que se encuentran en el microambiente de las MDSC pueden generar su activación induciendo diferentes mecanismos supresores. Estos factores son producidos principalmente por células T activadas, células del estroma tumoral o ser inducidos por diferentes productos virales o bacterianos (55, 183). Muchos estudios han indicado que la vía de señalización de STAT6, que se induce al activarse el receptor IL-4R α por IL-4 o IL-13 juega un importante rol en la activación de las MDSC (55, 100-101). Qualls y colaboradores demostraron que las citoquinas IL-6, IL-10 y G-CSF, que eran producidas por macrófagos infectados con *Mycobacteria*, activaban STAT3 y eran críticos para la expresión de arginasa I (162). Asimismo, son varios los estudios que han demostrado que STAT3 es uno de los principales factores de transcripción que regulan la

expansión de MDSC (55, 184-185), pero poco se conoce sobre el rol de IL-6 y STAT3 en la activación de estas células.

En este trabajo de tesis nosotros demostramos que las MDSC que provienen de ratones jóvenes y viejos tratados con CpG-ODN+IFA, poseen aumentados niveles de fosforilación de STAT3 y STAT6 (Fig. 15 y 18). El aumento en la fosforilación de estos factores de transcripción, coincide tanto con la inducción de la expresión, como de la actividad de arginasa en las MDSC de ratones tratados de ambas edades.

Con respecto al estudio de las citoquinas que podrían estar implicadas en la activación de STAT3 y STAT6, nuestros hallazgos no muestran diferencias significativas en los niveles de IL-4 en los sobrenadantes de co-cultivos de linfocitos T con células mieloides purificadas de ratones jóvenes o viejos tratados con CpG-ODN+IFA, con respecto a sus contrapartes tratadas con solución fisiológica (Fig. 16). Sin embargo, el aumento en la activación de STAT6 en las MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA se correlacionó con una mayor expresión de CD124 (IL-4R α) en estas células (Fig. 5) y lo que podría indicar que las MDSC tendrían una mayor sensibilidad frente al estímulo con cantidades similares de IL-4, resultando así en la inducción de arginasa. En concordancia con estos resultados, un reporte publicado recientemente, demostró que IL-6 actuando de forma autócrina en macrófagos, induce directamente la expresión de IL-4R α y de esta forma, colabora en la activación de STAT6 dependiente de IL-4 en estas células (161). Nuestros resultados

muestran que los sobrenadantes de co-cultivos de células mieloides de ratones CpG-ODN+IFA de ambas edades poseen niveles elevados de IL-6 (Fig. 17), lo que se correlaciona con la aumentada activación de STAT3 en estas células (Fig. 18). Nuestros hallazgos de que la neutralización de IL-4 o de IL-6 por separado conduce a una casi completa reducción de expresión y actividad de arginasa I en los cultivos de MDSC de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA, indicarían que la presencia de ambas citoquinas juntas es requerida para la inducción de arginasa en estas células. Por el contrario, en MDSC de ratones jóvenes tratados con CpG-ODN+IFA, la presencia de IL-4 o IL-6 solas es suficiente para la inducción de la expresión y la actividad de arginasa (Fig. 19-20). En este caso, IL-4 e IL-6 podrían estar actuando de manera sinérgica, ya que la actividad de arginasa en las células mieloides de ratones jóvenes tratados sólo se reduce completamente cuando ambas citoquinas se encuentran neutralizadas.

Ahora bien, es importante aclarar que nuestros estudios basados en las citoquinas que podrían estar implicadas en la activación de las MDSC de ratones tratados con CpG-ODN+IFA fueron realizados con las citoquinas del microambiente de estas células, sin factores externos agregados. En los co-cultivos de linfocitos T y células mieloides purificadas de los distintos ratones, IL-4 e IL-6 podrían estar siendo secretadas por la célula T activada, o por las mismas MDSC, y actuar de forma autócrina; este último podría ser el caso de IL-6, ya que ha sido reportado que estas células al activarse son capaces de secretarla (186). En relación a ello, si bien observamos diferente respuesta a IL-4 e IL-6 para inducir arginasa por parte de las MDSC de acuerdo a la edad del

ratón del que provenían estas células, no encontramos diferencias significativas en los niveles de IL-4 e IL-6 entre los co-cultivos de células mieloides provenientes de ratones jóvenes o viejos tratados con CpG-ODN+IFA (Fig. 16-17). No obstante, encontramos diferentes niveles de citoquinas en los cultivos de esplenocitos totales provenientes de ratones de diferentes edades tratados CpG-ODN+IFA, en los que las células mieloides se encontraban en su microambiente más fisiológico, es decir las MDSC de ratones viejos fueron cultivadas con células del mismo animal que habían contactado con señales del microambiente más inflamatorio característico de viejos. En los cultivos de esplenocitos obtenidos de ratones jóvenes a diferentes tiempos luego del tratamiento con CpG-ODN+IFA la inducción de la actividad de arginasa se acompañó siempre de aumentos importantes de IL-6. En cambio en los cultivos de esplenocitos de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA, la inducción de arginasa se acompañó de aumentos significativos en los niveles de IL-4 (Fig. 11 y 26). La relación entre estos resultados es la base para futuros estudios enfocados en las señales que reciben las células en su microambiente particular.

Hace años que se vienen estudiando los cambios que se producen durante el envejecimiento en las distintas vías de señalización intracelular involucradas en la generación de la respuesta inmune (103, 187-189). Nosotros sugerimos que, el requerimiento de las MDSC de ratones viejos tratados con CpG-ODN+IFA de que se encuentren activadas tanto la vía IL-4/STAT6 como la de IL-6/STAT-3 para inducir arginasa y por lo tanto su función supresora, a diferencia de sus

contrapartes jóvenes, podría relacionarse con los mencionados cambios en las señales de transducción asociados a la edad.

Estos resultados corroboran la idea de que la complejidad de la respuesta inmune, como las interacciones entre las funciones celulares básicas y especializadas sugieren un acto altamente equilibrado que requiere diversos controles, así como superposición o grados redundantes de modulación que permitan la eficiencia de las respuestas inmunes con el mínimo daño colateral al huésped.

Así, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis nos plantean un desafío para continuar investigando el comportamiento de las células mieloides de ratones viejos frente a diferentes estímulos implicados en su activación para evaluar su rol en la inflamación asociada a la edad avanzada.

CONCLUSIÓN GENERAL

En resumen, nuestro trabajo de tesis, añade información a la creciente evidencia que sugiere que la expansión de la población células mieloides con función supresora representan una respuesta en común a diferentes formas de inflamación.

Los ratones viejos contienen números elevados de células mieloides con fenotipo CD11b⁺Gr1⁺, posiblemente en respuesta a su estado inflamatorio basal y que luego de un estímulo inflamatorio como es CpG-ODN+IFA se expanden, durante mayor tiempo que en jóvenes, y activan su función supresora. Estas células pueden estar contribuyendo a la desregulación de la respuesta inmune que se produce durante el envejecimiento, perjudicando la capacidad de combatir eficazmente las infecciones y contribuyendo a la aumentada susceptibilidad a enfermedades inflamatorias crónicas y respuestas autoinmunes.

El estudio del envejecimiento es un tema de alto impacto social. Tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo existe un rápido crecimiento en el número de personas ancianas. Por eso la población envejecida representa nuevos y serios desafíos para la salud pública nacional e internacional. El estudio de moduladores de la respuesta inmune y sus mecanismos de acción a nivel celular y molecular sobre un sistema inmune envejecido tiene un importante interés clínico y socioeconómico.

MATERIALES Y MÉTODOS

RATONES

Se utilizaron ratones hembra BALB/c de 2-3 (jóvenes) y 18-20 (viejos) meses de edad que fueron adquiridos en la Fundación Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Experimentos puntuales fueron realizados con ratones hembra C57BL/6 de 2-3 y 18-20 meses de edad adquiridos en el mismo lugar.

Los ratones fueron mantenidos en el Bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas-UNC, donde dispusieron de alimento balanceado y agua ad libitum. Los protocolos de uso de animales estuvieron en acuerdo con la Guía para el uso y cuidado de animales de experimentación publicada por el Consejo Canadiense de Cuidado de Animales (expediente N° A5802-01) asignado por la oficina de Bienestar de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH).

Los ratones viejos fueron excluidos de los ensayos si exhibían signos de enfermedad (aletargamiento, pérdida de peso, ojos hinchados y/o con secreción), tumores visibles, esplenomegalia o alteraciones en el tamaño o apariencia de cualquier otro órgano.

OLIGODEOXINUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS

Los oligodeoxinucleótidos utilizados fueron no metilados e identificados como **1826 (CpG)**: 5'-TCCATGACGTTTCCTGACGTT-3' (Operon Technologies-Alameda, CA, USA). Las secuencias citosina-guanina (motivos CpG) aparecen

subrayadas. Estos oligonucleótidos fueron sintetizados con una cadena resistente a nucleasas con uniones fosforotioato (S-oligo) en lugar de las clásicas fosfodiéster. El fabricante indica que no contienen contaminación de endotoxinas. Para corroborarlo realizamos un ensayo estándar LAL (Limulus amoebocyte lysate) (BioWhittaker Inc, Walkersville MD, USA) que indicó que los niveles de endotoxina eran menores a 1EU/ml. La solución stock de CpG-ODN fue preparada en solución fisiológica estéril apirógena 0,9% NaCl (B. Braun Medical S.A, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina).

MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizó como medio de cultivo completo RPMI 1640 GIBCO® (Life Technologies, Buenos Aires, Argentina) suplementado con 1% de L-Alanil-L-Glutamina (GlutaMAX I™, GIBCO®), 2% de suero fetal bovino (SFB) (Natocor S.A) ó 10% de SFB (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria), 5×10^{-5} M 2 β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y antibióticos: penicilina 100 U/ml con estreptomina 100 μ g/ml (Life Technologies). Todas las células fueron incubadas en una estufa a 37 °C, atmósfera controlada con 5 % CO₂.

TRATAMIENTO DE RATONES

Para los experimentos *in vivo* los ratones recibieron una sola inyección de forma subcutánea (s.c) en 2 sitios (0,2mL/sitio) con CpG-ODN (100 μ g/ratón) emulsionado en Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), CpG-ODN+IFA. Como control se inyectaron ratones de igual edad con

solución fisiológica estéril apirógena 0,9% NaCl (B. Braun Medical S.A, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina), en determinados experimentos se realizaron controles con CpG-ODN o IFA solo. Los ratones se inyectaron 10 días antes de cada experimento y en los experimentos en que se especifica, fueron tratados 80, 40, 25 o 0 días antes.

MÉTODOS DE ENSAYO

Obtención de suspensiones celulares

1. MDSC derivadas de médula ósea:

En condiciones de esterilidad se obtuvieron los fémures, tibias y húmeros en RPMI con antibiótico sin proteínas. Se cortaron los extremos correspondientes a las articulaciones y por la cavidad medular de los huesos se hizo pasar 1 ml de RPMI 2-3 veces hasta que no quedaban restos visibles de médula en el interior del hueso. La suspensión celular así obtenida fue recogida en tubo cónico de 15 ml y centrifugada por 3 min a 2000 rpm. Las células se resuspendieron en RPMI con antibiótico, 10 % SFB y 10% del sobrenadante de cultivo de una línea celular murina transfectada como fuente de GM-CSF (equivalente a >200U/mL) y finalmente se sembraron a razón de 12×10^6 células por placa de petri bacteriológica de 100 mm de diámetro en un volumen final de 10 ml. Al día 4 se bloqueó la diferenciación y las células mieloides se recogieron en tubos cónicos, se centrifugaron, se resuspendieron en el medio de cultivo y se contaron con azul de tripán. La viabilidad debe ser de 90

% o más. Luego se estudió el fenotipo de las células obtenidas, a efectos de verificar que las mismas se produjeran en forma correcta. Al día 4 de cultivo con GM-CSF, cuando las células fueron recogidas se evaluó su fenotipo mediante el uso de anticuerpos monoclonales conjugados a diferentes fluorocromos, contra las siguientes moléculas de superficie: CD11b, Gr1, Ly6C y Ly6G. Los datos fueron adquiridos por citometría de flujo.

2. Células de bazo:

Los bazos fueron removidos quirúrgicamente y colocados en placas de Petri conteniendo RPMI con antibiótico y 2 % SFB. Las suspensiones celulares se obtuvieron por disgregación mecánica, seguido de tratamiento con buffer de lisis durante 10 min a T^o ambiente para eliminar los glóbulos rojos. Luego de 2 lavados con RPMI completo, se realizó el recuento celular con líquido de Turk. Las células así obtenidas fueron utilizadas en cultivo celular y citometría de flujo, entre otros ensayos.

3. Células de sangre periférica:

La sangre fue obtenida mediante punción retro-orbital bajo ligera anestesia con isofluorano y recogida con heparina diluida 1/10. Las células mononucleares fueron obtenidas luego de tratar las muestras con buffer de lisis durante 10 min a T^o ambiente para eliminar los glóbulos rojos, seguido de 2 lavados con RPMI completo. Las células obtenidas fueron utilizadas en citometría de flujo.

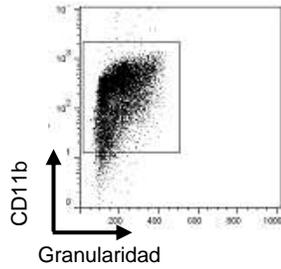
4. Células de médula ósea:

Mediante cirugía se obtuvieron un fémur y una tibia (corresponde al 10 % del total de la médula ósea) en solución buffer HBSS sin proteínas. Se cortaron los extremos correspondientes a las articulaciones y por la cavidad medular de los huesos se hizo pasar 1 mL de HBSS 2-3 veces hasta que no quedaban restos visibles de médula en el interior del hueso. La suspensión celular así obtenida fue recogida en tubo cónico de 15 mL y centrifugada por 3 min a 2000 rpm. Las células fueron resuspendidas y realizado el recuento celular con Turk. Finalmente las células fueron utilizadas en ensayos de citometría de flujo.

5. Purificación de células mieloides y linfocitos T de bazo:

La purificación de células CD11b⁺ se realizó mediante selección positiva utilizando la metodología de separación magnética (MACS). De manera similar a lo descrito anteriormente se obtuvieron esplenocitos de los ratones tratados con solución fisiológica o CpG-ODN+IFA y se lavaron en buffer PBS con 0,5 % SFB y 2mM EDTA (Buffer MACS). Las células CD11b⁺ fueron aisladas a través de microperlas magnéticas anti-CD11b (en experimentos puntuales se utilizaron anti-Gr1 como control) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). La pureza de las células CD11b⁺Gr1⁺ fue rutinariamente mayor al 95% según los datos arrojados por el análisis de citometría de flujo.

Solución Fisiológica (Fracción positiva)



CpG-ODN+IFA (Fracción positiva)

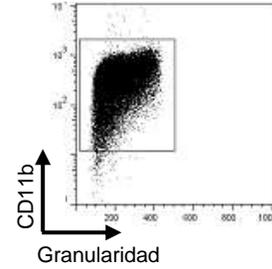


FIGURA 35. Purificación de células mieloides CD11b⁺ de bazo.

Esplenocitos fueron obtenidos de los ratones BALB/c tratados con solución fisiológica o CpG-ODN+IFA, procesados, incubados con anticuerpos anti-CD11b marcados con microperlas magnéticas y separados por MACS. Gráficos dot plot representativos donde se observa el porcentaje de células CD11b⁺ y células CD11b⁺Gr1⁺ post-separación. Las células mieloides fueron identificadas utilizando Acs anti-CD11b y anti-Gr1.

Para el aislamiento de los linfocitos T de ratones jóvenes normales utilizamos separación por fluorescencia (FACS, del inglés Fluorescence Activated Cell Sorting). Para este fin, esplenocitos totales fueron incubados con el anticuerpo anti-CD90-APC (clon 53-2.1) (BD Biosciences, San Diego, CA) por 30 min, seguido de 2 lavados con Buffer MACS y posteriormente las células fueron separadas y recogidas en FACSaria II cell sorter (Becton Dickinson Argentina S.R.L). La pureza evaluada por análisis de FACS fue habitualmente mayor al 98 %.

Cultivo celular

1. MDSC diferenciadas de médula ósea

Excepto sea indicado, 500 μ l de una suspensión 1×10^6 células/ml en RPMI sin rojo fenol suplementado con 10% SFB, 2 mM L-glutamina, 100 μ g/ml penicilina y 100 U/ml estreptomicina fueron cultivados en placas de cultivo celular de 48 pocillos (GREINER BioOne, Frickenhausen, Germany) en estufa a 37°C y 5% de saturación de CO₂ por 48 h. Los estímulos fueron agregados para alcanzar las siguientes concentraciones finales: CpG-ODN (0,3 μ M) e IFN- γ recombinante (50UI/mL). Luego de 48 hs de cultivo se realizaron lisados celulares para determinar actividad de arginasa y se recogieron los sobrenadantes para evaluar citoquinas y ON.

En los ensayos de proliferación celular, las MDSC (1×10^6 células/ml) fueron cultivados en placas de 96 pocillos en una relación 1:1 con esplenocitos de ratones normales, durante 72hs en presencia de ConA (5 μ M), o en medio sólo. La proliferación fue testada por el método de dilución de CFSE.

2. Bazo

Los esplenocitos obtenidos del procesamiento del bazo fueron resuspendidos en RPMI sin rojo fenol 2% SFB 2 mM L-glutamina, 100 μ g/ml penicilina y 100 U/ml estreptomicina, y contadas en cámara de Malazzes para evaluar su viabilidad celular. Dependiendo de los experimentos, las células fueron colocadas en placas de 96, 48 o 24 pocillos tratadas para cultivo celular, y

cultivadas con medio de cultivo o los estímulos correspondientes a cada ensayo, en una estufa a 37°C y 5 % de saturación de CO².

En los ensayos de proliferación celular, los esplenocitos (2x10⁶ células/ml) fueron cultivados en placa de 96 pocillos, durante 72hs en presencia de ConA (5μM), o en medio sólo. La proliferación celular fue testada por la incorporación de ³H-timidina.

