

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

DIÁLOGO LEUCOTRIENO C4 – CÉLULAS DENDRÍTICAS: ROL EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Nicola Candia, Alejandro Javier – LU 1011008

Licenciatura en Biotecnología

Parra, Federico Leonel – LU 1018434

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Vermeulen, Mónica Elba – Academia Nacional de Medicina

Co-Tutor:

Panero, Julieta – UADE

Marzo 25, 2014



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

1. Agradecimientos

Agradecemos encarecidamente a todo el grupo de trabajo del laboratorio de “Células presentadoras de antígeno y respuesta inflamatoria” del Instituto de Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina, y en especial a la jefa del laboratorio, la doctora Mónica Vermeulen, que nos dio la posibilidad de encarar esta investigación bajo su tutoría. Gracias a su gran dedicación y compromiso para con nosotros, adquirimos grandes conocimientos teóricos y prácticos, no solo sobre el sistema inmunológico sino también sobre el ámbito científico en general.

2. Resumen

El leucotrieno C4 (LTC4) es un potente mediador lipídico pro-inflamatorio, producido por células inflamatorias como eosinófilos, basófilos y macrófagos. Es un poderoso espasmógeno y vasoconstrictor, que promueve la secreción de moco y junto con la histamina es conocido como un agente inmunomodulador de reacciones alérgicas e inflamatorias. En trabajos previos se ha descrito que el LTC4 es capaz de modular la función de las células dendríticas (CD), induciendo su quimiotaxis y modificando su estado de activación, con la capacidad de interferir en la maduración de las mismas.

En este proyecto se estudió la capacidad del LTC4 de impactar sobre las CD y el epitelio intestinal provocando la cronificación de los procesos inflamatorios asociados a las mucosas intestinales.

Demostramos que el LTC4, en poblaciones de ganglios mesentéricos e intestino delgado de ratones tolerantes a ovoalbúmina (OVA), tiene la capacidad de modificar la diferenciación de las CD especializadas de la mucosa, linfocitos T CD4 y CD8. Al mismo tiempo favorece la liberación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y del interferón gamma (INF- γ), dos citoquinas involucradas en todos los procesos de inflamación. Por otro lado, también ensayamos *in vitro* el efecto del LTC4 sobre CD tolerogénicas en contacto con células epiteliales. Llamativamente, el efecto del LTC4 sobre las CD se ve disminuido tanto en cocultivo con líneas celulares como en presencia de tejido intestinal, y la producción de citoquinas inflamatorias también decrece. Por lo tanto, parece ser que el epitelio celular podría estar jugando un rol sumamente importante en el control de tolerancia oral a antígenos solubles.

3. Abstract

Leukotriene C4 (LTC4) is a potent pro-inflammatory lipidic mediator, produced by inflammatory cells like eosinophils, basophils and macrophages. It is a powerful spasmogen and vasoconstrictor, which promotes mucus secretion and together with histamine is known as an immunomodulatory agent of allergic and inflammatory reactions. In previous works it has been demonstrated that LTC4 is capable of modulate dendritic cells (DC) function, inducing chemotaxis and modifying their activation state, with the ability of interfere with the maturation of them.

In this project, we studied the capacity of LTC4 to modulate the activity of DC participating in the cronification of intestinal mucosal inflammatory processes.

We have demonstrated that LTC4, in cell populations of mesenteric lymph nodes (mLN) and small intestine of ovalbumin (OVA)-tolerized mice, has the ability to modify the differentiation of specialized mucosal DC and CD8 and CD4 T lymphocytes. At the same time it favors the release of tumor necrosis factor alfa (TNF- α) and gamma interferon (INF- γ), two cytokines involved in all inflammatory processes. We also tested the *in vitro* effect of LTC4 on tolerogenic DC in contact with epithelial cells. Surprisingly, the effect of LTC4 on DC decreased whether they were cocultivated with cell lines as in presence of intestinal tissue, and the production of inflammatory cytokines is also reduced. Therefore, it seems that the cellular epithelium may be playing a key role in the control of oral tolerance to soluble antigens.

4. Contenidos

1. Agradecimientos	2
2. Resumen	3
3. Abstract	4
4. Contenidos	5
5. Introducción	7
6. Estado del arte	8
6.1. Tolerancia oral	8
6.1.1. Mecanismos de tolerancia en el intestino	8
6.1.2. Trastornos inmunológicos	10
6.2. Células dendríticas	12
6.2.1. Características generales	12
6.2.2. Maduración	12
6.2.3. Citoquinas inflamatorias e inmunomoduladoras	13
6.2.4. Subpoblaciones murinas	15
6.2.5. Células dendríticas en el contexto intestinal	16
6.2.6. Interacciones célula-célula	19
6.3. Linfocitos T y la respuesta adaptativa	19
6.3.1. Activación de linfocitos	19
6.3.2. Plasticidad de los linfocitos T	21
6.3.3. Linfocitos T en el contexto intestinal	23
6.4. Leucotrieno C4 (LTC4)	24
6.4.1. Aspectos generales	24
6.4.2. Síntesis	25
6.4.3. Los cistenil leucotrienos y las células dendríticas	26
6.4.4. Procesos pato-fisiológicos modulados por los cisteinil-leucotrienos	27
7. Hipótesis	28
8. Metodología	28
9. Resultados	33
9.1. Caracterización de ratones tratados y no tratados con ovoalbúmina	33
9.1.1. La administración de ovoalbúmina en la dieta de los ratones	

modifica su peso	33
9.1.2. Reacción de hipersensibilidad retardada	33
9.1.3. La inducción de tolerancia oral modifica la expresión fenotípica de células dendríticas, linfocitos B y linfocitos T de los ganglios mesentéricos	34
9.1.4. Análisis fenotípico del intestino delgado	36
9.2. Ensayos con LTC4	36
9.2.1. Efecto del LTC4 sobre poblaciones celulares de ganglios mesentéricos	36
9.2.2. Efecto del LTC4 sobre células dendríticas en cocultivo con células epiteliales	38
9.2.3. ELISA: acción del LTC4 sobre citoquinas inflamatorias e inmunomoduladoras	40
9.2.4. Efecto de la aplicación de OVA/LTC4 a muestras de endotelio de intestino delgado	41
9.2.5. El cocultivo en monocapa epitelial de ratón mostró un gran efecto en la expresión de células dendríticas tolerogénicas	45
10. Discusión de resultados	46
11. Conclusiones	49
12. Anexos	51
13. Bibliografía	52

5. Introducción

El objetivo principal del presente trabajo fue estudiar si el leucotrieno C4, actuando directamente sobre células dendríticas (CD) tolerogénicas, puede modular las repuestas inflamatorias crónicas asociadas a las mucosas. Como objetivo específico estudiamos, en primer lugar, si el leucotrieno C4 (LTC4) podía modificar fenotípicamente a las CD de la mucosa e inducir la secreción de diversas citoquinas inflamatorias e inmunomoduladoras, que podrían modificar los perfiles de linfocitos T (LT) helper y asimismo conducir a una respuesta inmune inflamatoria. En segundo lugar, analizamos los efectos del LTC4 sobre las CD y los LT en el microambiente de la mucosa, utilizando ensayos *in vitro* de cocultivo en monocapa epitelial y con líneas celulares de epitelio celular murino.

Hoy en día, algunas de las más conocidas enfermedades del sistema inmunitario, son aquellas en las que el cuerpo produce una reacción exacerbada a algún componente propio del organismo o a moléculas que generalmente resultan inocuas. Estas enfermedades son denominadas autoinmunes y son, por ejemplo, la esclerosis múltiple, la enfermedad de los celíacos, el asma, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, entre otras. El estudio de la tolerancia oral en la mucosa intestinal abre muchos caminos, no solo para poder encontrar moléculas antagonistas que sirvan para contrarrestar los efectos inflamatorios de ciertos moduladores intercelulares como el LTC4, sino también para entender los mecanismos por los cuáles se genera la tolerancia oral y poder desarrollar terapias alternativas basadas en la incorporación de antígenos solubles para combatir enfermedades autoinmunes prevalentes en el mundo actual.

En la siguiente sección de este informe se describen los antecedentes y trabajos previos que otros investigadores han realizado sobre los temas relacionados con esta investigación. En primer lugar se explica en qué consiste el fenómeno de tolerancia oral a antígenos solubles desarrollado por todos los organismos en la mucosa intestinal y cuál es su relevancia médica. Luego se describen las características sobresalientes de las CD, sus funciones generales, las subpoblaciones específicas presentes en la mucosa y sus diversos roles en la respuesta inflamatoria intestinal. En tercer lugar, se brinda una explicación sobre los distintos subtipos de linfocitos T y sus funciones determinantes en la inmunidad adaptativa. Por último, se introduce al leucotrieno C4 y se detallan sus características y funciones relacionadas con las CD y su rol en las reacciones alérgicas. En la sección de metodología se detallan los materiales y métodos

utilizados para completar esta investigación. Posteriormente se describe la hipótesis que se buscaba comprobar y los resultados provenientes de nuestros ensayos. En última instancia se discuten los resultados y las conclusiones pertinentes con respecto a la comprobación o refutación de la hipótesis y el aporte que esta investigación dejó al mundo científico y a la población en general.

6. Estado del arte

6.1. Tolerancia oral

6.1.1. Mecanismos de tolerancia en el intestino

El tejido linfoide asociado al intestino (gut-associated lymphoid tissue, GALT) es el sistema inmune más largo del cuerpo humano. La mucosa del intestino delgado se estima que mide 200 m² por sí sola y que hay 10¹² células linfoides por metro de intestino delgado humano. Aproximadamente 30 kg de proteínas de comida alcanzan el intestino humano durante un año, y alrededor de 130-190 gramos de estas proteínas se absorben diariamente en el intestino (*Weiner, et al., 2011*). El intestino es colonizado por una densa comunidad de microbios comensales, conocidos como microbiota o microflora. La densidad de estos microbios aumenta a lo largo del tracto gastrointestinal, alcanzando 10¹² bacterias por gramo de contenido intestinal en el colon. El sistema inmunitario en mucosas no sólo se enfrenta a una variedad de microorganismos, sino que, además, debe discriminar entre los patogénicos y diferenciarlos de la abundante flora comensal y antígenos inocuos propios de las proteínas dietarias (*Pabst and Mowat, 2012*). Por eso, el GALT es principalmente un ambiente tolerogénico que evita el establecimiento de una respuesta inflamatoria crónica que resultaría daño tisular y una compleja interacción de factores crean dicho ambiente.

Los sitios inductivos para la respuesta inmune en el intestino son las placas de Peyer (PP), que son agregados linfoides macroscópicos en la submucosa a lo largo del intestino delgado, y los ganglios mesentéricos (GM), que son los ganglios más grandes del cuerpo. Además hay linfocitos dispersos a través la lámina propia (LP), una fina capa de tejido conectivo que yace sobre el epitelio y que forma la mucosa. Para inducir una respuesta inmune, el antígeno debe llegar hasta las células presentadoras de antígeno (CPA) penetrando la capa mucosa y luego la barrera celular epitelial. La captura de antígenos ocurre a través de una variedad de mecanismos que incluyen células epiteliales (CE) denominadas células M y un tipo

de células dendríticas (CD) que pueden atravesar el epitelio. Otro importante componente del GALT son los linfocitos intraepiteliales (LIE), que ayudan a mantener la homeostasis y la función de la barrera epitelial, a responder rápidamente a infecciones y a regular las respuestas inmunes innata y adaptativa. En la capa epitelial intestinal de ratones, se distinguen dos tipos de LIE: aquellos que expresan el receptor de linfocitos T (TCR) $\alpha\beta$ y aquellos que expresan el TCR $\gamma\delta$ (*Sheridan and Lefrançois, 2010*). Así, la combinación de bacterias comensales, células T y CD disponen un ambiente tolerogénico en el intestino.

La tolerancia oral es un estado local y sistémico (**Figura 1**) de “no respuesta” inmunitaria inducido por la administración oral de antígenos inocuos, como las proteínas de la comida. La inducción fisiológica de tolerancia ocurre en el GALT y en otras superficies mucosas como las del tracto respiratorio (*Pabst and Mowat, 2012*). Probablemente esta condición de tolerancia explica el robusto equilibrio que mantiene la homeostasis de la mucosa intestinal a pesar de su tejido linfoide altamente activado (*Faria, et al., 2013*). Los efectos de la tolerancia oral se miden típicamente como reducciones en la hipersensibilidad retardada o de tipo IV, proliferación de linfocitos T (LT) y producción de citoquinas. Uno de los mecanismos más importantes involucrados en la tolerancia oral es la inducción de linfocitos T regulatorios (LT-reg) (*Faria and Weiner, 2005*). Distintos subsets de LT-reg han sido implicados en la inducción de tolerancia oral: células Tr1 productoras de IL-10, células Th3 productoras de factores de crecimiento transformante (TGF) y LT-reg $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ (*Pabst and Mowat, 2012*).

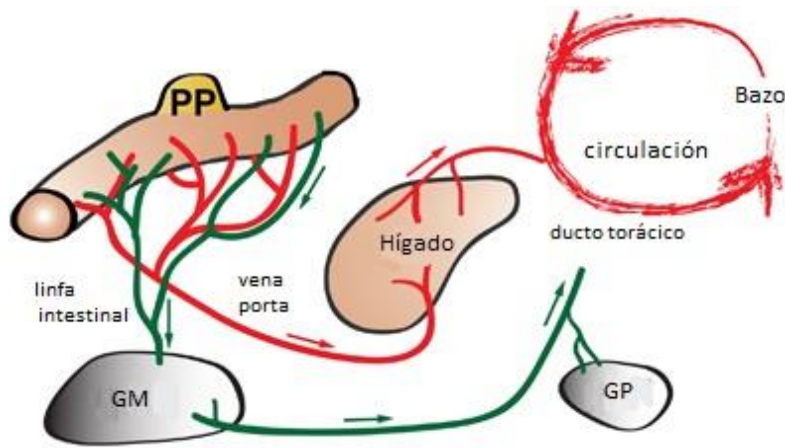


Figura 1: Rutas de expansión de tolerancia sistémica. Como se ha discutido anteriormente, una de las características sobresalientes de la tolerancia oral a antígenos solubles es que está involucrado el animal entero. Esto es difícil de explicar en el corriente contexto de compartimentalización anatómica del sistema inmune de la mucosa. Una explicación para esto podría ser que los antígenos administrados oralmente pueden diseminarse sistemáticamente vía sangre y linfa. El antígeno tomado en las placas de Peyer (PP) o la lámina propia (LP) puede entrar al torrente sanguíneo por la vena porta, primero alcanzando el hígado antes de que se distribuya por la circulación. La tolerancia sistémica puede ocurrir luego por la presentación del antígeno en el hígado mediante células endoteliales, células dendríticas (CD) convencionales o plasmocitoides, o porque el antígeno alcanzó los ganglios periféricos (GP) para ser presentado por CD residentes. El antígeno libre puede ser tomado por la linfa intestinal aferente y pasado a través de los ganglios mesentéricos (GM) y eventualmente entrar al torrente sanguíneo a través del ducto torácico. (Pabst and Mowat, 2012).

Como ya se mencionó, muchos tipos celulares participan en esta habilidad de la mucosa intestinal para incorporar nuevos antígenos mediante la inducción de tolerancia. Además también existe una lista amplia de moléculas moduladoras que son producidas localmente y que son críticas para el mantenimiento de la homeostasis intestinal. En este sentido, la interleuquina 10 (IL-10) es secretada por macrófagos, LT y linfocitos B (LB), mientras que el TGF- β es producido por LT y por varias células mieloides y no linfoides, especialmente CE. Otra pieza importante en el acondicionamiento de la mucosa son las CD, que participan en la presentación de antígenos e inducción de LT con propiedades regulatorias.

6.1.2. Trastornos inmunológicos

Como se ve, los mecanismos que participan en los procesos de regulación de la tolerancia oral son realmente complejos e involucran distintos subtipos de células y mediadores inter e intracelulares. Esto aumenta las posibilidades de que se generen fallas en el sistema que pueden resultar en enfermedades inflamatorias. Por ello, se ha puesto un gran énfasis en dilucidar los fenómenos que suceden en este proceso, para poder comprender los mecanismos

de las enfermedades asociadas a la tolerancia e incluso desarrollar nuevas terapias para tratar otras enfermedades autoinmunes o de inmunodeficiencia.

Las enfermedades inflamatorias del intestino, que consisten en la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn se caracterizan por la inflamación crónica del tracto gastrointestinal en individuos genéticamente susceptibles expuestos a factores de riesgo ambientales (*Danese, et al., 2004*). Una gran variedad de modelos animales apoya el concepto de que esta predisposición genética lleva a una respuesta inmune aberrante dirigida contra la flora intestinal (*Blumberg, et al., 1999*). Estudios realizados en pacientes humanos demuestran que aquellos afectados con colitis ulcerativa o con la enfermedad de Crohn presentan desregulación inmune en la mucosa, ya que fallan en desarrollar tolerancia a un nuevo antígeno (*Kraus, et al., 2004*). La incidencia de estas enfermedades está incrementando alrededor del mundo y en algunos países puede afectar hasta al 0,6% de la población (*Molodecky, et al., 2012*).

Por otro lado, la enfermedad celíaca, que es la patología más prevalente inducida por comidas, también se debe a una falla en la inducción de tolerancia. Si bien es un desorden multifactorial, la interacción entre factores ambientales y genéticos puede alterar la tolerancia a antígenos de la comida en la mucosa, llevando a una inflamación intestinal crónica y en última instancia al desarrollo y crecimiento de linfomas (*Meresse, et al., 2009*).

La inducción de no respuesta inmunológica mediante la incorporación de antígenos solubles ha estado atrayendo considerable atención como una potencial terapia para una variedad de desórdenes inflamatorios sistémicos. El uso racional de la tolerancia oral como una herramienta terapéutica en condiciones autoinmunes es que ésta proveerá un tipo específico de supresión evitando los efectos secundarios de la inmunosupresión no específica (*Faria and Weiner, 2006*). Muchos estudios han demostrado la efectividad de antígenos administrados oralmente en modelos de enfermedades autoinmunes en ratones, incluyendo encefalomiелitis alérgica experimental (*Whitacre, et al., 1996, Faria, et al., 2003*), artritis (*Staines, et al., 1996, Ju, et al., 2008, Thomé, et al., 2012*), tiroiditis (*Lee, et al., 1998, Gardine, et al., 2003*), diabetes insulino-dependiente (*Bergerot, et al., 1999, Chaillous, et al., 2000, Ergun-Longmire, et al., 2004, Monetini, et al., 2004*) y esclerosis múltiple (*Maron, et al., 2002*), entre otras.

Si hay grandes expectativas para futuros tratamientos con terapias de tolerancia oral, la investigación debe seguir adelante, porque si bien está claro que la ingestión oral de antígenos puede suprimir la autoinmunidad e incluso enfermedades inflamatorias en animales, hay varios factores que deben ser tenidos en cuenta para mejorar la efectividad en pacientes humanos.

6.2. Células dendríticas

6.2.1. Características generales

Las CD son la tercera clase de células fagocíticas del sistema inmunitario, junto con los neutrófilos y los macrófagos. Pero su principal participación en el sistema inmune no es la eliminación de microorganismos. Son células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales, es decir, pueden migrar hacia los ganglios linfáticos y como CD maduras mostrar en su superficie asociadas a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) la variedad de antígenos procesados a partir de las proteínas de los organismos invasores para activar así a los LT vírgenes; que son aquellos que nunca antes han visto su antígeno específico (*Janeway, et al., 2005*). Por ello se ha demostrado que cumplen un rol clave en el sistema inmunitario ya que conectan la inmunidad innata con la adaptativa. Su función es el resultado de una compleja interacción con el microambiente local ya que las CD integran señales microbianas, ambientales y del propio cuerpo para seleccionar la intensidad y el tipo de respuesta (*Swiatczak and Rescigno, 2012*). Las CD no solo activan el sistema inmune sino que también participan en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. En la periferia inducen tolerancia presentando antígenos propios y además son críticas para controlar las poblaciones de los LT-reg (*Yamazaki and Morita, 2013*).

6.2.2. Maduración

Las CD cumplen un rol único en la iniciación de la respuesta inmune, debido a su excepcionalmente fuerte capacidad de presentar antígenos a linfocitos T naïve (*Guermonprez, et al., 2002*). Cuando están en su estado inmaduro, las CD se caracterizan por su gran actividad endocítica, fuera de los ganglios linfáticos, éstas se dedican a vigilar constantemente el organismo en busca de signos de invasión por patógenos y capturan antígenos intrusos o externos. Cuando actúan como centinelas en la periferia, las CD inmaduras toman a su cargo el antígeno de tres maneras: lo fagocitan, o lo captan mediante endocitosis mediada por receptores o por macropinocitosis, este último es un mecanismo constitutivo de las CD que les permite testear de forma permanente el medio externo (*Kindt, et al., 2007*). La ingestión de productos microbianos o patógenos virales, como el lipopolisacárido (LPS) bacteriano, ADN metilado o ARN doble cadena gatillan la maduración de las CD. La mayoría de estos son reconocidos por uno o más miembros de la familia de los receptores Toll (Toll-like receptors, TLR) (*Akira,*

et al., 2001). Además, ciertas citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , según sus siglas en inglés) y la interleuquina-1 beta (IL-1 β) pueden inducir maduración así como también lo pueden hacer otros mediadores inflamatorios como la histamina o algunas prostaglandinas (*Jonuleit, et al.*, 1997), (*Amaral, et al.*, 2007).

A través de un proceso de maduración, cambian de un fenotipo endocítico o pinocítico a otro que permite la presentación de antígenos a las células T. Su maduración implica una serie ordenada de eventos dependientes de señales intracelulares que resultan en la alteración específica de la expresión génica, incremento del potencial de procesamiento de las proteínas ingeridas para la generación de los péptidos antigénicos y biogénesis de organelas, generando potentes funciones inmunomoduladoras (*Gatti and Pierre, 2003*). En esta transición se ganan algunos atributos y se pierden otros. Entre lo que se pierde está la capacidad de fagocitosis y endocitosis a gran escala. La expresión del CMH de clase I y II así como las moléculas coestimuladoras (CD80/CD86) aumentan, lo cual es necesario para presentar el antígeno a células T vírgenes activándolas a células T efectoras. Al madurar, las células dendríticas salen de los tejidos periféricos, pasan a la circulación sanguínea o linfática, emigran a la zona paracortical de los órganos linfoides donde residen los linfocitos T. Además, las CD maduras pueden inducir la activación de células asesinas naturales (NK, natural killers en inglés) y la diferenciación de LB en células productoras de anticuerpos (*Nakayama, et al.*, 2011).

6.2.3. Citoquinas inflamatorias e inmunoreguladoras

Las citoquinas son un grupo de proteínas encargadas de mediar las interacciones complejas entre las células del sistema inmune. Éstas se unen a receptores específicos de la membrana de las células blanco e inician una cascada de señalización que al final altera la expresión génica en las células blanco. Muchas de las citoquinas se agrupan en una gran familia y se denominan interleuquinas (IL). Algunas otras se conocen con nombre comunes como interferones (INF) o factores de necrosis tumoral (TNF). Si bien diversas células pueden secretar citoquinas, los principales productores son las células T, macrófagos y CD. Entre las múltiples respuestas fisiológicas que requieren la participación de citoquinas se incluyen el desarrollo de las reacciones inmunitarias celular y humoral, la inducción de la respuesta inflamatoria, la regulación de la hematopoyesis, el control de la proliferación y diferenciación celulares y la cicatrización de heridas.

Las CD no solo inducen a los linfocitos T a secretar citoquinas sino que también son ellas mismas importantes fuentes de varias citoquinas. Las CD producen IL 12, que define respuestas efectoras T del tipo Th1. Estas células se caracterizan por la secreción de interferón gamma (INF- γ) y la activación de macrófagos, tienen un rol en la respuesta inmune contra bacterias fundamentalmente y en menor medida contra virus y parásitos. Recientemente se ha descubierto que las CD, con el estímulo correspondiente, tienen la capacidad de secretar INF- γ . (Vremec, *et al.*, 2007). Además, las CD una vez activadas producen altos tenores de citoquinas como el TNF- α (Serbina, *et al.*, 2003). Esta citoquina es primordial en las respuestas inflamatorias, aunque también puede llevar a cabo funciones inmunoreguladoras.

Si bien las CD tienen una vida media corta (menor a 48 horas), las funciones que pueden cumplir son realmente variadas y significativas para controlar la inmunidad sistémica. Aunque existen muchas diferentes subpoblaciones que conllevan roles diferenciales, en la **figura 2** se resumen los aspectos generales ya explicados de las funciones de las CD.

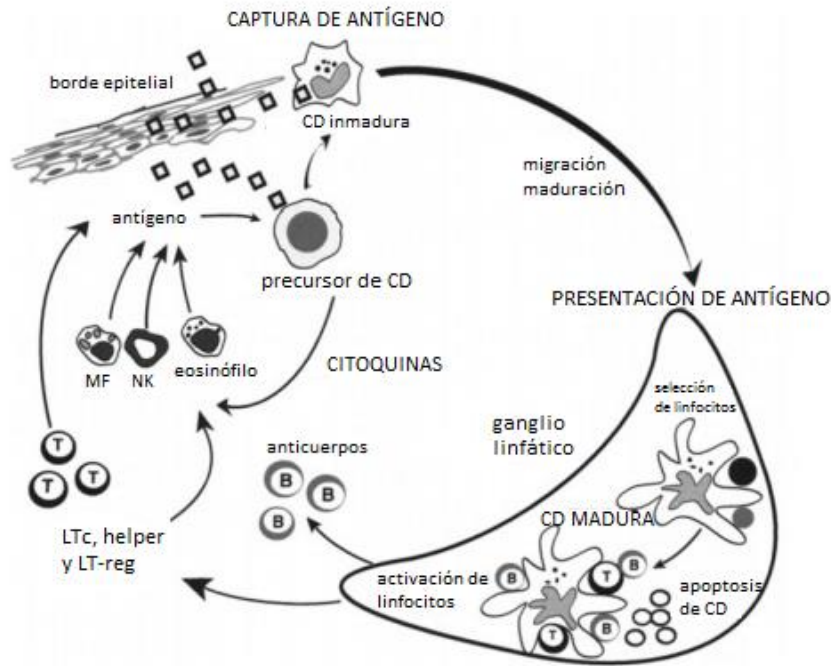


Figura 2: Ciclo de vida de las CD. Los precursores circundantes de CD entran a los tejidos como células inmaduras. Pueden encontrarse directamente con patógenos (como virus o bacterias) que inducen la secreción de citoquinas (por ejemplo INFα), las cuales pueden activar eosinófilos, macrófagos (MF) y células asesinas naturales (NK, de acuerdo a sus siglas en inglés). Después de capturar antígenos, las CD inmaduras migran a los ganglios linfáticos donde, luego de la maduración, despliegan el complejo MHC-péptido, lo cual permite la selección de linfocitos circundantes específicos a ese antígeno. Esas células T activadas ayudan a las CD a completar su maduración, lo que posibilita la expansión y diferenciación de los linfocitos. Una vez activados migran y pueden alcanzar el tejido dañado, porque pueden atravesar el epitelio dañado. Las células T helper secretan citoquinas, permitiendo la activación de MF, NK y eosinófilos. Las células T citotóxicas (LTc) eventualmente lisan las células dañadas. Los linfocitos B se activan una vez que entran en contacto con células T o CD y migran hacia varias áreas donde maduran como células plasmáticas y producen anticuerpos que neutralizan el patógeno inicial. Se cree que luego de la interacción con linfocitos, las CD mueren por apoptosis.