Para determinar la actividad de arginasa y producción de ON, se realizaron cultivos de esplenocitos (2x10⁶ células/ml) en placa de 24 pocillos, durante 72hs en presencia de ConA (5μM), o en medio sólo. Luego se recogieron los sobrenadantes para determinar citoquinas y ON y se realizaron lisados para evaluar actividad de arginasa.

3. Co-cultivo de linfocitos T y células mieloides

Para los ensayos de proliferación células mieloides CD11b⁺ (1x10⁶ cel/mL) aisladas de ratones tratados con solución fisiológica o CpG-ODN+IFA fueron cultivadas en medio suplementado por triplicado en placas de 96 pocillos. Paralelamente linfocitos T CD90⁺ (1x10⁶ cel/mL) aislados de bazo de ratones jóvenes normales fueron estimulados con anti-CD3 (1μg/mL) y anti-CD28 (1μg/ml) (BD Biosciences) o solo con medio de cultivo durante 24hs. Luego las células mieloides fueron co-cultivadas con los linfocitos T (relación 1:1) durante 48hs más y la proliferación fue testada por la incorporación de ³H-timidina. En los experimentos en que se especifica, al inicio del cultivo se

agregaron 40 μM del inhibidor específico y selectivo de arginasa, nor-NOHA (Calbiochem, San Diego, CA, USA), o 200 μM del inhibidor de ON sintasa, L-NMMA, (Calbiochem, San Diego, CA, USA) .

Para la determinación de arginasa, células mieloides CD11b⁺ (2×10^6 cel/mL) aisladas de ratones tratados con solución fisiológica o CpG-ODN+IFA fueron cultivadas en medio suplementado en placas de 48 pocillos. Paralelamente linfocitos T CD90⁺ (2×10^6 cel/mL) aislados de bazo de ratones jóvenes normales fueron estimulados con anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (BD Biosciences) o solo con medio de cultivo durante 24hs. Luego las células mieloides fueron co-cultivadas con los linfocitos T (relación 1:1) durante 48hs más y al cabo de ese tiempo se realizaron los lisados celulares para determinar la actividad de arginasa y se recogieron sobrenadantes para determinar citoquinas. Para evaluar la expresión intracelular de arginasa I, se realizaron cultivos similares pero las células mieloides fueron co-cultivadas con los linfocitos T durante 24hs, luego se recogieron para evaluar la expresión de arginasa I por citometría de flujo. En los experimentos en que se indica, al inicio del cultivo fueron agregados anticuerpos neutralizantes anti-IL-4 (NA/LE, clon 11B11) a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, anti-IL-6 (NA/LE clon MP5-20F3) a una concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, NA/LE y anti-IL-10 (NA/LE clon JES5-2A5) a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y anti-IgG de raton como control de isotipo (eBioscience, San Diego, CA, USA). Se controló la neutralización de las citoquinas en los sobrenadantes de los co-cultivos midiendo sus concentraciones por ELISA de captura.

Para la determinación de la expresión de pSTAT3 y pSTAT6, células mieloides CD11b⁺ (1x10⁶cel/mL) aisladas de ratones tratados con solución fisiológica o CpG-ODN+IFA fueron cultivadas en medio suplementado por triplicado en placas de 96 pocillos. Paralelamente linfocitos T CD90⁺ (1x10⁶ cel/mL) aislados de bazo de ratones jóvenes normales fueron estimulados con anti-CD3 (1µg/mL) y anti-CD28 (1µg/mL) (BD Biosciences) o solo con medio de cultivo durante 24hs. Luego las células mieloides fueron co-cultivadas con los linfocitos T (relación 1:1) durante 30, 90 o 240 min más y al cabo de ese tiempo se determinó la expresión de pSTAT3 y pSTAT6 por citometría de flujo intracelular.

Proliferación celular

1. Incorporación de Timidina tritiada

Los cultivos celulares fueron pulsados por un periodo de 18 h con 1 µCi de ³H-timidina. Posteriormente las células son recolectadas, los núcleos celulares son retenidos por filtración de papel de fibra de vidrio y la timidina radioactiva incorporada al ADN fue cuantificada en un contador de centelleo líquido.

2. Método de dilución de CFSE

Previamente a ser estimuladas y cultivadas, esplenocitos fueron teñidos con CFSE a una concentración de 5 µM durante 10 min a 37 °C. Durante cada división de la célula, la intensidad relativa de la fluorescencia es disminuida por

la mitad. Las células obtenidas de cultivo son lavadas, marcadas para citometría de flujo con anti-CD3 para identificar a los linfocitos T y previamente a la adquisición se agrega 7-AAD (BD Biosciences) para excluir a las células muertas. Así, la división celular fue evidenciada por la dilución del CFSE y analizada por FACS en la región de los linfocitos T CD3⁺ después de 72 hs de cultivo.

Citometría de Flujo

1. Determinación de Acs de superficie

Aproximadamente 1×10^6 células fueron incubadas con anticuerpos anti-CD16/CD32 (para bloquear la unión inespecífica de los Acs a los receptores de la porción Fc de las inmunoglobulinas) más los anticuerpos monoclonales correspondientes (disueltos de acuerdo a concentraciones preestablecidas en la solución tampón para citometría: HBSS 2% SFB 5 mM EDTA y 0,1% de azida sódica) durante 30 min a 4°C. Se lavó con la solución tampón a 4°C. Cuando se utilizó un anticuerpo marcado con biotina se realizó una incubación mas por 30 min a 4°C para efectuar la marca con la estreptoavidina adecuada marcada con un fluorocromo.

2. Ensayo de apoptosis

Esplenocitos totales (1×10^6 células/mL) fueron cultivados en placa de 96 pocillos como se describió anteriormente en medio suplementado durante 6 o 18hs en una estufa a 37°C y 5 % de saturación de CO₂. Luego se centrifugó, y el pellet se marcó con anticuerpos de superficie anti-CD11b y anti-Gr1, se incubó

30 min a 4°C. Las células se centrifugaron y al pellet se lo marcó con TMRE (50nm) (Invitrogen) durante 30 min en estufa a 37°C y al cabo de ese tiempo se evaluó la despolarización mitocondrial por citometría de flujo. Esplenocitos incubados con 100 μ M de FCCP (carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone) fueron utilizados como control positivo.

3. Determinación intracelular de Arginasa I

Esplenocitos totales o células mieloides previamente purificadas fueron cultivadas como se indicó anteriormente durante 24 o 48hs y fueron marcadas con anticuerpos de superficie anti-CD11b y anti-Gr1 durante 30 min a 4°C. Luego las células fueron fijadas y permeabilizadas utilizando BD Cytotfix/Cytoperm™ Plus Kit (Becton Dickinson Argentina SRL) e incubadas con el anticuerpo anti-arginasa I (clon 8C9) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA,USA) o su control de isotipo durante 30min a 4°C y la expresión de arginasa I fue evaluada en la población de células mieloides mediante citometría de flujo.

4. Determinación intracelular de la expresión de pSTAT3 y pSTAT6

Células mieloides previamente purificadas fueron cultivadas como se describió anteriormente y luego de 0, 30, 90 o 240 min de co-cultivo se recogieron y fueron fijadas con 2% paraformaldehído por 10 min a at 37°C y permeabilizadas con metanol por 30 minutos a 4°C. Luego las células fueron lavadas y teñidas con anti-CD11b, anti-Gr1 y con anti-Stat6 (pY641) o anti-Stat3

(pY705) (Becton Dickinson Argentina) durante 30min. La expresión de pSTAT3 y pSTAT6 se evaluó a los distintos tiempos en la población de células mieloides por citometría de flujo. Células estimuladas con IL-6 (100ng/mL) o con IL-4 (10ng/mL) fueron usadas como control positivo.

En todos los casos las células fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson Argentina S.R.L). Finalmente, los datos obtenidos se analizaron con el programa FlowJo (Tree Star, Inc.).

**TABLA 1: ANTICUERPOS DE SUPERFICIE CELULAR EMPLEADOS EN
CITOMETRÍA DE FLUJO**

ESPECIFICIDAD	CLON	EMPRESA/ORIGEN
CD3e	145-2C11	BD Biosciences
CD32/CD16	2.4G2	Hibridoma
CD11b (Mac-1)	M1/70	Hibridoma/BD Biosciences
Gr-1	RB6-8C5	BD Biosciences
Ly6 G	1A8	BD Biosciences
Ly6C	AL-21	BD Biosciences
CD124 (IL-4R)	mIL4R-M1	BD Biosciences
CD31	390	BD Biosciences
CD86 (B7.2)	GL-1	BD Biosciences
MHC II	2G9	BD Biosciences
F4/80	Cl:A3-1	Molecular Probes
CD11c	HL-3	BD Biosciences

Hibridoma: en nuestro laboratorio obtuvimos los sobrenadantes de distintos hibridomas y conjugamos con FITC o biotina las proteínas purificadas a partir de ellos.