6.2.4. Subpoblaciones murinas

A partir de su descubrimiento en el año 1973, un número creciente de subpoblaciones de CD han sido fenotípicamente clasificadas y funcionalmente designadas. Este gran número de subsets se debe a la enorme plasticidad de las CD que están virtualmente omnipresentes a lo largo del cuerpo y a su habilidad de adaptarse a las influencias del microentorno en donde se encuentran (*del Rio, et al., 2010*). Los distintos tipos difieren en cuanto a origen celular, vida media en tejidos de la periferia y, posiblemente, los mecanismos por los que son renovadas (*Geissmann, 2007*). Originalmente se pensaba que las CD derivaban de precursores mieloides, debido a su similitud funcional, fenotípica y morfológica con los macrófagos (*van Furth and Cohn, 1968*) e históricamente se ha clasificado a las CD humanas en dos grandes grupos: las

CD convencionales, también llamadas mieloides, y las CD plasmacitoides. En la hematopoyesis, las células madre que residen en la médula ósea pueden dar descendencia a los dos tipos de células precursoras, las mieloides, de las cuales derivan los granulocitos, megacariocitos y macrófagos; y las linfoides, de las cuales derivan los linfocitos B y T. Sin embargo, un nuevo modelo describe que las CD pueden provenir de precursores tanto mieloides como linfoides, lo que sugiere que el origen y desarrollo de las CD es mucho más complejo de lo que se creía.

Desde un punto de vista fenotípico y funcional, en ratones se pueden describir seis subpoblaciones de CD. De acuerdo al receptor CD8, pueden ser divididas en CD8⁺, localizadas en el bazo, los ganglios linfáticos, las PP y el hígado; CD8⁻, que están además presentes en el timo; y CD8^{int}, que expresan niveles intermedios del receptor y se encuentran únicamente en ganglios linfáticos. Las células de Langerhans y las CD dérmicas se alojan en la piel. Por último, la expresión de la isoforma B220 del receptor CD45 define la contraparte funcional murina de las CD plasmacitoides humanas. Éstas se encuentran en todos los órganos linfoides murinos y se caracterizan por su potencial para producir grandes cantidades de interferón (INF) del tipo 1 en respuesta a infecciones virales. Además se cree que las CD B220⁺ están involucradas en los procesos de tolerancia mediada por LT, ya que pueden inducir la diferenciación de LT-reg (Ardavín, 2003).

6.2.5. Las células dendríticas en el contexto intestinal

Además de las ya estudiadas poblaciones convencionales, en los últimos años se han descubierto muchos otros subsets de CD que expresan distintos receptores y que se localizan en diferentes partes del organismo. Evidencia reciente sugiere que el ambiente tisular en el cual residen las CD tiene un mayor impacto en sus propiedades fenotípicas y funcionales. En la mucosa intestinal, por ejemplo, las CD se localizan a lo largo de las vellosidades de la LP y en el tejido linfoide intestinal (PP y GM), donde tienen un papel central en captar y procesar antígenos propios para presentarlos a células T. (Jaensson, et al., 2008).

El CD11c es un clásico marcador que distingue CD murinas, y que puede expresarse en conjunto con otros receptores como el CD103 (integrina α_E). La expresión de CD103 define dos poblaciones funcionales de CD que exhiben distintos roles en la coordinación de las respuestas efectoras y regulatorias de los linfocitos T. Las CD CD103⁺ están involucradas primariamente en la presentación cruzada de antígenos propios o extraños, en la inducción de

moléculas intestinales en linfocitos T efectores y en la generación de linfocitos T regulatorios ($CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$). En contraste, las CD $CD103^-$ están altamente especializadas en realizar mecanismos innatos como la atracción de leucocitos mediada por quimiocinas y la supresión de antígenos (*del Rio, et al., 2010*). La integrina $\alpha_E(CD103)\beta_7$ se expresa principalmente en CD, linfocitos T y mastocitos de la mucosa intestinal y su ligando mayormente caracterizado es la E-cadherina presente en CE. Es justamente a través de la unión de la integrina $\alpha_E\beta_7$ a la E-cadherina, lo que permite la retención de las células mencionadas cerca del epitelio en la mucosa intestinal (*Kilshaw and Higgins, 2003*). Además, la expresión de la integrina $\alpha_E(CD103)\beta_7$ está asociada a varias actividades celulares importantes como la presentación de antígenos (*del Rio, et al., 2007*), o estimulación de LT-reg (*Coombes, et al., 2007*), y algunas células T CD8 de la mucosa (*Johansson-Lindbom, et al., 2005*).

Esta subpoblación de CD puede ser encontrada en GM, LP y PP. Esta localización anatómica especial en conjunto con las señales que las CD $CD103^+$ reciben es lo que les permite desarrollar varias funciones especializadas. En primer lugar, se ha demostrado que la conversión de linfocitos T $CD4^+$ vírgenes en LT-reg $FOXP3^+$ es un proceso dependiente del factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$) y del metabolito de la vitamina A, el ácido retinoico (*Coombes, et al., 2007*) (*Yamazaki and Morita, 2013*). Por otro lado, también se describió la capacidad de las CD $CD103^+$ de generar células T $CD8^+$ efectoras $CCR9^+ \alpha_4\beta_7^{alto}$ en GM. Los linfocitos T activados en GM adquieren siempre altos niveles de la integrina $\alpha_4\beta_7$ y del receptor CCR9 de quimiocinas, y estas moléculas son importantes para su subsecuente localización en el intestino delgado (*Johansson-Lindbom, et al., 2005*) (*Jaensson, et al., 2008*).

En el tejido intestinal, la LP y el epitelio constituyen mayoritariamente un sitio efector, alojando grandes poblaciones de LT activados y células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Sin embargo, la LP también puede contribuir a la inducción de tolerancia, siendo un sitio de captación de antígeno y carga de CD migratorias que encuentran LT vírgenes en los GM. En este sentido, la inducción de tolerancia oral depende fuertemente de la captación de antígenos por las CD en la LP del intestino delgado. No obstante, todavía sigue siendo un misterio cómo es que los antígenos del lumen ganan acceso a estas CD a través de la supuestamente impermeable barrera epitelial.

Recientemente se ha identificado en ratones un tipo de CD derivadas del precursor mieloide, que pueblan la LP del intestino delgado. Estas CD dependen fuertemente del receptor de quimiocinas CX3CR1 para formar dendritas transepiteliales, lo que les permite captar

directamente antígenos del lumen (Niess, et al., 2005). De acuerdo a nuevos descubrimientos estas células CX3CR1 no tienen la capacidad de migrar desde la LP hacia los GM y no pueden presentar antígenos a LT naïve, pero sí parecen cumplir un rol accesorio, pasándoles antígenos a las CD vecinas migratorias para transportarlos y presentarlos. Son las CD103⁺ las que sirven a las clásicas funciones de las CD e inician las respuestas adaptativas en los ganglios linfáticos (Schulz, et al., 2009).

Como se ve, el fenómeno *in vivo* de inducción y mantenimiento de la tolerancia oral es un proceso de múltiples pasos que involucra tanto órganos linfoides como tejidos de la mucosa (Hadis, et al., 2011) (Figura 3).

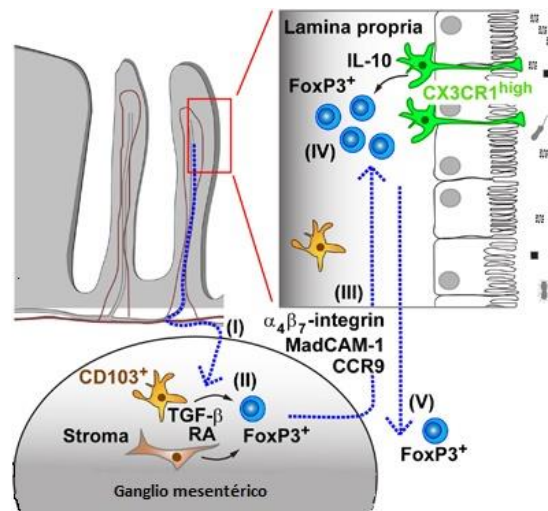


Figura 3: Modelo de múltiples pasos de tolerancia oral a antígenos solubles. La tolerancia oral es iniciada por la migración de las células dendríticas (CD) CD103⁺ cargadas de antígeno desde la lámina propia (LP) hasta los ganglios mesentéricos (GM) (I). En los GM, el ácido retinoico (AR) producido por las CD y las células del estroma induce la expresión de los receptores intestinales integrina $\alpha_4\beta_7$ y CCR9 en linfocitos T (LT) y favorece la diferenciación de linfocitos T regulatorios (LT-reg) FOXP3⁺ dependiente de TGF β (II). Estos LT-reg comprometidos vuelven a la LP intestinal (III), donde llevan a cabo una expansión secundaria bajo la influencia de IL-10 producida por las CD CX3CR1 en la LP (IV). En un quinto y putativo paso (V), algunos LT-reg pueden escapar de la mucosa por el torrente sanguíneo y/o la linfa, diseminándose a través del sistema inmune, y promoviendo consecuencias sistémicas de tolerancia oral (Pabst and Mowat, 2012).

6.2.6. Interacciones célula-célula.

Las CD presentes en la LP intestinal se diferencian a partir de monocitos precursores inflamatorios circundantes (Varol, et al., 2007). Una vez dentro del tejido, los precursores de las CD adquieren funciones de la mucosa por la interacción con el ambiente local. Existen diversos tipos celulares que pueden liberar factores que influyen las funciones de las CD.

Una fuente de estos factores son las CE intestinales (CEI), que están en contacto con las CD de la LP y se ha demostrado que pueden liberar moléculas que influyen sobre la actividad de las CPA, induciendo el desarrollo de perfiles no inflamatorios (*Iliev, et al., 2007*). Una de estas moléculas es la citoquina linfopoyetina estromal tímica (TSLP), producida en el epitelio intestinal bajo condiciones estables, que junto con otros factores derivados de CE, condiciona a las CD a liberar IL-10 e IL-6, lo que promueve la polarización de los LT a una respuesta clásica no inflamatoria del tipo Th2, e inhibe la liberación de IL-12, la citoquina que promueve la respuesta Th1. Este control de la respuesta inmune parece no estar presente en pacientes con la enfermedad de Crohn (*Rimoldi, et al., 2005*). También se ha descrito que las CEI secretan TGF- β y AR, que son necesarios para definir a CD tolerogénicas. Estas células tolerogénicas CD103⁺ además inhiben perfiles de linfocitos Th1 y Th17, lo que indica que las CEI imprimen un fenotipo de mucosa completo sobre las CD (*Iliev, et al., 2009*). Por otro lado, se ha demostrado la habilidad de ciertas bacterias de inducir expresión mediadora inmunomoduladora sobre CEI, sugiriendo que las bacterias influyen a las CD directa e indirectamente por la acción de las CEI (*Zeuthen, et al., 2008*).

6.3. Linfocitos T y la respuesta adaptativa

6.3.1. Activación de linfocitos T

Como se comentó antes, las CD cumplen un importante rol al actuar como nexo entre los tejidos periféricos y los órganos linfáticos mediante el transporte del antígeno. Diferentes interacciones y la intervención de distintas moléculas determinan el tipo de activación que sufren los LT, lo que repercute en el tipo de respuesta adaptativa.

La activación de los LT y su posterior diferenciación depende de dos señales (**figura 5**): la 1^o relacionada con la interacción entre el receptor de reconocimiento del linfocito T (TCR) y el CMH acoplado al antígeno en la CD. En esta interacción inicial interfieren además moléculas accesorias como el correceptor CD4 y CD8. La 2^o señal está dada por la interacción de las moléculas coestimuladoras presentes en la superficie de ambas células; CD28 en las células Th y CD80/CD86 en las CD (B7) (*Keir and Sharpe, 2005*), mientras que para las células Tc depende de la interacción entre las moléculas CD45R con las CD22. Esta interacción inicial dispara una compleja cascada de actividades quinasas y fosfatasas y que culminan con la activación y expresión de diversos genes, entre los que se encuentran el IL-2 y su receptor entre otras tantas proteínas. La secreción autocrina de IL-2 por parte de los linfocitos Th hace que

éstos salgan de la fase G0, provocando la proliferación y diferenciación de la célula T en dos subpoblaciones: una de células efectoras y otra de memoria.

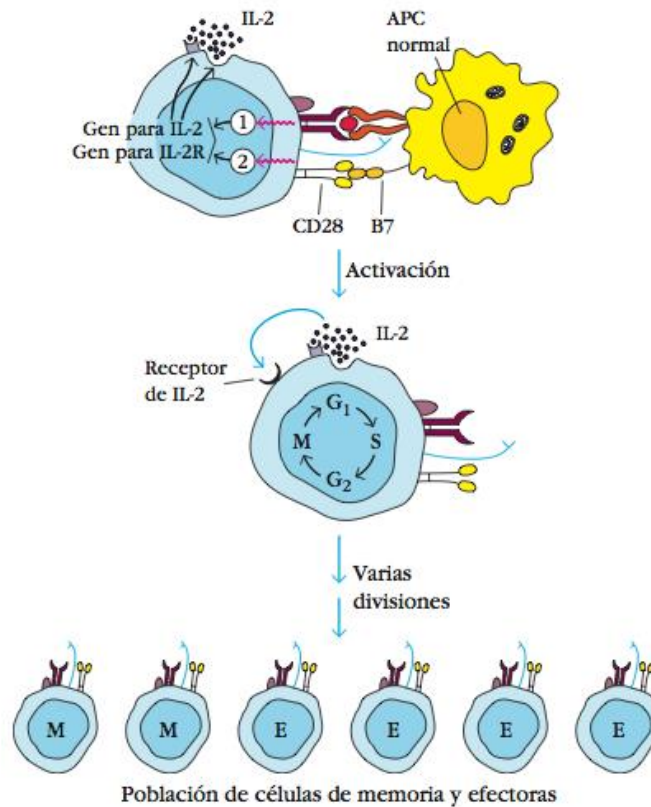


Figura 4: La activación de una célula TH por señal 1 y señal 2 coestimuladora aumenta la expresión de IL-2 y receptor de IL-2 de alta afinidad, lo que ocasiona el ingreso de la célula T en el ciclo celular y varios ciclos de proliferación. Algunas de las células se diferencian en efectoras y otras en células de memoria.

Por otro lado uno de los puntos clave en la activación completa de los LT está dado por las citoquinas liberadas al momento del encuentro con las CD (Curtsinger, et al., 1999).

Las CD como otras células del sistema inmune innato, detectan y responden a los patógenos a través de la expresión de los receptores de reconocimiento de patrones (Pattern recognition receptors, PRR). Existen distintos tipos de PRR: los receptores tipo Toll (TLR), los receptores tipo RIG-I, los receptores tipo Nod y los receptores lectina tipo 1. La interacción de las CD con los ligandos de estos PRR resulta en la expresión de diferentes citoquinas que modularan el tipo de respuesta T efectora así como la función resultante de esta interacción que

depende de cómo se comprenderá el patógeno reconocido por la CD en periferia (*Agrawal, et al., 2010*)

6.3.2. Plasticidad de los linfocitos T

La replicación de microorganismos infecciosos en el foco inflamatorio desencadena una serie de eventos que resulta en el reclutamiento de linfocitos T efectores con funciones capaces de contener al microorganismo invasor.

Una vez realizada la presentación del antígeno por células presentadoras, como las CD antes descritas, las células T CD4⁺ vírgenes pueden diferenciarse en distintos tipos de células efectoras, las cuales incluyen: las clásicas Th1 y Th2, las recientemente definidas Th17, las T helper foliculares (Tfh), y las T regulatorias (LT-reg). La decisión de la diferenciación está predominada por las citoquinas en el microentorno y por la fuerza de la interacción entre el receptor del antígeno de la célula T con el mismo (*Boyton and Altmann, 2002*). Las células Th1 se caracterizan por su producción de IFN- γ y están involucradas en la inmunidad celular contra microorganismos intracelulares. La producción de IL-12 por parte de las células de la inmunidad innata y la producción de IFN- γ tanto por las NK como por LT priman la polarización de las células hacia la diferenciación de células Th1. Las células Th2 se producen en ausencia de IL-12 y en bajos niveles de IL-4 producidos por mastocitos o células NK y se caracterizan por la producción de IL-4, IL-5 e IL-13, y son requeridos por la inmunidad humoral para el control de helmintos y otros patógenos extracelulares, además se asocian a la inducción de respuestas de hipersensibilidad. Las células Th17 producen IL-17A, IL-17F e IL-22 y juegan un importante rol en el despeje de hongos y bacterias extracelulares, especialmente en la superficie de la mucosa. La diferenciación de estas células Th17 requiere de ROR γ t (retinoid-related orphan receptor), un factor de transcripción que se induce por TGF- β en combinación con IL-6, IL-21 e IL-23 (*Ivanov, et al., 2007*). Recientemente se ha descubierto que células Th17 intestinales sufren una desviación hacia un fenotipo de célula T auxiliar folicular o Tfh en las PP, donde inducen centros germinales y el desarrollo de una respuesta IgA protectora para el hospedador, mostrando una baja dependencia de IL-23 para su mantenimiento o plasticidad hacia Tfh (*Hirota, et al., 2013*). Siguiendo con este contexto, las células Tfh son un subtipo de células Th que regulan la maduración de la respuesta celular B y su diferenciación requiere de la citoquina IL-21 (*Nurieva, et al., 2008, Vogelzang, et al., 2008*). Por otro lado, se encuentra otro tipo de células auxiliares, las LT-reg, responsables del mantenimiento de la

homeostasis de la inmunidad, regulando las respuestas de las células T efectoras. Existen dos tipos de LT-reg, las células $\text{Foxp3}^+ \text{CD25}^+ \text{CD4}^+$ T reguladoras naturales derivadas del timo y las células $\text{Foxp3}^- \text{CD25}^+ \text{CD4}^+$ T reguladoras inducidas de la periferia (Tireg). Los LT-reg se caracterizan por la expresión de factor de transcripción forkhead (FOXP3), el cual en los Tireg es inducido con la presencia de $\text{TGF-}\beta$ de la periferia y CD (Yamazaki and Morita, 2013), mientras que investigaciones recientes demostraron que CD tratadas con tioperamida, un antagonista de los receptores de la histamina, aumentaron la inducción y reclutamiento de células T reguladoras en la respuesta alérgica en ratones (Amaral, et al., 2011).

Descubrimientos recientes sugieren que las células T CD4^+ a veces tienen la capacidad de redirigir sus programas funcionales, lo cual afecta el balance entre los LT-reg y las células T efectoras de citoquinas (**Figura 6**) (Zhou, et al., 2009).

Por otra parte, los linfocitos T CD8 vírgenes están predeterminados a diferenciarse a células citotóxicas al reconocer su péptido específico asociado a las moléculas del CMH de clase I expresadas por las CD. Estas células son fundamentales en la protección contra virus y células neotransformadas.

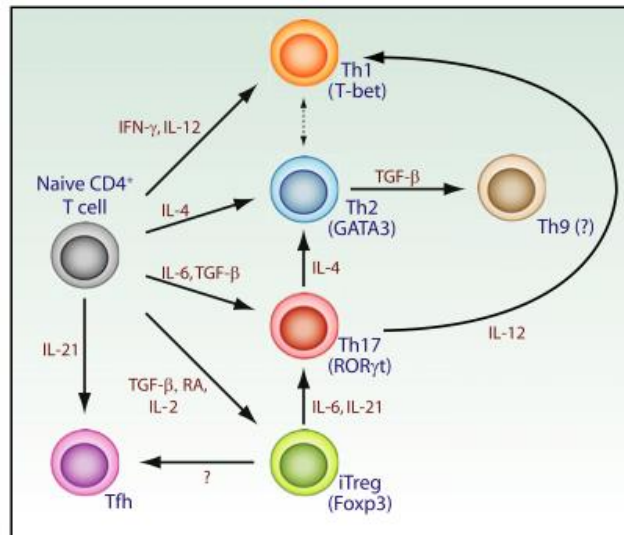


Figura 5: El entorno de las citoquinas determina la diferenciación y la conversión celular de las CD4⁺ T. Al encontrarse con los antígenos extraños presentados por las células presentadoras de antígeno (CPA), las células TCD4⁺ vírgenes pueden diferenciarse en Th1, Th2, Th17, T reguladoras (LT-reg), y las células Tfh. Estos programas de diferenciación son controlados por citoquinas producidas por las células inmunes innatas, como la IL-12 e IFN- γ , que son importantes para la diferenciación de células Th1, y la IL-4, que es crucial para la diferenciación de células Th2. El TGF- β junto con la IL-6 induce la diferenciación de células Th17, mientras que la diferenciación de los LT-reg es inducida por TGF- β , ácido retinoico (AR) e IL-2. La diferenciación celular Tfh requiere IL-21. Los factores de transcripción específicos que orquestan el programa de diferenciación de cada ayudante subconjunto de células T han sido identificados: T-bet para las células Th1, GATA3 para las células Th2, ROR γ t para las células Th17, y FOXP3 para LT-reg. Las células T efectoras habían sido consideradas como linajes terminales diferenciadas, pero ahora parece que hay una considerable plasticidad que permite la conversión a otros fenotipos. Aunque las células Th1 y Th2 muestran fenotipos más estables, los LT-reg y las células Th17 pueden cambiar fácilmente a otros programas de células T cooperadoras bajo ciertas condiciones de citoquinas. Por ejemplo, LT-reg pueden convertirse en células Th17 a la estimulación de la producción de IL-6 e IL-21. Los LT-reg también pueden cambiar a células Tfh, y esto requiere células B y la interacción CD40-CD40L. Células Th17 pueden cambiar a células Th1 productoras de IFN- γ o células Th2 productoras de IL-4 cuando son estimuladas por IL-12 o IL-4, respectivamente. La evidencia también sugiere que las células Th2 pueden cambiar a células productoras de IL-9 en respuesta a TGF- β , aunque no está claro si estas células “Th9” representan verdaderamente un linaje distinto.

6.3.3. Linfocitos T en el contexto intestinal

La respuesta inmune intestinal está típicamente subdividida en eventos que ocurren en los sitios inductivos, PP y GM, o en los sitios efectoros, LP y el compartimiento de linfocitos intraepiteliales (LIE). Los LIE sirven como guardias de la puerta de entrada a la superficie del epitelio intestinal ya que monitorean constantemente la capa epitelial en busca de infecciones y disrupciones. Distintos subsets de LIE sirven a un amplio rango de funciones en la mucosa intestinal (*Sheridan and Lefrançois, 2010*).

Se distinguen dos grupos de linfocitos que residen en la capa epitelial intestinal de ratones, basados en la expresión del TCR $\alpha\beta$ o del TCR $\gamma\delta$. Asimismo pueden ser subdivididos

en base a la expresión del correceptor CD8. La gran mayoría de los LT $\gamma\delta^+$ en el compartimiento de LIE expresan el correceptor CD8 $\alpha\alpha$, pero una pequeña proporción expresa tanto el CD8 α como el CD8 β . Este es un gran contraste con los LT $\gamma\delta^+$ localizados en los tejidos linfoides, que generalmente no expresan CD8 (*Sheridan and Lefrançois, 2010*). En humanos, los LT $\gamma\delta^+$ representan cerca del 10 % de los LIE, pero incrementan drásticamente bajo ciertas condiciones alérgicas o inflamatorias, como la enfermedad celíaca (*Spencer, et al., 1991*). Los LIE T $\alpha\beta$ son los predominantes en el intestino humano, lo que se cree es por la gran exposición a microbios patogénicos.

Varias funciones efectoras han sido atribuidas a los LT $\gamma\delta^+$, incluyendo rápida producción de citoquinas que pueden regular la eliminación de patógenos, la inflamación y la homeostasis intestinal. Los LT $\gamma\delta^+$ aislados de tejidos linfoides pueden: promover la inflamación mediante la producción de IL-17 o INF- γ y la lisis de células infectadas (*Hamada, et al., 2008, Martin, et al., 2009, Sutton, et al., 2009*); detener la inflamación mediante la liberación de IL-10 (*Rhodes, et al., 2008*); y proteger la integridad de las CE por la producción del factor de crecimiento de queratinocitos (*Chen, et al., 2002*). Sin embargo el rol preciso de estos linfocitos en la mucosa intestinal todavía permanece como una incógnita.

6.4. Leucotrieno C4 (LTC4)

6.4.1. Aspectos generales

Los cisteinil leucotrienos (CysLT), leucotrieno C4 (LTC4), LTD4 y LTE4, son mediadores de las reacciones de hipersensibilidad inmediata, y son bien caracterizados como potentes agonistas de la broncoconstricción y la permeabilidad vascular. Actúan como potentes mediadores lipídicos y su producción excesiva está relacionada con manifestaciones patológicas de varios desórdenes inflamatorios, tales como el asma, la artritis, psoriasis, colitis ulcerativa y la lesión por reperfusión isquémica (*Byrum, et al., 1999*). El LTC4 es un potente espasmógeno y vasoconstrictor, promueve la secreción de moco y, junto con la histamina, es un conocido agente inmunomodulador de las reacciones alérgicas e inflamatorias. La activación biológica de los CysLT está mediada por dos receptores unidos a proteína G, receptor CysLT de tipo 1 (CysLTR1) y receptor CysLT de tipo 2 (CysLTR2), los cuales son conocidos y fueron clonados y caracterizados. CysLTR1 tiene mayor afinidad por LTD4 que por LTC4 y es expresado mayormente en el músculo liso bronquial y en la mayoría de la población de leucocitos. El CysLTR2 tiene igual afinidad para el LTC4 y para el LTD4, y es expresado en la

mayoría de los tejidos (Thivierge, et al., 2009). El conocimiento de estos receptores permitió el desarrollo de antagonistas para su uso farmacológico como el montelukas o el paralukast (Cho, 2010, Kawano, et al., 2014).

6.4.2. Síntesis

Los leucotrienos son generados en la vía de la 5-lipoxigenasa (5-LO) y el ácido araquidónico (AA), descrita en la **figura 4**.

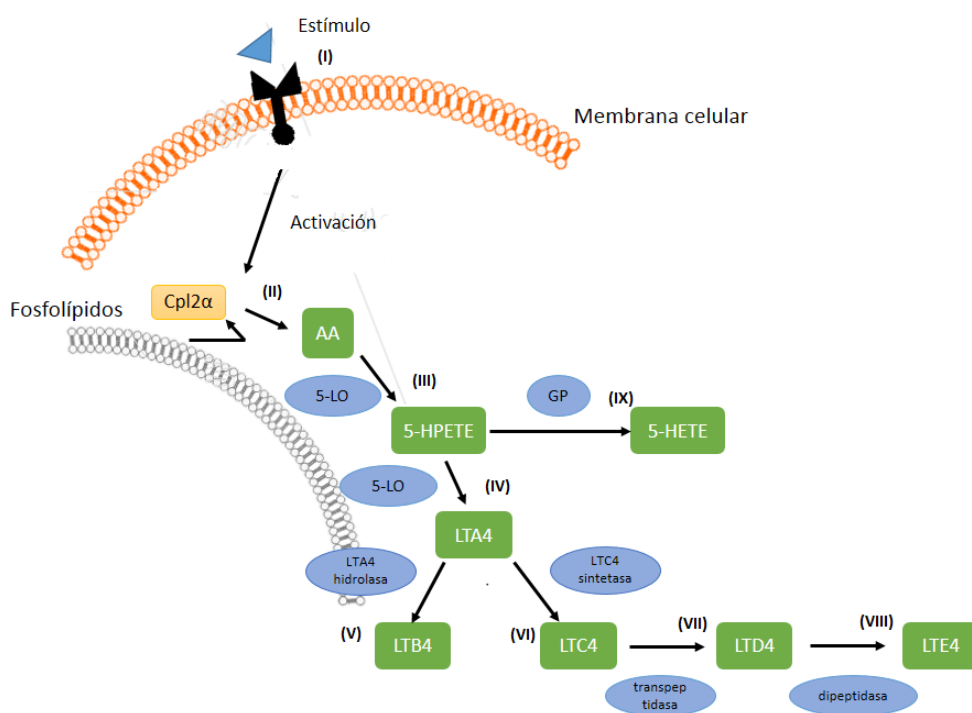


Figura 6: vía de síntesis de leucotrienos. En primer lugar, cuando el estímulo correspondiente se une a un receptor de la membrana celular de macrófagos, eosinófilos y mastocitos (I), la fosfolipasa $A_{2\alpha}$ citosólica (Cpl2 α) es activada y libera al ácido araquidónico (AA) de los fosfolípidos de la membrana (II). La 5-lipoxigenasa cataliza la dioxigenación del AA, que resulta en dos compuestos intermedios químicamente inestables, el ácido 5(S)-hidroperoxi-6-trans-8,11,14-cis-eicosatetraenoico (5-HPETE) (III) y el leucotrieno A4 (LTA4) (IV). Dependiendo de la enzima celular presente, el LTA4 puede ser convertido en leucotrieno B4 (LTB4) por la LTA4-hidrolasa (V) o conjugado con glutatión por la LTC4-sintetasa para generar leucotrieno C4 (LTC4) (VI). El procesamiento siguiente del LTC4 produce LTD4 mediante una transpeptidasa (VII) y LTE4 por una dipeptidasa (VIII). Por otro lado, el 5-HPETE puede ser reducido por glutatión peroxidasa (GP) para formar el correspondiente ácido 5(S)-hidroxi-6-trans-8,11,14-cis-eicosatetraenoico (5-HETE) (IX). Los leucotrienos ejercen sus efectos biológicos uniéndose a receptores transmembrana acoplados a proteínas G en la superficie celular de sus células blanco (no mostrado en este esquema) (Steinhilber, et al., 2010).