Determinación de citoquinas mediante un ELISA sándwich

Placas de 96 pocillos “high-binding” fondo plano para microtécnica fueron sensibilizadas con 25 µl de anticuerpo de captura específico para la citoquina a determinar, diluído en un buffer fosfato, durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Al día siguiente, los pocillos fueron bloqueados con 100 µl de buffer de bloqueo (PBS/10%SFB) durante 90 min a temperatura ambiente. Luego de cuatro lavados con PBS/Tween 0,05%, se agregaron 50 µl del sobrenadante de cultivo o de lavado peritoneal de las muestras problemas. En paralelo se realizó la curva del testigo con 50µl de diluciones seriadas de una solución de la citoquina recombinante de interés de concentración conocida. Se incubó durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Se realizaron cinco lavados y se incubó con 50 µl de anticuerpo de detección biotilado por 90 min a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron seis lavados y se agregaron 50 µl de estreptavidina marcada con peroxidasa (BD Biosciences). La presencia de peroxidasa fue revelada con el reactivo BD OptEIA™ TMB Substrate-Chromogen (BD Biosciences).

TABLA 2: ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA ELISA DE CITOQUINAS

ESPECIFICIDAD	CLON	FUNCIÓN	EMPRESA/ORIGEN
IFN- γ	R4-6A2	Captura	BD Biosciences
	XMG1.2	Biotinilado	
IL-10	JES-52A5	Captura	BD Biosciences
	JES5-16E3	Biotinilado	
IL-4	11B11	Captura	BD Biosciences
	BVD6-24G2	Biotinilado	
IL-6	MP5-20F3	Captura	eBiosciences
	MP5-32C11	Biotinilado	

Determinación de la actividad de arginasa

La actividad de la enzima arginasa se determinó en lisados celulares como previamente describió Corraliza y col (159).

Obtención del lisado: las células se lisaron con 50-100 μ l de Tritón X-100 al 0,1 % en PBS con inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). Todo se agitó durante 30 min a T^o ambiente. Las muestras así obtenidas se almacenaron a -20°C.

Activación de la enzima: se mezclaron volúmenes iguales de muestra y de una solución 10 mM de $MnCl_2$ en Tris-HCl 50 mM (generalmente 12,5 μ l de cada una) y se llevó a 56°C por 10 min.

Hidrólisis de L-arginina: a la mezcla anterior se le agregaron 25 μ l de L-arginina 0,5M pH 9,7 y se incubó a 37°C durante 45 min. La reacción fue frenada por el agregado de 400 μ l de una mezcla de ácidos conteniendo H_2SO_4 (96 %), H_3PO_4 (85 %) y H_2O (1/3/7, v/v/v).

Reacción de color: la urea producida se detectó tras el agregado de 25 μ l de α -isonitrosopropiofenona (ISPF) y calentamiento a ebullición por 45 min. El color generado en esta reacción se midió a una longitud de onda de 540 nm. En paralelo se realizó una curva de calibración utilizando una solución de urea de concentración conocida. Los resultados se expresaron como unidades (U) de arginasa normalizados en función de los mg de proteínas presentes en el lisado respectivo. Se define una unidad como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un μ mol de urea por minuto.

Determinación de la producción de ON

En presencia de oxígeno y agua, el ON producido reacciona para dar los metabolitos estables nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). La medición de NO_2^- por el método de Griess, aunque de manera indirecta, es entonces un indicador de la cantidad de ON producido.

En placa de 96 pocillos se mezclaron 100 μ l de las muestras más 200 μ l del reactivo de Griess recién preparado (ver soluciones). En paralelo se realizó una curva de calibración con un testigo de nitrito de sodio. Después de 10min de incubación a T^o ambiente se midió la densidad óptica de la reacción a 540 nm. Los resultados se expresaron como concentración μ M de los nitritos producidos.

Determinación de proteínas

Las proteínas de los lisados celulares fueron determinadas por el método de Bradford. Brevemente, 10 μ l de las muestras reaccionaron con 200 μ l del reactivo BioRad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, USA) por 10 min a T^o ambiente. La densidad óptica fue leída a 595 nm y la concentración de proteínas fue determinada en función de una curva de calibración realizada con un testigo de albúmina sérica bovina.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism versión 5.00 (Graph-Pad Software, San Diego, CA). Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. Se utilizó ANOVA de dos vías seguido del post test de Bonferroni o ANOVA de una vía seguido del post test de Tukey para comparaciones múltiples. Para comparar dos grupos se utilizó la prueba t de Student. Todas las diferencias fueron consideradas como estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

SOLUCIONES

1. SOLUCIONES BUFFER

A. Solución buffer salino de fosfatos (PBS) pH 7,2-7,4

NaCl..... 7,20 g

KH₂PO₄..... 0,43 g

Na₂HPO₄.2H₂O14,80 g

H₂O..... c.s.p. 1000 ml

B. Solución salina balanceada de Hank's (HBSS)

KCl 0,40 g

KH₂PO₄ 0,06 g

Na₂HPO₄..... 0,05 g

NaCl..... 8,00 g

Glucosa 1,00 g

H₂O..... c.s.p. 1000 ml

2. SOLUCIONES UTILIZADAS PARA CONTAR CÉLULAS

Líquido de Turk

Solución de violeta de genciana o azul de metileno en ácido acético glacial al 3 % en H₂O.

Azul de Tripán para determinar viabilidad celular

Solución A: 0,05 % de Azul de Trypan en H₂O.

Solución B: 0,425 % de NaCl en H₂O.

Solución de trabajo: 1 ml de (B) más 4 ml de (A) más 45 ml de PBS 1X.

3. MEDIOS DE CULTIVO

RPMI 1640 sin rojo fenol (GIBCO, número de catálogo: 11879020).

4. SOLUCIONES MADRES UTILIZADAS EN CITOMETRÍA DE FLUJO

a. EDTA (Cicarrelli)

Solución 0,5 M en H₂O, pH 8.

b. Azida sódica (Sigma-Aldrich)

Solución 10 % en H₂O.

c. Kit de Fijación/Permeabilización BD Cytotfix/Cytoperm™ Plus (BD, número de catálogo: 554715).

d. Buffer de fijación: P- formaldehído al 2% en PBS

e. Buffer de Permeabilización: Metanol al 90% en PBS

5. SOLUCIONES UTILIZADAS PARA MEDICIONES DE CITOQUINAS POR ELISA

a. *Buffer fosfato pH 9 (Sensibilización)*

Solución A: 0,1 M de Na₂HPO₄ en H₂O.

Solución B: 0,1 M de NaH₂PO₄ en H₂O.

Ajustar el pH de la solución A a pH=9 con la solución B.

b. Solución de bloqueo

PBS con SFB al 10 %. Filtrar con membrana de 0,22 μ m.

c. Solución de lavado

PBS con Tween 20 al 0,05 %.

d. Solución para diluir las muestras

PBS con SFB al 10 % más Tween 20 al 0,05 %.

6. SOLUCIONES UTILIZADAS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE ARGINASA

Solución de lisado: Tritón X 100 0,5 % en PBS. En el momento de trabajar se agregan 10 μ l de la mezcla de inhibidores de proteasas por cada ml de solución.

Soluciones para la activación de la enzima:

-Solución A: Tris-HCl 50 mM

Diluir una parte de una solución madre 0,2 M de TRIZMA (PM 121,1) en 4 partes de H₂O. Antes de enrasar llevar el pH a 7,5 con HCl 1N.

-Solución B: MnCl₂ 2,5 M

MnCl₂·4H₂O 9,89 g

H₂O c.s.p 10 ml

-Solución de trabajo: Tris-HCl 50mM + MnCl₂ 10 mM

Mezclar 10 ml de (A) más 40 μ l de (B)

L-arginina (Sigma-Aldrich) (PM 210,7): 0,5M. Ajustar pH a 9,7 con NaOH 1N. Alicuotar y mantener a -20°C.

α-isonitrosopropiofenona (ISPF) (Sigma-Aldrich): 9% en etanol absoluto. Conservar a 4°C.

Mezcla de ácidos: H₂SO₄: H₃PO₄: H₂O (1:3:7)

H₂SO₄..... 9 ml

H₃PO₄.....27 ml

H₂O 64 ml

Solución testigo de urea (PM 60,06): 0,1 M (0,6g%).

7. SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ON

Solución A: Sulfanilamida (Sigma-Aldrich) al 1% en H₃PO₄ al 5%.

El H₃PO₄ puro es 85%, por lo tanto, para preparar 100 ml de la solución al 5 %, se toman 5,88 mL y se diluye en H₂O.

Solución B: N-(1-Naftil) etil-enediamina (Sigma-Aldrich) al 0,1% en H₂O. Se almacenan en frascos de vidrio a 4° C.

Reactivo de Griess: en el momento de trabajar mezclar en partes iguales soluciones A y B.