Las células inflamatorias como los mastocitos, eosinófilos, basófilos y macrófagos alveolares poseen la proteína integral de membrana LTC4 sintetasa, que es la encargada de la síntesis de los CysLT en respuesta a diversos estímulos. Alternativamente, los CysLT pueden

ser producidos por metabolismo transcelular a partir de la enzima LTA4 hidrolasa presente en los neutrófilos, plaquetas, células endoteliales, monocitos de sangre periférica y mastocitos, entre otras. Esta vía alternativa es muy importante ya que permite la generación de altas concentraciones de CysLT en el microambiente local, que pueden en última instancia afectar la función orgánica.

6.4.3. Los cistenil leucotrienos y las células dendríticas

A pesar de su bien conocido rol en la inflamación, la participación de los cysLT en la regulación de diferentes aspectos de la inmunidad adaptativa, incluyendo las funciones de las CPA, siguen siendo un debate (*Goulet, et al., 1994*).

Además de sus ya sabidos efectos sobre la respuesta inflamatoria, pocos trabajos han estudiado el rol de los CysLT como moduladores de la función de las CD. Los primeros estudios demostraron que el LTC₄, a diferencia del LTB₄, LTD₄ y prostaglandina E₂ (PGE₂), representa un potente estimulador de la migración de CD derivadas de monocitos humanos sin interferir negativamente con las propiedades inmunoestimuladoras de las CD maduras (*Dannull, et al., 2012*). Este transporte parece depender del transportador multidroga resistente asociado a proteína 1 (MRP-1) de LTC₄, el cual parece transportar al LTC₄ al espacio intracelular, en donde el mismo promueve la quimiotaxis de CCL19 y la posterior movilización de las CD desde la epidermis hacia los nódulos linfáticos (*Robbiani, et al., 2000*). Los CysLT no sólo intervienen en la movilidad de las CD, sino que también se ha demostrado en modelos murinos de asma que ciertos tipos de CysLT, como el LTD₄, pueden regular las funciones de estas células (*Machida, et al., 2004*), y aún más interesante las capacidades que tienen para poder modular la liberación de citoquinas por parte de las CD (*Jozefowski, et al., 2005*).

En recientes estudios sobre los efectos del LTC₄ en la respuesta inflamatoria se observó que: tanto las CD inmaduras como las CD activadas por LPS, un clásico agonista del TLR 4 que desencadena un perfil Th1, expresan ambos receptores CysLT1 y CysLT2; el LTC₄ parece restaurar la capacidad endocítica de las CD activadas con LPS, interviniendo en su completa maduración, actuando también como antagonista del LPS al disminuir la expresión del CMH de clase II de las CD activadas; al tratar con LTC₄ las CD activadas con LPS, se demostró que interfería con su maduración y provocaba una diferencia en el tipo de respuesta

provocado por la CD, inhibiendo fuertemente la liberación de IL-12p70 e incrementando la liberación de IL-23, activador de la respuesta Th17 (*Alvarez, et al., 2011*).

6.4.4. Procesos pato-fisiológicos modulados por los cisteinil-leucotrienos.

El papel patofisiológico de los CysLT en diferentes condiciones inflamatorias ha sido ampliamente estudiado en diversas patologías de etiología inflamatoria como las alergias, enfermedades cardiovasculares, gastritis y cáncer. Estudios con montelukast, antagonista del receptor 1, en pacientes asmáticos mostró una mejora en la sintomatología durante la etapa aguda del asma así como una disminución de los efectos secundarios provocados por el uso de corticoides en dichos pacientes.

En enfermedades cardiovasculares, diversos trabajos han demostrado una asociación con los CysLT, la cual se basa en la capacidad de los mismos de contraer la microvasculatura, aumentar la permeabilidad de las vénulas post-capilares, reducir el flujo sanguíneo coronario a través de la constricción directa coronaria, disminuir la contractilidad miocárdica y el gasto cardíaco (*Feuerstein, 1984, Letts, 1987, Lefer, 1988*). Cabe resaltar que los individuos con inflamación cardiovascular muestran un aumento en la expresión del gen ALOX5AP así como en la secreción de cisteinil leucotrienos por los neutrófilos (*Helgadottir, et al., 2004*), efecto asociados con una mayor prevalencia del infarto del miocardio y accidentes cerebrovasculares.

Por otro lado, en enfermedades como el cáncer se ha demostrado la expresión de la proteína activadora 5-LO en una amplia variedad de células tumorales, sugiriendo un rol de esta enzima así como de los CysLT en el proceso de la carcinogénesis y crecimiento tumoral (*Romano and Claria, 2003, Catalano, et al., 2005*).

Los CysLT y su participación en el desarrollo de distintas patologías vienen siendo estudiados hace tiempo, buscando como tratamientos alternativos la utilización de antagonistas de los receptores de CysLT. Es por ello que el presente proyecto, al estudiar la modulación que genera el LTC₄ en el microambiente celular del intestino, léase CD y linfocitos T, busca brindar un mayor conocimiento para poder comprender el efecto que generan los CysLT en la mucosa gastrointestinal para así poder desarrollar tratamientos efectivos contra las patologías relacionadas.

7. Hipótesis

La hipótesis que intentamos responder es si el cistenil leucotrieno C4 (LTC₄) es capaz de inducir un perfil inflamatorio en la mucosa, revirtiendo la función tradicional de las células dendríticas y los linfocitos T murinos en el microambiente intestinal.

8. Metodología

8.1. Ratones

En todos los experimentos se emplearon ratones hembras vírgenes de la cepa BALB/C de 7 a 10 semanas de edad, provistos por el bioterio del ILEX, de la Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina. Fueron criados en cajas de 6 ratones y mantenidos a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo un régimen automático de luz-oscuridad de 12 hs. Los cuidados de los animales estuvieron hechos de acuerdo con la reglamentación institucional.

8.2. Modelo de tolerancia oral

Se indujo tolerancia a una proteína soluble, la ovoalbúmina de huevo (OVA), para lo cual se utilizó un modelo ampliamente conocido (*Alvarez, et al., 2011*) en ratones. La dosis diaria se calcula en base a lo que toman en promedio los ratones (5 ml/día) durante 5 días. Los ratones controles reciben sólo agua. Luego se mata a los ratones y se extraen los ganglios mesentéricos, el intestino delgado, las placas de Peyer o la médula ósea. Las suspensiones celulares son tratadas con LPS, LTC₄ o ambos.

8.3. Obtención de células dendríticas a partir de precursores de médula ósea

Las epífisis de los huesos fémur y tibia se cortan y las médulas se extraen mediante lavado con medio RPMI 1640 (Invitrogen), según la Técnica de Inaba y colaboradores (*Inaba, et al., 1992*) con modificaciones. Los eritrocitos se lisan utilizando cloruro de amonio al 0.083%. Luego de lavar las células, las mismas se resuspenden a una concentración de 1×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), $5,5 \times 10^{-5}$ mercaptoetanol (Sigma Aldrich) y 30% de medio condicionado proveniente del sobrenadante de la línea celular J588-GM productoras del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF).

8.4. Obtención de poblaciones celulares a partir de placas de Peyer, ganglios mesentéricos e intestino delgado

Luego de la inducción con OVA, los ratones tratados y no tratados se matan y los intestinos son extraídos cuidadosamente, se lavan exhaustivamente con PBS y se incuban a 37°C en PBS+ β -Mercaptoetanol (0.1%) 3 veces para la eliminación de las bacterias comensales y materia fecal del sobrenadante. Luego, para la obtención de las distintas poblaciones celulares presentes en el intestino, los mismos se escinden en pequeños trozos y se tratan con una solución de colagenasa Tipo I (250U/ml), durante 30 minutos a 37°C. Luego del tiempo de incubación, se frena la reacción por incorporación de PBS suplementado con 5% SFB. Posteriormente, los fragmentos se incuban con DNasa I (50U/ml), durante 40 min 37°C. Finalmente, se recolectan las suspensiones celulares resultantes del tratamiento y se lavan en PBS. Las poblaciones celulares obtenidas se resuspenden en medio RPMI completo.

Para la obtención de ganglios mesentéricos y placas de Peyer la diferencia radica en que a los 7 días de tratamiento con OVA ambos tejidos se escinden, se colocan en meshes y se trituran para disgregarlos y obtener una masa homogénea. Luego se filtran y se resuspenden en medio RPMI completo.

8.5. Obtención de monocapa epitelial de intestino

El intestino delgado de ratones de dos semanas de edad fue removido y abierto a lo largo del borde anti mesentérico. El tejido fue colocado en una placa de Petri con una pequeña cantidad de PBS, y mediante una jeringa se le inyectó PBS para su lavado. Se pasó a otra placa limpia y se le agregó una solución plus de sal balanceada de Hank (HBSS+) (HBSS 500 mL, 25mM HEPES, 1% suero fetal bovino (HyClone Laboratories, Logan, UT), 100U penicilina, y 100 μ g de estreptomina. El tejido fue invertido gentilmente para remover el contenido luminal. Para remover la capa epitelial, el tejido fue suspendido en una solución de HBSS sin calcio y magnesio + 5mMn de EDTA y se lo agitó a 300RPM por 15 minutos a 37°C. Se extrajo el sobrenadante conteniendo el epitelio y se lo colocó en un tubo de 15 ml. Se centrifugó y se descartó el sobrenadante, resuspendiendo en una solución de Hank al 5% con penicilina y estreptavidina.

8.6. Reactivos

Ovoalbúmina (OVA), suero fetal bovino (SFB), Leucotrieno C4 (LTC4), y LPS de *E. Coli* 0111:B4 de Sigma-Aldrich.

8.7. Cultivo mixto de células dendríticas y células epiteliales

Las poblaciones celulares extraídas de ganglios mesentéricos fueron cocultivadas con monocapas de líneas celulares de queratinocitos PAM 212 hasta llegar a confluencia y tratadas con LPS y LTC4. También se cocultivaron CD inmaduras extraídas de médula ósea y previamente tratadas con LPS y LTC4 con líneas celulares PAM 212 y con extracto de intestino delgado.

8.8. Ensayos con LPS y LTC4

Los cultivos generados a partir de los ganglios mesentéricos de ratones tolerizados y no tolerizados fueron tratados con LPS (10 μ M) durante 15 minutos a 37°C y posteriormente con o sin LTC4 (10⁻⁸ M) durante 15 minutos a 37°C. Los cultivos controles no fueron tratados con ningún compuesto.

Los cocultivos preparados fueron sometidos al mismo tratamiento. Otra serie de cocultivos fue tratada con OVA, LPS y LTC4. Luego de los tratamientos, los pellets de los cocultivos se marcaron con distintos anticuerpos para analizarlos mediante citometría de flujo y evaluar las moléculas expresadas en la superficie de las células.

8.9. Análisis de la expresión de moléculas de superficie de células dendríticas y linfocitos mediante citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica utilizada para obtener información física y química de partículas individuales en un fluido a medida que pasan a través de uno o más láseres. Generalmente se puede conocer el tamaño relativo, la granulosidad y la intensidad de fluorescencia relativa de cada partícula, que puede ser una célula, un organismo o un bead. La intensidad de fluorescencia relativa se produce por el uso de marcadores fluorescentes que se conjugan a anticuerpos específicos capaces de unirse a moléculas target. Se utilizan anticuerpos monoclonales, capaces de unirse a un único epítipo y controles de isotipo, utilizados para monitorear el pegado inespecífico de los anticuerpos. Los marcadores fluorescentes utilizados fueron FITC (verde, excitado a 532 nm), PE (rojo, excitado a 635 nm) y PercP (violeta, excitado

a 405 nm). En este tipo de citometría, la muestra es inyectada bajo vacío y se genera un flujo laminar que permite el paso de una única célula a través del tubo sobre el que se irradia el láser (figura 7).

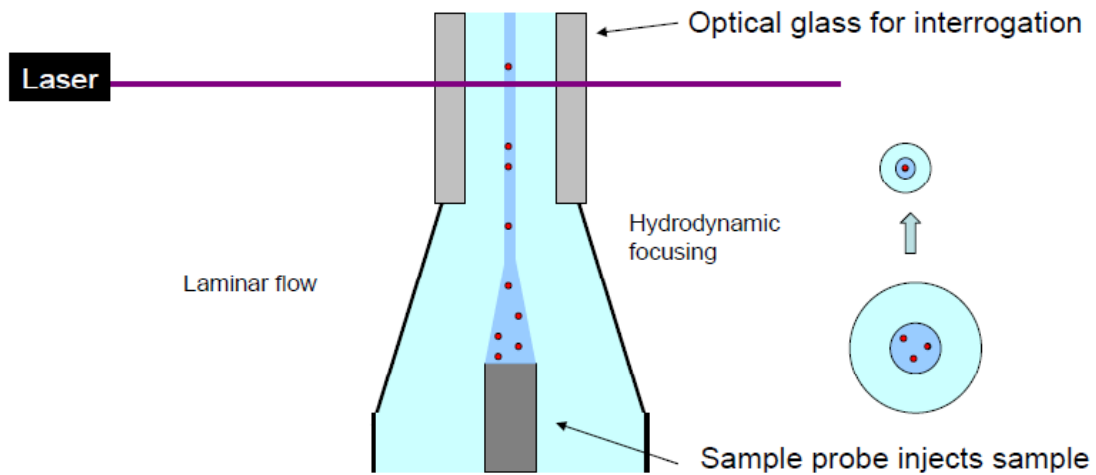


Figura 7: Citometría de flujo. Esta técnica permite el análisis particular de cada célula presente en una muestra líquida, ya que el flujo laminar que se genera en el aparato permite que las células pasen una a una por el tubo, mientras que un láser incide perpendicularmente sobre ellas.

En última instancia la señal óptica obtenida a partir de la excitación con el láser es transformada a señal electrónica que es analizada y transferida a una computadora.

Con el fin de evaluar la expresión de moléculas en la superficie de las CDs, los siguientes anticuerpos conjugados a FITC fueron utilizados: anti-CD11c, anti-T $\gamma\delta$, anti-CD40 y anti-CD4. Conjugados a PE: anti-CD103, anti-CD86 y anti-CD8. Conjugados a PerCP: anti-B220 y anti-FoxP3. Las suspensiones celulares (5×10^5 células) fueron incubadas con los anticuerpos indicados, diluidos en PBS a 4°C durante 30 minutos. Luego, las células fueron lavadas con PBS y finalmente resuspendidas en 400 μ L de buffer Isoflow (Beckman). Los controles de isotipo se utilizaron como controles negativos de marcación específica. El análisis fue realizado utilizando un citómetro FACScan y el software CellQuest (BD Biosciences). Los resultados se expresan como la intensidad media de fluorescencia (IMF).

8.10. Determinación de citoquinas por ELISA

Los niveles de citoquinas provenientes de sobrenadantes de los distintos cocultivos se determinaron por ELISA (ver Anexo 1). La técnica se realizó de acuerdo a lo estipulado

por el fabricante. Los límites de detección fueron: 10 pg/ml (IL-12p40), 8 pg/ml (TNF - α), 4 pg/ml (IL-6) (ebiosciences) y 5 pg/ml para la IL-17 (Quantikine; R&D systems).

8.11. Análisis estadístico

Aquellos ensayos en los que se tomaron dos muestras ($N = 2$) los histogramas muestran la barra de error que indica la dispersión de las muestras (desvió estándar [DE]). En los histogramas de las muestras con $N > 2$, se muestra la barra de error correspondiente al error estandar (EE) y en aquellos ensayos en los que no haya habido repeticiones ($N = 1$) no se muestra la barra de error. La significancia estadística entre las medias se determinó mediante el T-test de Student. La $p \leq 0,05$ fue considerada como estadísticamente significativa y se expresa con un asterisco (*) sobre el tratamiento correspondiente. Las probabilidades no significativas ($p > 0,05$) no se exhiben en los gráficos.

9. Resultados

9.1. Caracterización de ratones tratados y no tratados con ovoalbúmina (OVA)

9.1.1. La administración de OVA en la dieta de los ratones modifica su peso

En primer lugar se evaluó el efecto de la ovoalbúmina (OVA) sobre el peso de los ratones. Se indujo tolerancia a un grupo de 6 ratones administrando OVA en la dieta, de acuerdo a la cantidad de agua que consumen en promedio (5 ml/día), mientras que otro grupo de 6 ratones no fue tolerizado (grupo control). Como se observa en la **figura 8**, se evaluó el peso luego de 6 días de tratamiento y se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos grupos de ratones, siendo el peso promedio de los ratones tolerizados menor que el de los ratones controles.

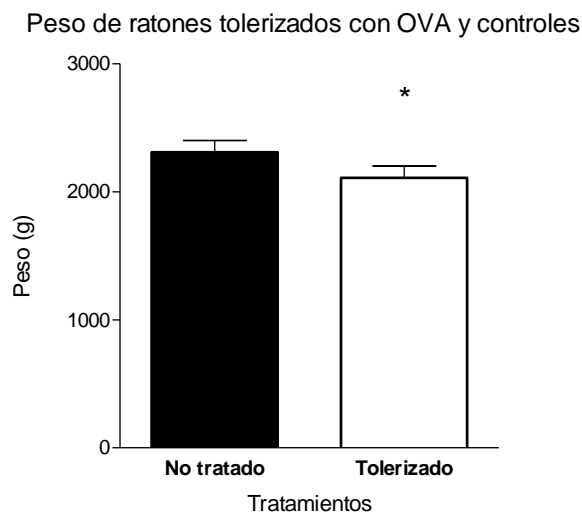


Figura 8: peso promedio de seis ratones tolerizados luego de seis días de tratamiento con OVA y seis ratones no tratados (controles). $p \leq 0,05$, $N=6$.

9.1.2. Reacción de hipersensibilidad retardada

La hipersensibilidad es una reacción inmunitaria exacerbada producida por el propio organismo a agentes que normalmente no resultan ser nocivos, y puede causar diversos tipos de daño tisular. La hipersensibilidad tipo IV es también conocida como retardada o tardía (HR) ya que puede llegar a tomar entre 2 y 6 días en instalarse, y no es mediada por anticuerpos sino por linfocitos T. Se utiliza para determinar la inducción de una respuesta inmune celular a un antígeno particular por la activación de los linfocitos T de memoria específicos que se generaron luego de la respuesta. En este ensayo se utilizaron 12 ratones a los que se les incorporó OVA en el agua durante 6 días y otros 6 ratones que sirvieron de control. Luego de 5 días de tratamiento 6 ratones tolerizados fueron inyectados con OVA y 6 con solución fisiológica

(controles) en la pata trasera, mientras que 3 ratones no tratados fueron inyectados con OVA y otros 3 fueron inyectados con solución fisiológica (controles). Luego se midió la inflamación de la pata trasera inyectada de cada ratón. No se observaron diferencias significativas entre los grupos estuvieran o no tolerizados (**figura 9A**). Es decir, que los ratones fueron efectivamente bien tolerizados como consecuencia de que no son respondedores al antígeno administrado. Además, este ensayo demuestra que la tolerancia es sistémica. Diferente es lo que se observa cuando se inmunizan los ratones con OVA (100 mg/ml; en adyuvante de Freund completo [ver Anexo 2]) por vía endovenosa y a los 15 días se realiza la reacción de hipersensibilidad, encontrándose un aumento de la respuesta inflamatoria, mediada por los LT de memoria específicos para la OVA (**Figura 9B**).

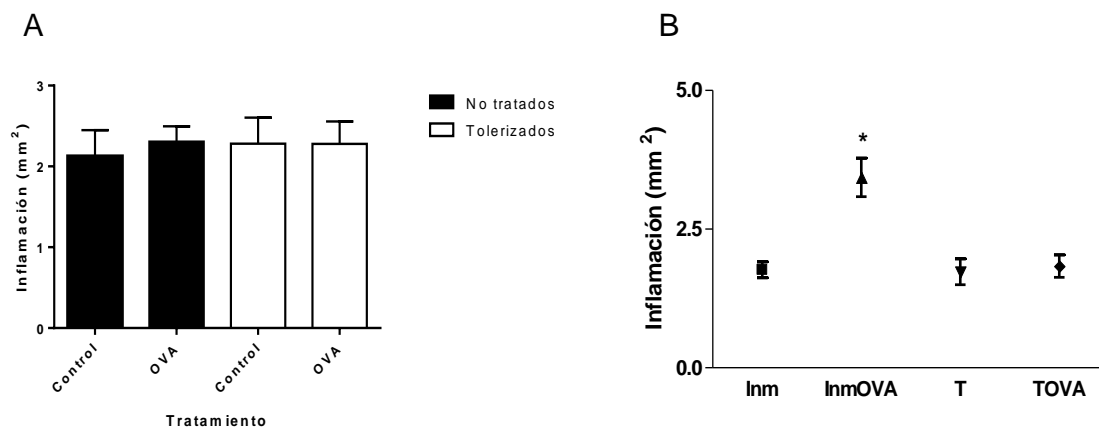


Figura 9: Reacción de hipersensibilidad retardada. Doce ratones fueron tratados con OVA (tolerizados), de los cuales seis fueron sometidos a inyecciones con OVA y seis a inyecciones con solución fisiológica (control), luego de cinco días de tratamiento. Por otro lado, a seis ratones no se les administró OVA (no tratados) y luego de cinco días, tres de ellos fueron inyectados con OVA y otros tres con solución fisiológica (control). Se midió la inflamación de la pata trasera derecha, expresada en mm², y no se observaron diferencias significativas, lo que supone que los ratones fueron efectivamente tolerizados (A). Otro grupo de ratones se inmunizaron (Inm) con Ova (100 mg/ml; en Freund's completo). A los 15 días se inyectaron en la pata trasera con OVA (InmOVA y TOVA) o SF, 5 días después se midió la inflamación. * $p < 0,05$, $N=3$ (B).

9.1.3. La inducción de tolerancia oral modifica la expresión fenotípica de células dendríticas y linfocitos B y T de ganglios mesentéricos

Utilizando el mismo modelo de tolerancia, se estudiaron las poblaciones celulares en ganglios mesentéricos de ratones tolerizados y ratones no tratados. Como se muestra en la **figura 10**, no se observaron diferencias significativas en la expresión de los distintos tipos celulares pero se puede observar una tendencia de los ratones tolerizados a presentar mayor reclutamiento de células dendríticas CD11c⁺/B220⁺ (CD plasmacitoides) y linfocitos T CD4⁺ y

menor cantidad de linfocitos T CD8⁺. En cuanto a las células dendríticas CD11c⁺/CD103⁺ el porcentaje es similar tanto en ratones tolerizados como en ratones no tratados. Y en lo que respecta a la expresión promedio de marcadores por célula, se observa que hay mayor expresión de moléculas CD103 y B220 (**Figura 11A**) así como de CD4 (**Figura 11B**), aunque las diferencias no son significativas.

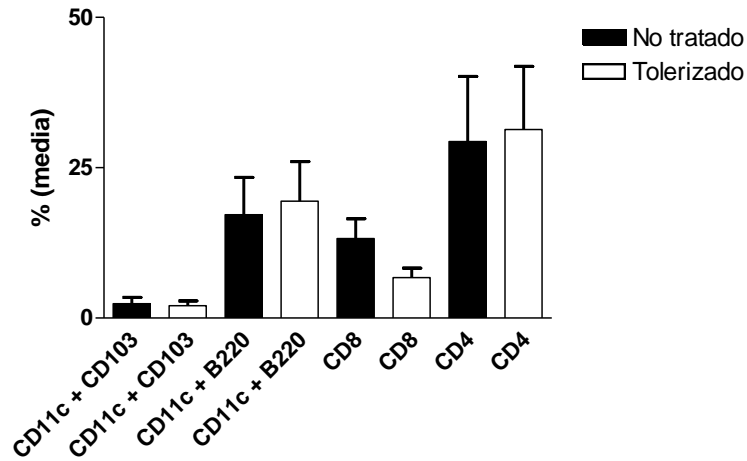


Figura 10: Porcentaje de células en ganglios mesentéricos de ratones BALB/C extraídos a 6 de tratamiento con y sin OVA. Los ganglios mesentéricos fueron extraídos de los dos grupos de ratones y dos cultivos primarios en medio RPMI fueron hechos a partir de los ganglios disgregados. Luego de cultivarlos 24 hs a 37°C, los cultivos se centrifugaron y los pellets se marcaron con anticuerpos anti-CD11c, anti-CD103, anti-B220, anti-CD4 y anti-CD8 y analizados mediante citometría de flujo. N= 10 (CD11c/CD103), 10 (CD11c/B220), 6 (CD8) y 4 (CD4).

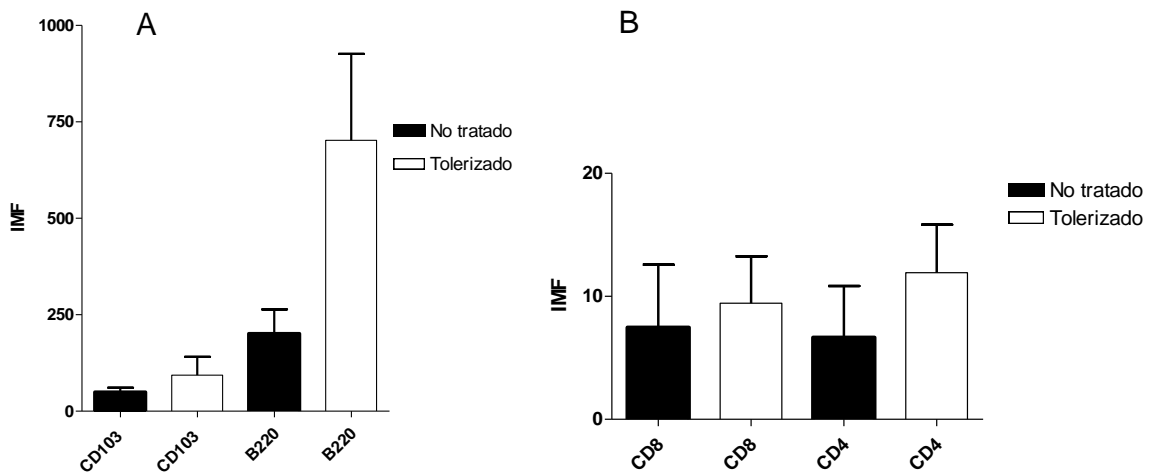


Figura 11: Se evaluó la expresión promedio por célula de receptores CD103 y B220 (A), CD8 y CD4 (B) en ganglios mesentéricos de ratones BALB/C extraídos a 6 días del tratamiento con y sin OVA. Los resultados se expresan como intensidad media de fluorescencia (IMF) y representan la media aritmética ± EE de 6 experimentos.