Solución testigo de NaNO₂ (PM 69): 10 mM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Effros RB. Role of T lymphocyte replicative senescence in vaccine efficacy. *Vaccine*. 2007 Jan 8;25(4):599-604.
2. Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E, Signer RA. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat Rev Immunol*. 2009 Jan;9(1):57-62.
3. Munoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Jul;15(7):482-96.
4. Goronzy JJ, Weyand CM. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nat Immunol*. 2013 May;14(5):428-36.
5. Geiger H, de Haan G, Florian MC. The ageing haematopoietic stem cell compartment. *Nat Rev Immunol*. 2013 May;13(5):376-89.
6. Beerman I, Maloney WJ, Weissmann IL, Rossi DJ. Stem cells and the aging hematopoietic system. *Curr Opin Immunol*. 2010 Aug;22(4):500-6.
7. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 28;102(26):9194-9.
8. Kim M, Moon HB, Spangrude GJ. Major age-related changes of mouse hematopoietic stem/progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 May;996:195-208.
9. Morrison SJ, Wandycz AM, Akashi K, Globerson A, Weissman IL. The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 1996 Sep;2(9):1011-6.
10. Sudo K, Ema H, Morita Y, Nakauchi H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2000 Nov 6;192(9):1273-80.
11. Challen GA, Boles NC, Chambers SM, Goodell MA. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. *Cell Stem Cell*. 2010 Mar 5;6(3):265-78.
12. Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*. 2007 Jun 7;447(7145):725-9.
13. Zimmermann S, Martens UM. Telomeres, senescence, and hematopoietic stem cells. *Cell Tissue Res*. 2008 Jan;331(1):79-90.
14. Fagnoni FF, Vescovini R, Passeri G, Bologna G, Pedrazzoni M, Lavagetto G, et al. Shortage of circulating naive CD8(+) T cells provides new insights on immunodeficiency in aging. *Blood*. 2000 May 1;95(9):2860-8.
15. Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology*. 2007 Apr;120(4):435-46.
16. Akbar AN, Fletcher JM. Memory T cell homeostasis and senescence during aging. *Curr Opin Immunol*. 2005 Oct;17(5):480-5.
17. Min H, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Effects of aging on the common lymphoid progenitor to pro-B cell transition. *J Immunol*. 2006 Jan 15;176(2):1007-12.
18. Miller JP, Allman D. The decline in B lymphopoiesis in aged mice reflects loss of very early B-lineage precursors. *J Immunol*. 2003 Sep 1;171(5):2326-30.
19. Johnson KM, Owen K, Witte PL. Aging and developmental transitions in the B cell lineage. *Int Immunol*. 2002 Nov;14(11):1313-23.
20. Ogawa T, Kitagawa M, Hirokawa K. Age-related changes of human bone marrow: a histometric estimation of proliferative cells, apoptotic cells, T cells, B cells and macrophages. *Mech Ageing Dev*. 2000 Aug 15;117(1-3):57-68.
21. Colonna-Romano G, Aquino A, Bulati M, Di Lorenzo G, Listi F, Vitello S, et al. Memory B cell subpopulations in the aged. *Rejuvenation Res*. 2006 Spring;9(1):149-52.

22. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B. The aging of the immune system. *Transpl Int.* 2009 Nov;22(11):1041-50.
23. Haynes L, Swain SL. Why aging T cells fail: implications for vaccination. *Immunity.* 2006 Jun;24(6):663-6.
24. Colonna-Romano G, Akbar AN, Aquino A, Bulati M, Candore G, Lio D, et al. Impact of CMV and EBV seropositivity on CD8 T lymphocytes in an old population from West-Sicily. *Exp Gerontol.* 2007 Oct;42(10):995-1002.
25. Czesnikiewicz-Guzik M, Lee WW, Cui D, Hiruma Y, Lamar DL, Yang ZZ, et al. T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clin Immunol.* 2008 Apr;127(1):107-18.
26. Miller RA. Effect of aging on T lymphocyte activation. *Vaccine.* 2000 Feb 25;18(16):1654-60.
27. Chakravarti B. T-cell signaling--effect of age. *Exp Gerontol.* 2001 Dec;37(1):33-9.
28. Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* 2004 Feb;5(2):133-9.
29. Ginaldi L, De Martinis M, Modesti M, Loreto F, Corsi MP, Quagliano D. Immunophenotypical changes of T lymphocytes in the elderly. *Gerontology.* 2000 Sep-Oct;46(5):242-8.
30. Murasko DM, Weiner P, Kaye D. Decline in mitogen induced proliferation of lymphocytes with increasing age. *Clin Exp Immunol.* 1987 Nov;70(2):440-8.
31. Pape KA, Khoruts A, Mondino A, Jenkins MK. Inflammatory cytokines enhance the in vivo clonal expansion and differentiation of antigen-activated CD4+ T cells. *J Immunol.* 1997 Jul 15;159(2):591-8.
32. Linton PJ, Haynes L, Tsui L, Zhang X, Swain S. From naive to effector--alterations with aging. *Immunol Rev.* 1997 Dec;160:9-18.
33. Sandmand M, Bruunsgaard H, Kemp K, Andersen-Ranberg K, Pedersen AN, Skinhoj P, et al. Is ageing associated with a shift in the balance between Type 1 and Type 2 cytokines in humans? *Clin Exp Immunol.* 2002 Jan;127(1):107-14.
34. Shearer GM. Th1/Th2 changes in aging. *Mech Ageing Dev.* 1997 Mar;94(1-3):1-5.
35. Maletto B, Ropolo A, Moron V, Pistoiesi-Palencia MC. CpG-DNA stimulates cellular and humoral immunity and promotes Th1 differentiation in aged BALB/c mice. *J Leukoc Biol.* 2002 Sep;72(3):447-54.
36. Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013 Dec;13(12):875-87.
37. Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E, Fanales-Belasio E, Ortolani C, Cozzi E, et al. Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol.* 1993 Sep;23(9):2375-8.
38. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Jun;908:244-54.
39. Chatta GS, Price TH, Stratton JR, Dale DC. Aging and marrow neutrophil reserves. *J Am Geriatr Soc.* 1994 Jan;42(1):77-81.
40. Seidler S, Zimmermann HW, Bartneck M, Trautwein C, Tacke F. Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults. *BMC Immunol.* 2010;11:30.
41. Butcher SK, Chahal H, Nayak L, Sinclair A, Henriquez NV, Sapey E, et al. Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *J Leukoc Biol.* 2001 Dec;70(6):881-6.
42. Simell B, Vuorela A, Ekstrom N, Palmu A, Reunanen A, Meri S, et al. Aging reduces the functionality of anti-pneumococcal antibodies and the killing of *Streptococcus pneumoniae* by neutrophil phagocytosis. *Vaccine.* 2011 Feb 24;29(10):1929-34.

43. Fortin CF, McDonald PP, Lesur O, Fulop T, Jr. Aging and neutrophils: there is still much to do. *Rejuvenation Res.* 2008 Oct;11(5):873-82.
44. Tortorella C, Simone O, Piazzolla G, Stella I, Cappiello V, Antonaci S. Role of phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways in granulocyte macrophage-colony-stimulating factor failure to delay fas-induced neutrophil apoptosis in elderly humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2006 Nov;61(11):1111-8.
45. Nogusa S, Murasko DM, Gardner EM. Differential effects of stimulatory factors on natural killer cell activities of young and aged mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2012 Sep;67(9):947-54.
46. Chornoguz O, Grmai L, Sinha P, Artemenko KA, Zubarev RA, Ostrand-Rosenberg S. Proteomic pathway analysis reveals inflammation increases myeloid-derived suppressor cell resistance to apoptosis. *Mol Cell Proteomics.* 2011 Mar;10(3):M110002980.
47. Almeida-Oliveira A, Smith-Carvalho M, Porto LC, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro Ados S, Falcao RR, et al. Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Hum Immunol.* 2011 Apr;72(4):319-29.
48. Chidrawar SM, Khan N, Chan YL, Nayak L, Moss PA. Ageing is associated with a decline in peripheral blood CD56bright NK cells. *Immun Ageing.* 2006;3:10.
49. Birjandi SZ, Ippolito JA, Ramadorai AK, Witte PL. Alterations in marginal zone macrophages and marginal zone B cells in old mice. *J Immunol.* 2011 Mar 15;186(6):3441-51.
50. Liang S, Domon H, Hosur KB, Wang M, Hajishengallis G. Age-related alterations in innate immune receptor expression and ability of macrophages to respond to pathogen challenge in vitro. *Mech Ageing Dev.* 2009 Aug;130(8):538-46.
51. Hearps AC, Martin GE, Angelovich TA, Cheng WJ, Maisa A, Landay AL, et al. Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function. *Aging Cell.* 2012 Oct;11(5):867-75.
52. Grolleau-Julius A, Harning EK, Abernathy LM, Yung RL. Impaired dendritic cell function in aging leads to defective antitumor immunity. *Cancer Res.* 2008 Aug 1;68(15):6341-9.
53. Clark HL, Banks R, Jones L, Hornick TR, Higgins PA, Burant CJ, et al. Characterization of MHC-II antigen presentation by B cells and monocytes from older individuals. *Clin Immunol.* 2012 Aug;144(2):172-7.
54. Gabilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol.* 2012 Apr;12(4):253-68.
55. Gabilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009 Mar;9(3):162-74.
56. Buessow SC, Paul RD, Lopez DM. Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice. *J Natl Cancer Inst.* 1984 Jul;73(1):249-55.
57. Subiza JL, Vinuela JE, Rodriguez R, Gil J, Figueredo MA, De La Concha EG. Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice. *Int J Cancer.* 1989 Aug 15;44(2):307-14.
58. Young MR, Newby M, Wepsic HT. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res.* 1987 Jan 1;47(1):100-5.
59. Seung LP, Rowley DA, Dubey P, Schreiber H. Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jul 3;92(14):6254-8.

60. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 2008 Oct 15;181(8):5791-802.
61. Ribechini E, Greifenberg V, Sandwick S, Lutz MB. Subsets, expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells. *Med Microbiol Immunol*. 2010 Aug;199(3):273-81.
62. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2006 Mar;55(3):237-45.
63. Movahedi K, Guilliams M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):4233-44.
64. Yang R, Cai Z, Zhang Y, Yutzy WH, Roby KF, Roden RB. CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer Res*. 2006 Jul 1;66(13):6807-15.
65. Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res*. 2006 Jan 15;66(2):1123-31.
66. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Colombo MP, et al. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest*. 2006 Oct;116(10):2777-90.
67. Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother*. 2007 May;56(5):739-45.
68. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, Coco D, Nagaraj S, Kelly-Scumpia KM, et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1463-74.
69. Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moreno C, Scumpia PO, Laface DM, et al. A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol Med*. 2011 Mar-Apr;17(3-4):281-92.
70. Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol*. 2001 Jan 1;166(1):678-89.
71. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, et al. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res*. 2005 Apr 15;65(8):3044-8.
72. Talmadge JE, Gabrilovich DI. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer*. 2013 Oct;13(10):739-52.
73. Poschke I, Mougiakakos D, Hansson J, Masucci GV, Kiessling R. Immature immunosuppressive CD14+HLA-DR-/low cells in melanoma patients are Stat3hi and overexpress CD80, CD83, and DC-sign. *Cancer Res*. 2010 Jun 1;70(11):4335-45.
74. Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, et al. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol*. 2007 Jun 20;25(18):2546-53.
75. Ko JS, Zea AH, Rini BI, Ireland JL, Elson P, Cohen P, et al. Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res*. 2009 Mar 15;15(6):2148-57.

76. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, et al. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res.* 2009 Feb 15;69(4):1553-60.
77. Pan PY, Ma G, Weber KJ, Ozao-Choy J, Wang G, Yin B, et al. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res.* 2010 Jan 1;70(1):99-108.
78. Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, Borrello I. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res.* 2008 Jul 1;68(13):5439-49.
79. Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res.* 2004 Aug 15;64(16):5839-49.
80. Ranocchia RP, Gorlino CV, Crespo MI, Harman MF, Liscovsky MV, Moron G, et al. Arginase-dependent suppression by CpG-ODN plus IFA-induced splenic myeloid CD11b(+)Gr1(+) cells. *Immunol Cell Biol.* 2012 Aug;90(7):710-21.
81. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.* 2010 Jan 1;70(1):68-77.
82. Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* 2001 Jun 15;61(12):4756-60.
83. Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, Serafini P, et al. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol.* 2002 Jan 15;168(2):689-95.
84. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med.* 2007 Jul;13(7):828-35.
85. Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol.* 2009 Jul 15;183(2):937-44.
86. Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, et al. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J Exp Med.* 2011 Sep 26;208(10):1949-62.
87. Sakuishi K, Jayaraman P, Behar SM, Anderson AC, Kuchroo VK. Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity. *Trends Immunol.* 2011 Aug;32(8):345-9.
88. Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol.* 2009 Jan 1;182(1):240-9.
89. Pan PY, Wang GX, Yin B, Ozao J, Ku T, Divino CM, et al. Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood.* 2008 Jan 1;111(1):219-28.
90. Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2007 May 1;67(9):4507-13.
91. Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-

- derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res.* 2007 Oct 15;67(20):10019-26.
92. Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, Ran S, Kravtsov V, Nadaf S, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood.* 1998 Dec 1;92(11):4150-66.
 93. Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest.* 2002 May;109(9):1139-42.
 94. Nefedova Y, Nagaraj S, Rosenbauer A, Muro-Cacho C, Sebt SM, Gabrilovich DI. Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res.* 2005 Oct 15;65(20):9525-35.
 95. Corzo CA, Cotter MJ, Cheng P, Cheng F, Kusmartsev S, Sotomayor E, et al. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.* 2009 May 1;182(9):5693-701.
 96. Zhang H, Nguyen-Jackson H, Panopoulos AD, Li HS, Murray PJ, Watowich SS. STAT3 controls myeloid progenitor growth during emergency granulopoiesis. *Blood.* 2010 Oct 7;116(14):2462-71.
 97. Marigo I, Bosio E, Solito S, Mesa C, Fernandez A, Dolcetti L, et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity.* 2010 Jun 25;32(6):790-802.
 98. Martino A, Badell E, Abadie V, Balloy V, Chignard M, Mistou MY, et al. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin vaccination mobilizes innate myeloid-derived suppressor cells restraining in vivo T cell priming via IL-1R-dependent nitric oxide production. *J Immunol.* 2010 Feb 15;184(4):2038-47.
 99. Greifenberg V, Ribechini E, Rossner S, Lutz MB. Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN-gamma treatment impairs DC development. *Eur J Immunol.* 2009 Oct;39(10):2865-76.
 100. Bronte V, Serafini P, Mazzoni A, Segal DM, Zanovello P. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol.* 2003 Jun;24(6):302-6.
 101. Rutschman R, Lang R, Hesse M, Ihle JN, Wynn TA, Murray PJ. Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J Immunol.* 2001 Feb 15;166(4):2173-7.
 102. Bunt SK, Clements VK, Hanson EM, Sinha P, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4. *J Leukoc Biol.* 2009 Jun;85(6):996-1004.
 103. Enioutina EY, Bareyan D, Daynes RA. A role for immature myeloid cells in immune senescence. *J Immunol.* 2011 Jan 15;186(2):697-707.
 104. Heithoff DM, Enioutina EY, Bareyan D, Daynes RA, Mahan MJ. Conditions that diminish myeloid-derived suppressor cell activities stimulate cross-protective immunity. *Infect Immun.* 2008 Nov;76(11):5191-9.
 105. Grizzle WE, Xu X, Zhang S, Stockard CR, Liu C, Yu S, et al. Age-related increase of tumor susceptibility is associated with myeloid-derived suppressor cell mediated suppression of T cell cytotoxicity in recombinant inbred BXD12 mice. *Mech Ageing Dev.* 2007 Nov-Dec;128(11-12):672-80.
 106. Hurez V, Daniel BJ, Sun L, Liu AJ, Ludwig SM, Kious MJ, et al. Mitigating age-related immune dysfunction heightens the efficacy of tumor immunotherapy in aged mice. *Cancer Res.* 2012 Apr 15;72(8):2089-99.

107. Morris SM, Jr. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br J Pharmacol.* 2009 Jul;157(6):922-30.
108. Boucher JL, Moali C, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci.* 1999 Jul;55(8-9):1015-28.
109. Raber P, Ochoa AC, Rodriguez PC. Metabolism of L-arginine by myeloid-derived suppressor cells in cancer: mechanisms of T cell suppression and therapeutic perspectives. *Immunol Invest.* 2012;41(6-7):614-34.
110. Closs EI, Simon A, Vekony N, Rotmann A. Plasma membrane transporters for arginine. *J Nutr.* 2004 Oct;134(10 Suppl):2752S-9S; discussion 65S-67S.
111. Amber IJ, Hibbs JB, Jr., Parker CJ, Johnson BB, Taintor RR, Vavrin Z. Activated macrophage conditioned medium: identification of the soluble factors inducing cytotoxicity and the L-arginine dependent effector mechanism. *J Leukoc Biol.* 1991 Jun;49(6):610-20.
112. Morris SM, Jr. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:87-105.
113. Cederbaum SD, Yu H, Grody WW, Kern RM, Yoo P, Iyer RK. Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol Genet Metab.* 2004 Apr;81 Suppl 1:S38-44.
114. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol.* 2001 Dec 1;167(11):6533-44.
115. Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol.* 1998 Jun 1;160(11):5347-54.
116. Jost MM, Ninci E, Meder B, Kempf C, Van Royen N, Hua J, et al. Divergent effects of GM-CSF and TGFbeta1 on bone marrow-derived macrophage arginase-1 activity, MCP-1 expression, and matrix metalloproteinase-12: a potential role during arteriogenesis. *FASEB J.* 2003 Dec;17(15):2281-3.
117. Rodriguez PC, Zea AH, DeSalvo J, Culotta KS, Zabaleta J, Quiceno DG, et al. L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J Immunol.* 2003 Aug 1;171(3):1232-9.
118. Chicoine LG, Paffett ML, Young TL, Nelin LD. Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004 Jul;287(1):L60-8.
119. Zhang C, Hein TW, Wang W, Miller MW, Fossum TW, McDonald MM, et al. Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Hypertension.* 2004 Dec;44(6):935-43.
120. Santhanam L, Lim HK, Miriel V, Brown T, Patel M, Balanson S, et al. Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction. *Circ Res.* 2007 Sep 28;101(7):692-702.
121. Peranzoni E, Marigo I, Dolcetti L, Ugel S, Sonda N, Taschin E, et al. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. *Immunobiology.* 2007;212(9-10):795-812.
122. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol.* 2005 Aug;5(8):641-54.
123. Harari O, Liao JK. Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and antioxidants. *Curr Pharm Des.* 2004;10(8):893-8.

124. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood*. 2007 Feb 15;109(4):1568-73.
125. Brito C, Naviliat M, Tiscornia AC, Vuillier F, Gualco G, Dighiero G, et al. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J Immunol*. 1999 Mar 15;162(6):3356-66.
126. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001 Aug;2(8):675-80.
127. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
128. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):783-801.
129. Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst*. 1984 Apr;72(4):955-62.
130. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 1995 Apr 6;374(6522):546-9.
131. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000 Dec 7;408(6813):740-5.
132. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):987-95.
133. Li J, Ma Z, Tang ZL, Stevens T, Pitt B, Li S. CpG DNA-mediated immune response in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Sep;287(3):L552-8.
134. Platz J, Beisswenger C, Dalpke A, Koczulla R, Pinkenburg O, Vogelmeier C, et al. Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *J Immunol*. 2004 Jul 15;173(2):1219-23.
135. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2660-9.
136. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Jun;5(6):471-84.
137. Vollmer J. CpG motifs to modulate innate and adaptive immune responses. *Int Rev Immunol*. 2006 May-Aug;25(3-4):125-34.
138. Krieg AM. CpG still rocks! Update on an accidental drug. *Nucleic Acid Ther*. 2012 Apr;22(2):77-89.
139. Hacker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, et al. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J*. 1998 Nov 2;17(21):6230-40.
140. Lahoud MH, Ahmet F, Zhang JG, Meuter S, Policheni AN, Kitsoulis S, et al. DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 2;109(40):16270-5.
141. Park B, Buti L, Lee S, Matsuwaki T, Spooner E, Brinkmann MM, et al. Granulin is a soluble cofactor for toll-like receptor 9 signaling. *Immunity*. 2011 Apr 22;34(4):505-13.
142. Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol*. 2012 Mar;12(3):168-79.

143. Hanagata N. Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2181-95.
144. Klinman DM. Adjuvant activity of CpG oligodeoxynucleotides. *Int Rev Immunol*. 2006 May-Aug;25(3-4):135-54.
145. Ioannou XP, Gomis SM, Karvonen B, Hecker R, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. CpG-containing oligodeoxynucleotides, in combination with conventional adjuvants, enhance the magnitude and change the bias of the immune responses to a herpesvirus glycoprotein. *Vaccine*. 2002 Nov 22;21(1-2):127-37.
146. Katakura K, Lee J, Rachmilewitz D, Li G, Eckmann L, Raz E. Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest*. 2005 Mar;115(3):695-702.
147. Boccaccio GL, Mor F, Steinman L. Non-coding plasmid DNA induces IFN-gamma in vivo and suppresses autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunol*. 1999 Feb;11(2):289-96.
148. Yeo SJ, Yoon JG, Yi AK. Myeloid differentiation factor 88-dependent post-transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 expression by CpG DNA: tumor necrosis factor-alpha receptor-associated factor 6, a diverging point in the Toll-like receptor 9-signaling. *J Biol Chem*. 2003 Oct 17;278(42):40590-600.
149. Chen Y, Zhang J, Moore SA, Ballas ZK, Portanova JP, Krieg AM, et al. CpG DNA induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production. *Int Immunol*. 2001 Aug;13(8):1013-20.
150. Ghosh DK, Misukonis MA, Reich C, Pisetsky DS, Weinberg JB. Host response to infection: the role of CpG DNA in induction of cyclooxygenase 2 and nitric oxide synthase 2 in murine macrophages. *Infect Immun*. 2001 Dec;69(12):7703-10.
151. Liscovsky MV, Ranocchia RP, Alignani DO, Gorlino CV, Moron G, Maletto BA, et al. CpG-ODN+IFN-gamma confer pro- and anti-inflammatory properties to peritoneal macrophages in aged mice. *Exp Gerontol*. 2011 Jun;46(6):462-7.
152. Ligthart GJ, Corberand JX, Geertzen HG, Meinders AE, Knook DL, Hijmans W. Necessity of the assessment of health status in human immunogerontological studies: evaluation of the SENIEUR protocol. *Mech Ageing Dev*. 1990 Jul;55(1):89-105.
153. Vanhooren V, Libert C. The mouse as a model organism in aging research: usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Res Rev*. 2013 Jan;12(1):8-21.
154. Nadon NL. Maintaining aged rodents for biogerontology research. *Lab Anim (NY)*. 2004 Sep;33(8):36-41.
155. Maletto BA, Ropolo AS, Liscovsky MV, Alignani DO, Glocker M, Pistoiresi-Palencia MC. CpG oligodeoxynucleotides functions as an effective adjuvant in aged BALB/c mice. *Clin Immunol*. 2005 Dec;117(3):251-61.
156. Alignani D, Maletto B, Liscovsky M, Ropolo A, Moron G, Pistoiresi-Palencia MC. Orally administered OVA/CpG-ODN induces specific mucosal and systemic immune response in young and aged mice. *J Leukoc Biol*. 2005 Jun;77(6):898-905.
157. Kline GH, Hayden TA, Klinman NR. B cell maintenance in aged mice reflects both increased B cell longevity and decreased B cell generation. *J Immunol*. 1999 Mar 15;162(6):3342-9.
158. Haynes L, Eaton SM, Burns EM, Rincon M, Swain SL. Inflammatory cytokines overcome age-related defects in CD4 T cell responses in vivo. *J Immunol*. 2004 May 1;172(9):5194-9.
159. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods*. 1994 Sep 14;174(1-2):231-5.

160. Moali C, Boucher JL, Sari MA, Stuehr DJ, Mansuy D. Substrate specificity of NO synthases: detailed comparison of L-arginine, homo-L-arginine, their N omega-hydroxy derivatives, and N omega-hydroxynor-L-arginine. *Biochemistry*. 1998 Jul 21;37(29):10453-60.
161. Mauer J, Chaurasia B, Goldau J, Vogt MC, Ruud J, Nguyen KD, et al. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat Immunol*. 2014 May;15(5):423-30.
162. Qualls JE, Neale G, Smith AM, Koo MS, DeFreitas AA, Zhang H, et al. Arginine usage in mycobacteria-infected macrophages depends on autocrine-paracrine cytokine signaling. *Sci Signal*. 2010;3(135):ra62.
163. Narita Y, Kitamura H, Wakita D, Sumida K, Masuko K, Terada S, et al. The key role of IL-6-arginase cascade for inducing dendritic cell-dependent CD4(+) T cell dysfunction in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 2013 Jan 15;190(2):812-20.
164. Vasquez-Dunddel D, Pan F, Zeng Q, Gorbounov M, Albesiano E, Fu J, et al. STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. *J Clin Invest*. 2013 Apr;123(4):1580-9.
165. Flores RR, Diggs KA, Tait LM, Morel PA. IFN-gamma negatively regulates CpG-induced IL-10 in bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2007 Jan 1;178(1):211-8.
166. Dicarolo AL, Fuldner R, Kaminski J, Hodes R. Aging in the context of immunological architecture, function and disease outcomes. *Trends Immunol*. 2009 Jul;30(7):293-4.
167. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1992 Dec 1;176(6):1693-702.
168. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*. 1999 Feb 1;223(1):77-92.
169. Lutz MB, Kukutsch NA, Menges M, Rossner S, Schuler G. Culture of bone marrow cells in GM-CSF plus high doses of lipopolysaccharide generates exclusively immature dendritic cells which induce alloantigen-specific CD4 T cell anergy in vitro. *Eur J Immunol*. 2000 Apr;30(4):1048-52.
170. Rossner S, Voigtlander C, Wiethe C, Hanig J, Seifarth C, Lutz MB. Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. *Eur J Immunol*. 2005 Dec;35(12):3533-44.
171. Abdalla AO, Kiai S, Hansson L, Rossmann ED, Jeddi-Tehrani M, Shokri F, et al. Kinetics of cytokine gene expression in human CD4+ and CD8+ T-lymphocyte subsets using quantitative real-time PCR. *Scand J Immunol*. 2003 Dec;58(6):601-6.
172. Morris MA, Ley K. Trafficking of natural killer cells. *Curr Mol Med*. 2004 Jun;4(4):431-8.
173. Jackaman C, Radley-Crabb HG, Soffe Z, Shavlakadze T, Grounds MD, Nelson DJ. Targeting macrophages rescues age-related immune deficiencies in C57BL/6J geriatric mice. *Aging Cell*. 2013 Jun;12(3):345-57.
174. Woolthuis CM, de Haan G, Huls G. Aging of hematopoietic stem cells: Intrinsic changes or micro-environmental effects? *Curr Opin Immunol*. 2011 Aug;23(4):512-7.
175. Wingender G, Garbi N, Schumak B, Jungerkes F, Endl E, von Bubnoff D, et al. Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO. *Eur J Immunol*. 2006 Jan;36(1):12-20.