9.1.4. Análisis fenotípico del intestino delgado

Para el estudio de las poblaciones celulares del intestino delgado se tomaron muestras de los ratones tratados con OVA y sus respectivos controles. Luego del procesamiento de los intestinos según se explicó en el punto 4 de materiales y métodos, se analizaron las suspensiones celulares por citometría de flujo. Como se muestra en la **figura 12**, las suspensiones provenientes de ratones tolerizados mostraron un porcentaje menor de CD CD11c⁺/CD103⁺ que los controles. Asimismo, se observó un mayor porcentaje de linfocitos CD4⁺ que expresan la cadena $\gamma\delta$ del receptor T (T $\gamma\delta$), con respecto a las expresadas por los linfocitos CD8⁺, tanto para los ratones tratados o no con OVA. Llamativamente, los ratones tolerizados mostraron una mayor proporción de linfocitos B (B220⁺).

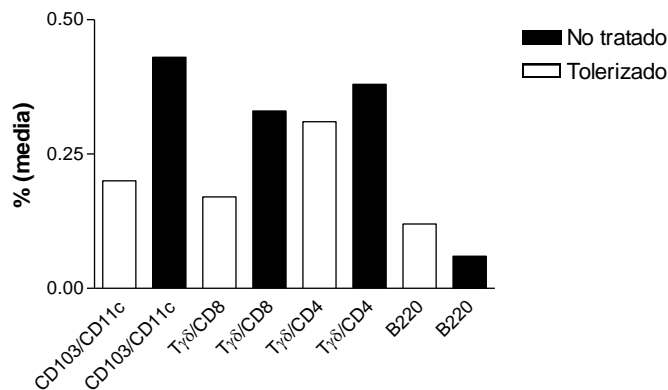


Figura 12: Porcentaje de células del intestino delgado de ratones BALB/C extraídos a 6 de tratamiento con y sin OVA. El extracto se cultivó 24 hs a 37°C y fue centrifugado y los pellets se marcaron con anticuerpos anti-CD11c, anti-CD103, anti-B220, anti-CD4, anti-CD8 y anti-T $\gamma\delta$. Posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo. N= 1

9.2. Ensayos con LTC4

9.2.1. Efecto del LTC4 sobre poblaciones celulares de ganglios mesentéricos

El lipopolisacárido (LPS) es el principal constituyente de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Su uso en inmunología permite la activación y/o maduración de las CD, y es también un potente mitógeno policlonal de las poblaciones linfocitarias. La administración exógena de LPS produce la maduración de las CD, incrementando su función estimuladora y disminuyendo su habilidad de captación de antígenos. Para evaluar el impacto del LTC4 sobre la mucosa intestinal, se obtuvieron las suspensiones celulares a partir de los ganglios mesentéricos provenientes de ratones BALB/C vírgenes, se cultivaron hasta la generación de un cultivo primario y se estimularon con o sin LPS (10 μ M) durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se trataron o no con LTC4 (10⁻⁸ M), 15 min a 37 ° C. Finalmente, las

células se analizaron fenotípicamente por citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 13**, la administración exógena de LTC4 moduló la expresión de linfocitos T. Así el porcentaje de células T CD4⁺ (**Figura 13A**) tiende a disminuir por el agregado del mediador lipídico a células activadas con LPS, por el contrario parece no modificar el porcentaje de las células T CD8⁺ (**Figura 13B**). Por otro lado, la interacción del LTC4 en cultivos activados con LPS, tiene una tendencia a incrementar de manera significativa los porcentajes de dos tipos particulares de CD: las plasmocitoides (CD11c⁺/B220⁺) y las regulatorias (CD11c⁺/CD103⁺) (**figura 13C**). Estos resultados nos permiten inferir que el LTC4 parece cumplir un efecto dual sobre las células activadas con LPS, por un lado inhibe la diferenciación de linfocitos T CD4 inducida por el LPS mientras que aumenta la población de CD plasmocitoides y regulatorias.

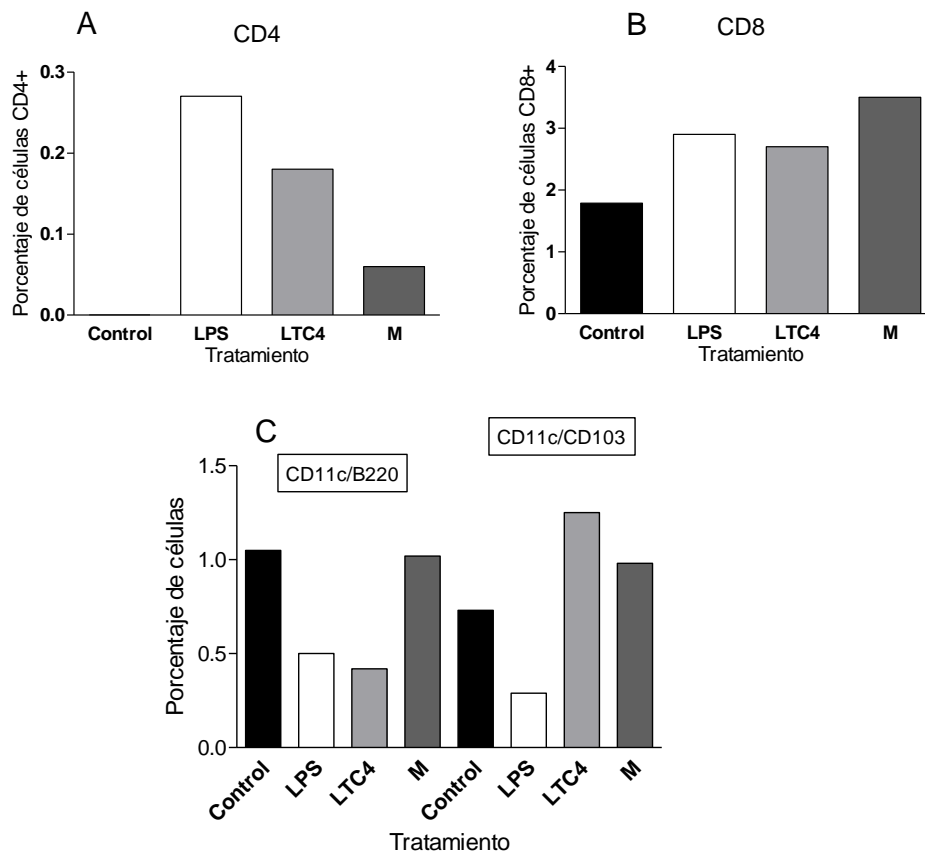


Figura 13: Porcentaje de células en ganglios mesentéricos tratados con LPS y LTC4. Se extrajeron los ganglios de un único ratón tolerizado luego de 6 días del tratamiento con OVA, se generó un cultivo primario de 10^6 células/ml y se dividió en cuatro en una placa de 24 pocillos para realizar los tratamientos. Primero, en dos pocillos se indujo la maduración con LPS ($10 \mu M$) y posteriormente, en uno de ellos y en otro separado, se incubó con LTC4 $10^{-8} M$. Como control no se incubó ni con LPS ni con LTC4. Se puede observar el porcentaje promedio de linfocitos T CD4⁺ (A) y T CD8⁺ (B) y el porcentaje promedio de CD CD11c⁺/B220⁺ y CD11c⁺/CD103⁺ (C).

9.2.2. Efecto del LTC₄ sobre células dendríticas en cocultivo con células epiteliales

El sistema inmunitario juega un rol muy importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, armonizando interacciones entre el propio organismo y la microbiota. Cuando el ambiente cambia, el sistema inmune debe adaptarse a estas fluctuaciones y las CD parecen cumplir un papel crucial en este proceso. El intestino es un órgano compuesto principalmente por células epiteliales (CE), como los queratinocitos, y las CD que atraviesan los conductos intestinales que están en contacto permanente con ellas. Los microbios presentes en el organismo son capaces de controlar la función de las CD directa o indirectamente a través de la interacción con CE. Para simular las condiciones en las que actuaría el LTC₄ *in vivo*, CD inmaduras obtenidas a partir de precursores de médula ósea se estimularon con LPS (10 µM) y posteriormente con LTC₄ (10⁻⁸ M) a 37°C. Luego de 24 horas de tratamiento las CD se pusieron en contacto con una monocapa de una línea celular de queratinocitos (PAM 212) durante 24, 48 y 72 horas. Finalmente se analizaron las distintas poblaciones de células dendríticas por citometría de flujo.

Este cocultivo de CD con células PAM 212 permitió observar la morfología y distribución de las células en la placa de cultivo, donde se puede observar que las células tratadas con LTC₄ y LPS+LTC₄ se asemejan a las células sin tratar, a diferencia de las tratadas solamente con LPS. Esto se puede deber a la interferencia del LTC₄ en la maduración de las CD, manteniéndolas en un estado inmaduro (**Figura 14D**). En la **figura 14A**, se observa que el LTC₄ al actuar sobre CD activadas con LPS no modifica la proporción de CD tolerogénicas (CD11c⁺/CD103⁺), a diferencia del efecto observado sobre el cultivo primario de ganglios mesentéricos (**Figura 13**). Además, aunque incrementa la proporción de CD linfoides (CD11c⁺/CD8α⁺) y plasmocitoides (CD11c⁺/B220⁺) (**figura 14B y 14C**, respectivamente), este aumento no es tan pronunciado como en el ensayo anterior. Por otro lado, la aplicación de LTC₄ a CD inmaduras parece disminuir la expresión de receptores tanto para CD linfoides como para plasmocitoides, mientras que el agregado a CD activadas con LPS parece generar un efecto contrario o agonista de la expresión de receptores (**Figura 15B y 15C**), pero no parece generar cambios importantes para las CD103⁺ (**Figura 15A**).

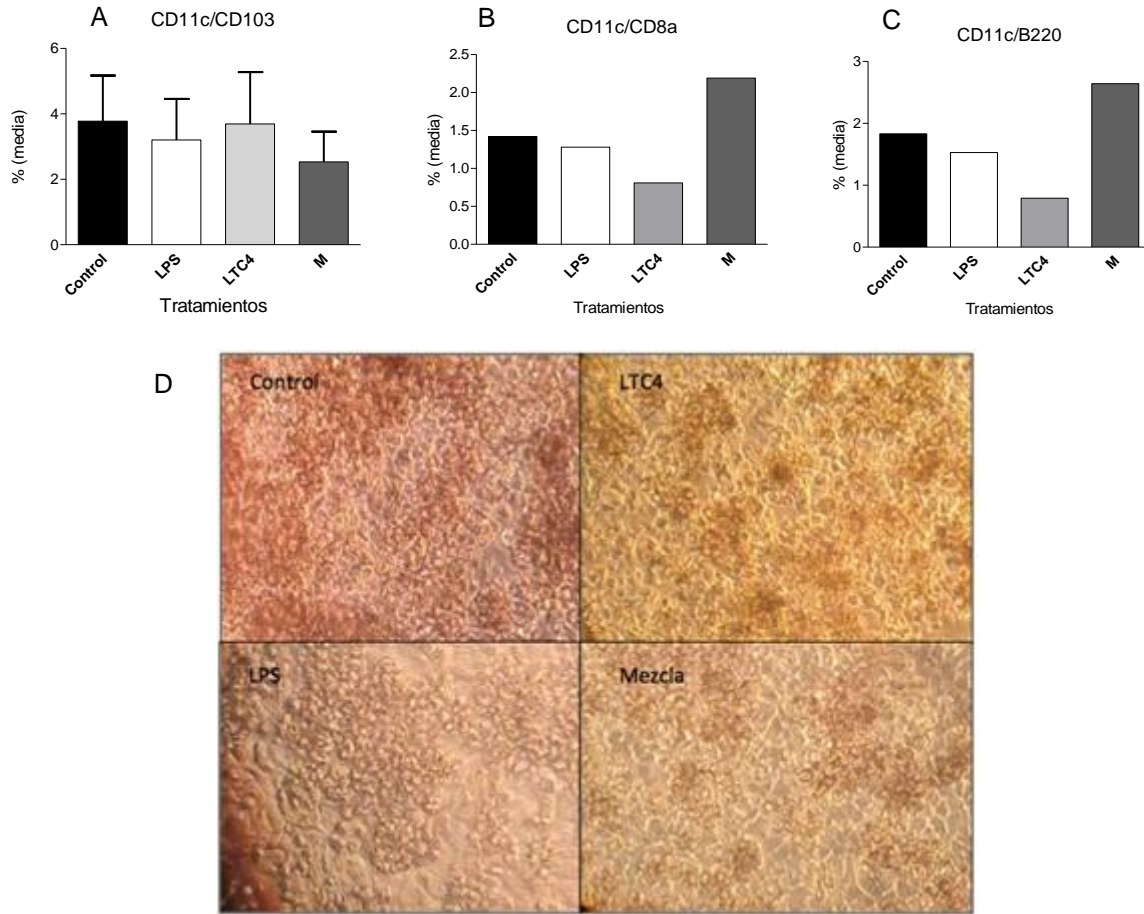


Figura 14: **A, B y C:** Porcentaje de células $CD11c^+/CD8a^+$, células $CD11c^+/CD103^+$ y células $CD11c^+/B220^+$. Células dendríticas inmaduras tratadas con LPS o no (control) y posteriormente con LTC4 (mezcla) o no (LTC4 solo) fueron cocultivadas con células epiteliales PAM 212. $N=1$ ($CD11c/CD8a$ y $CD11c/B220$) y 2 ($CD11c/CD103$). **D:** fotografía de cultivo a 24 hs de CD con células epiteliales PAM 212 tratado con o sin LTC4 y con o sin LPS.