176. Morecki S, Gelfand Y, Yacovlev E, Eizik O, Shabat Y, Slavin S. CpG-induced myeloid CD11b+Gr-1+ cells efficiently suppress T cell-mediated immunoreactivity and graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008 Sep;14(9):973-84.
177. Samarasinghe R, Tailor P, Tamura T, Kaisho T, Akira S, Ozato K. Induction of an anti-inflammatory cytokine, IL-10, in dendritic cells after toll-like receptor signaling. *J Interferon Cytokine Res.* 2006 Dec;26(12):893-900.
178. Liscovsky MV, Ranocchia RP, Gorlino CV, Alignani DO, Moron G, Maletto BA, et al. Interferon-gamma priming is involved in the activation of arginase by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs in murine macrophages. *Immunology.* 2009 Sep;128(1 Suppl):e159-69.
179. Ko JS, Rayman P, Ireland J, Swaidani S, Li G, Bunting KD, et al. Direct and differential suppression of myeloid-derived suppressor cell subsets by sunitinib is compartmentally constrained. *Cancer Res.* 2010 May 1;70(9):3526-36.
180. Shirota Y, Shirota H, Klinman DM. Intratumoral injection of CpG oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.* 2012 Feb 15;188(4):1592-9.
181. Zoglmeier C, Bauer H, Norenberg D, Wedekind G, Bittner P, Sandholzer N, et al. CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Clin Cancer Res.* 2011 Apr 1;17(7):1765-75.
182. Haynes L, Linton PJ, Eaton SM, Tonkonogy SL, Swain SL. Interleukin 2, but not other common gamma chain-binding cytokines, can reverse the defect in generation of CD4 effector T cells from naive T cells of aged mice. *J Exp Med.* 1999 Oct 4;190(7):1013-24.
183. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* 2011 Jan;32(1):19-25.
184. Wu L, Du H, Li Y, Qu P, Yan C. Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3C) promotes myeloid-derived suppressor cell expansion and immune suppression during lung tumorigenesis. *Am J Pathol.* 2011 Oct;179(4):2131-41.
185. Sumida K, Wakita D, Narita Y, Masuko K, Terada S, Watanabe K, et al. Anti-IL-6 receptor mAb eliminates myeloid-derived suppressor cells and inhibits tumor growth by enhancing T-cell responses. *Eur J Immunol.* 2012 Aug;42(8):2060-72.
186. Beury DW, Parker KH, Nyandjo M, Sinha P, Carter KA, Ostrand-Rosenberg S. Crosstalk among myeloid-derived suppressor cells, macrophages, and tumor cells impacts the inflammatory milieu of solid tumors. *J Leukoc Biol.* 2014 Dec;96(6):1109-18.
187. Chelvarajan RL, Liu Y, Popa D, Getchell ML, Getchell TV, Stromberg AJ, et al. Molecular basis of age-associated cytokine dysregulation in LPS-stimulated macrophages. *J Leukoc Biol.* 2006 Jun;79(6):1314-27.
188. Sun L, Hurez VJ, Thibodeaux SR, Kious MJ, Liu A, Lin P, et al. Aged regulatory T cells protect from autoimmune inflammation despite reduced STAT3 activation and decreased constraint of IL-17 producing T cells. *Aging Cell.* 2012 Jun;11(3):509-19.
189. McKay BR, Ogborn DI, Baker JM, Toth KG, Tarnopolsky MA, Parise G. Elevated SOCS3 and altered IL-6 signaling is associated with age-related human muscle stem cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013 Apr 15;304(8):C717-28.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

DOCTORAL

A. ARTÍCULOS

“Expansion of myeloid-derived suppressor cells with arginase activity lasts longer in aged than in young mice after CpG-ODN+IFA treatment”. María F. Harman, Romina P. Ranocchia, Carolina V. Gorlino, María F. Sánchez Vallecillo, Sofía D. Castell, María I. Crespo, Belkys A. Maletto, Gabriel Morón and María C. Pistoresi-Palencia. Oncotarget. 2015. En prensa

B. COMUNICACIONES A CONGRESOS

“CpG-ODN induces, in vitro and in vivo, myeloid GR1⁺ CD11B⁺ cells and suppressor functions in young and aged mice”. Harman, María; Rannochia, Romina; Gorlino, Carolina; Maletto, Belkys; Morón, Gabriel; Pistoresi, M.Cristina. CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas-UNC, Córdoba, Argentina. First French-Argentine Immunology Congress. LVIII Reunión anual de Sociedad Argentina de Inmunología. Buenos Aires. Noviembre 2010.

“Estudio del efecto inmunorregulador de CpG-ODN+IFA en ratones jóvenes y viejos”. Harman, María F; Rannochia, Romina; Gorlino, Carolina; Maletto, Belkys; Morón, Gabriel; Pistoresi, M.Cristina. CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas-UNC, Córdoba, Argentina. LIX Reunión anual de Sociedad Argentina de Inmunología. Tucumán. Octubre 2011.

“Células mieloides GR1⁺ CD11b⁺ inducidas por tratamiento con CpG-ODN+IFA suprimen la respuesta proliferativa de Li T mediante Arginasa”. Ranocchia, R; Gorlino, C; Harman, M.F; Crespo, M.I; Morón, G; Maletto, B; Pistoresi, M.C. CIBICI-CONICET-Facultad de Ciencias Químicas, UNC, Córdoba. LIX Reunión anual de Sociedad Argentina de Inmunología. Tucumán. Octubre 2011.

“Estudio de células mieloides Gr1⁺ CD11b⁺ inducidas por CpG-ODN+IFA en ratones viejos”. Harman, María; Ranocchia, Romina; Gorlino, Carolina; Maletto, Belkys;

Morón, Gabriel; Pistoressi, M.Cristina. CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas-UNC, Córdoba, Argentina. LX Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata. Noviembre 2012.

“Immunomodulatory function of CD11b+ Gr1+ function of CD11b+ Gr1+ myeloid cells from aged mice”. Harman, María Florencia; Gorlino, Carolina; Castell, Sofía; Ranocchia, Romina; Maletto, Belkys; Morón, Gabriel; Pistoressi, M.Cristina. CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas-UNC, Córdoba, Argentina. LXI Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Los Cocos. Noviembre 2013.

“Arginase induction in myeloid cells from CpG-ODN+IFA-treated mice”. Harman, María Florencia; Castell, Sofía D; Gorlino, Carolina V; Crespo, María I; Sánchez Vallecillo, María F; Rannochia, Romina P; Maletto, Belkys A; Morón, Victor G; Pistoressi, María C. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET-UNC. Facultad de Ciencias Químicas-UNC, Córdoba, Argentina. LXII Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata. Noviembre 2014.

OTRAS PUBLICACIONES QUE NO FORMAN PARTE DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

DOCTORAL

A. ARTÍCULOS

“Arginase-dependent suppression by CpG-ODN plus IFA-induced splenic myeloid CD11b(+)Gr1(+) cells”. Ranocchia RP, Gorlino CV, Crespo MI, Harman MF, Liscovsky MV, Morón G, Maletto BA, Pistoressi-Palencia MC. Immunol Cell Biol. 2012 Aug; 90 (7): 710 - 21.

“Adjuvant activity of CpG-ODN formulated as a liquid cristal”. Sánchez Vallecillo MF, Ullio Gamboa GV, Palma SD, Harman MF, Chiodetti AL, Morón G, Allemandi DA, Pistoressi-Palencia MC, Maletto BA. Biomaterials. 2014 Mar;35(8):2529-42.

“Neutrophils Exhibit Differential Requirements for Homing Molecules in Their Lymphatic and Blood Trafficking into Draining Lymph Nodes”. Carolina V. Gorlino, Romina P. Ranocchia, María F. Harman, Iris A. García, María I. Crespo, Gabriel Morón, Belkys A. Maletto and María C. Pistoresi-Palencia. J Immunol 2014 193:1966-1974; doi:10.4049/jimmunol.1301791.

B. COMUNICACIONES A CONGRESOS

“Células mieloides GR1⁺ CD11b⁺ inducidas en animales viejos por administración de CpG-ODN suprimen la proliferación de linfocitos T mediante arginasa”. Ranocchia R; Gorlino C; Harman M.F; Morón G; Maletto B; Pistoresi M. CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas- UNC, Córdoba, Argentina. LVII Reunión científica de Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata. Noviembre 2009

“Role of sphingosine-1-phosphate in neutrophil trafficking to lymph nodes in an immune inflammation model”. Gorlino, Carolina; Rannochia, Romina; Harman, Florencia; Morón, Gabriel; Maletto, Belkys; Pistoresi, María. CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas- UNC, Córdoba, Argentina. First French- Argentine Immunology Congress. LVIII Reunión anual de Sociedad Argentina de Inmunología. Buenos Aires. Noviembre 2010.

“Modulation of neutrophil migratory pattern after immune complex simulation”. Gorlino,C; Harman, M.F; Ranocchia,R; García, Alejandra; Morón, Gabriel; Maletto, Belkys, Heeringa,P; Pistoresi,M.C. CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas-UNC, Córdoba, Argentina. LX Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata. Noviembre 2012.

“The chemokine receptor CXCR4 mediates neutrophil migration to lymph nodes from both blood and lymphatic routes”. Gorlino,Carolina; Castell, Sofía; Harman, María Florencia; Ranocchia, Romina; Morón, Gabriel; Maletto, Belkys; Pistoresi, María Cristina. CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas-UNC, Córdoba, Argentina. LXI Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Los Cocos. Noviembre 2013.

“Neutrophils recruitment impact on t cell response in lymph nodes”. Castell, Sofía Daiana; Harman, María E; Gorlino, Carolina V; Morón, Victor G; Maletto, Belkys A; Pistoresi, María C. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas-UNC, Córdoba, Argentina. LXII Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata. Noviembre 2014.