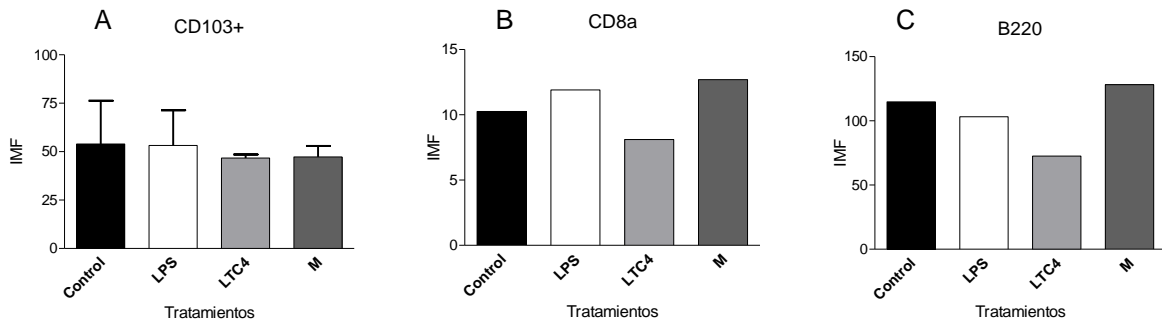


Figura 15: Los resultados se expresan como valores de IMF de células $CD103^+$ (**A**), células $CD8a^+$ (**B**) y células $B220^+$ (**C**). Las CD fueron cocultivadas por 24 hs con CEs y tratadas con LPS y posteriormente con LTC4. $N=2$ ($CD103$) y 1 ($CD8a$ y $B220$)

9.2.3. ELISA: Acción del LTC4 sobre citoquinas inflamatorias e inmunomoduladoras

Atendiendo a que la activación de las CD conlleva un gran número de cambios entre los que se incluyen la producción de citoquinas que permiten la activación de la respuesta efectora T en perfiles particulares de respuesta, decidimos evaluar cómo modula este aspecto el LTC4. Para lo cual, se cuantificaron por la técnica de ELISA los sobrenadantes provenientes del cocultivo entre CD tratadas o no con LTC4 y la línea PAM 212. Como se muestra en la **Figura 16A**, el LTC4 mostró un efecto inhibitor sobre la producción de una de las principales citoquinas inflamatorias; el TNF- α . Además, el LTC4 promovió la secreción de IFN- γ por las CD inmaduras como se observa en la **Figura 16B**, sin embargo, este efecto fue contrarrestado en presencia de CE. De forma tal que podría asumirse que las CD en contacto con LTC4 favorecerían respuestas de etiología inflamatoria, pero llamativamente cuando estas células se enfrentan al epitelio se revierte dicho efecto, indicando que las CE probablemente induzcan señales anti-inflamatorias, que mantendrían la hemostasia normal del tejido.

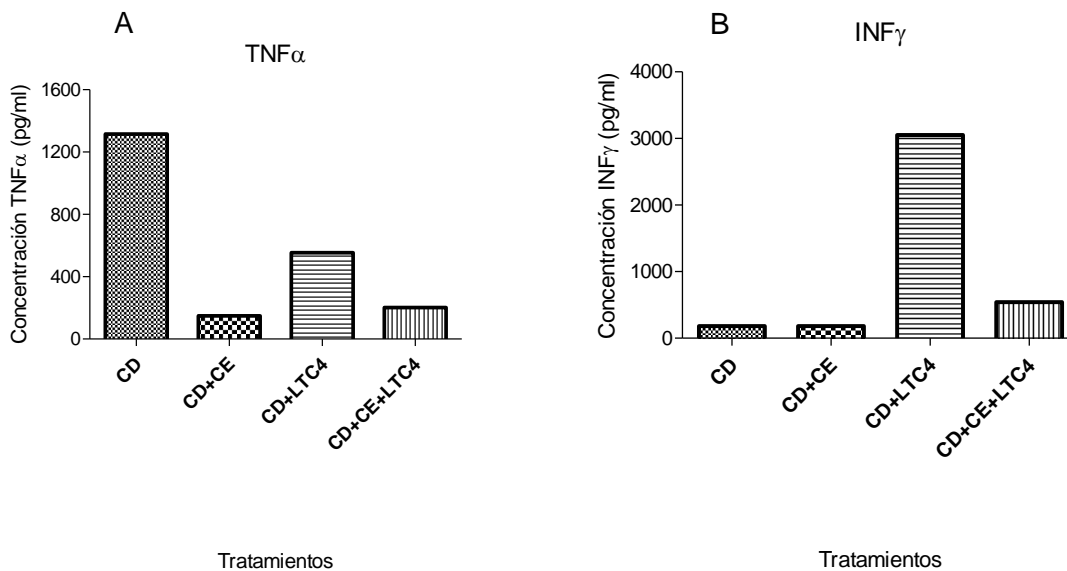


Figura 16: Ensayo ELISA. Células dendríticas inmaduras cocultivadas con células PAM 212 (CD+CE) durante 24 horas fueron tratadas con LTC4 (CD+CE+LTC4) y los sobrenadantes de los distintos tratamientos fueron utilizados para realizar el ensayo ELISA con anticuerpos anti-TNF α (A) e INF- γ (B). Se muestran los resultados de un único ensayo.

9.2.4. Efecto de la aplicación de OVA/LTC4 a muestras de endotelio de intestino delgado

Por otro lado, se decidió evaluar la existencia de células de memoria al antígeno OVA y la probable interferencia del LTC4 en la respuesta efectora. Este punto se estudió en cocultivos entre CD y el epitelio intestinal (ver punto 9.2.2 figura 14). Para lo cual, las CD tratadas o no con LTC4 se pusieron en contacto con muestras de intestino delgado de ratones singenéticos tolerantes o no, las cuales fueron cultivadas o no en presencia del antígeno OVA (10 µg/ml). 48 hs después se analizaron las poblaciones presentes en el cocultivo por citometría de flujo.

Como se muestra en la **Figura 17A y 17B**, se observa una clara diferencia en el reclutamiento de células CD4⁺ y B220⁺ entre tolerizados y no tratados, siendo el primero mayor para los tolerizados y el segundo mayor para los no tratados, posiblemente debido al tiempo de desarrollo de una respuesta adaptativa por parte de los tolerizados. Por otro lado, la administración de OVA muestra una disminución en la expresión de linfocitos T CD4⁺, observándose una mayor cantidad para las muestras provenientes de ratones tolerizados, con una disminución de células B220⁺ en lo ratones tolerizados (**Fig. 18A y 18B**).

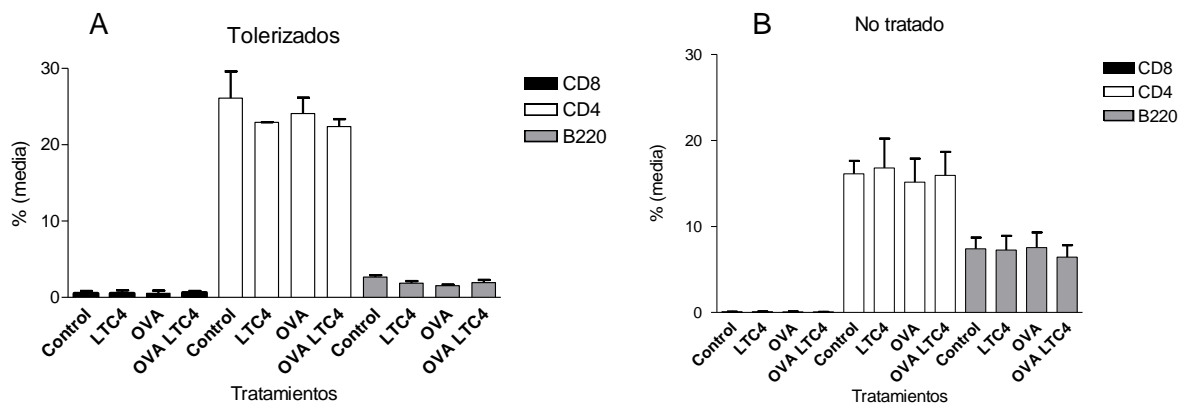


Figura 17: Ensayo a 48 hs de cultivo. Muestras de endotelio de intestino delgado de ratones tolerizados (A) y no tratados (B) con OVA fueron cultivadas durante 48 horas en medio RPMI y luego tratadas con OVA (10 µg/ml) y/o LTC4 (10⁻⁸ M). Los distintos tratamientos fueron analizados por citometría de flujo. Se muestra el porcentaje promedio de células que expresan receptores CD4, CD8 y B220. Los resultados se expresan como media aritmética +/- EE de dos ensayos N=2.

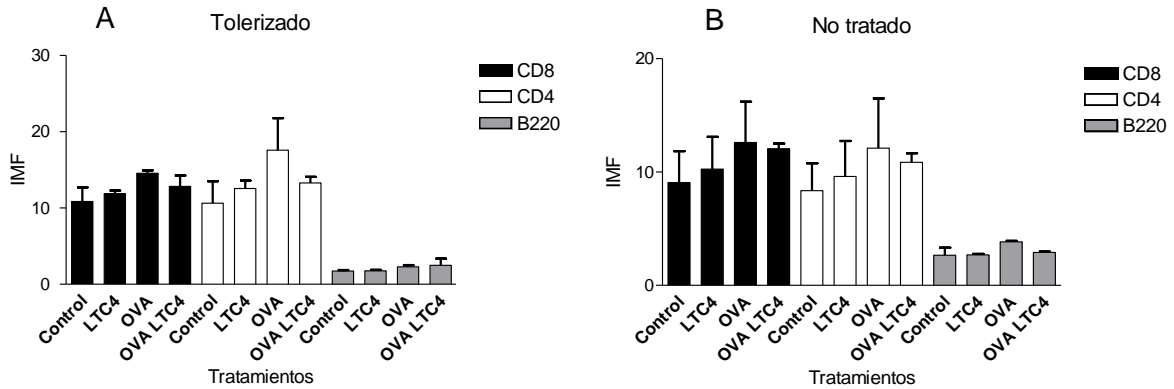


Figura 18: Los resultados se expresan como valores de IMF de células CD8⁺, células CD4⁺ y B220⁺ de dos ensayos diferentes. Las muestras de endotelio de intestino de ratones tolerizados (A) y no tolerizados (B) fueron cultivadas durante 24 horas y tratadas con OVA y/o LTC4. N=2.

Para las células CD103⁺/CD11c⁺ se observa un menor porcentaje de expresión en las muestras de ratones tolerizadas, mientras que para ambos tipos de muestras se observa un mayor porcentaje para las células tratadas con OVA (**Figura 19**). Las CD CD103⁺/CD11c⁺ de ratones tolerizados presentan una mayor expresión, mientras que en los no tolerizados se observa un gran aumento en la expresión del CD11c al administrar OVA (**Figura 20A y 20B**).

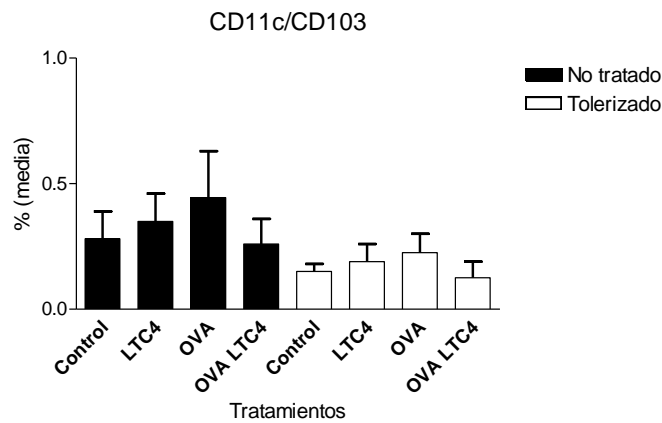


Figura 19: Muestras de endotelio de intestino delgado fueron tratadas con OVA y/o LTC4 y analizadas por citometría de flujo. El gráfico representa el porcentaje promedio de células que expresan receptores CD103⁺/CD11c⁺ en muestras de ratones tolerizados y no tolerizados. Los resultados se expresan como la media aritmética ± EE de dos ensayos independientes N=2.

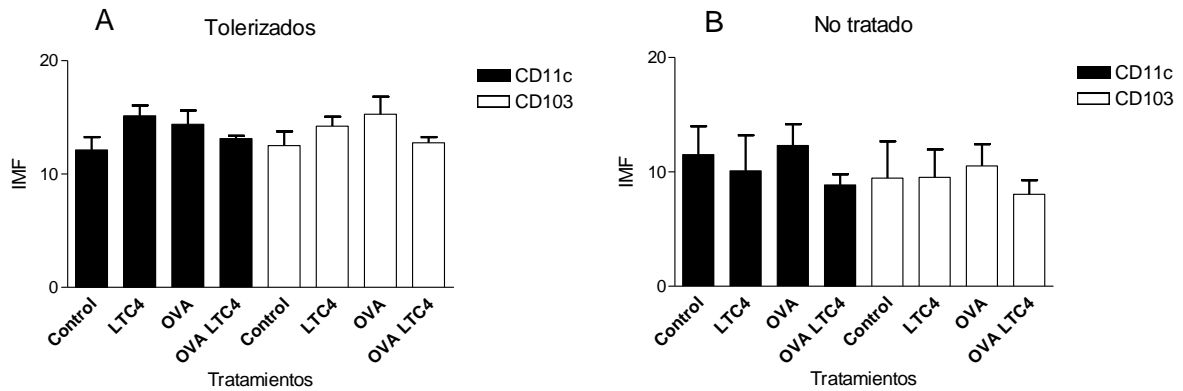


Figura 20: Las muestras de endotelio de intestino de ratones tolerizados (A) y no tratados (B) fueron cultivadas durante 24 horas y tratadas con OVA y LTC4. Los resultados se expresan como la media aritmética de dos experimentos +/- EE de valores de IMF de células CD11c⁺ y células CD103⁺ N=2.

Estas poblaciones fueron evaluadas también a tiempos largos. Como se observa en la **Figura 21 y 22**, para ver un efecto prolongado se realizó un ensayo con un cultivo a 6 días de tratamiento. Se realizaron dos marcaciones anti CD11c/CD103 (FitC/Per) y anti T $\gamma\delta$ (FitC) y se midió por citometría. Para las marcaciones anti CD11c/CD103 se observa una estabilización en el porcentaje celular para las muestras de ratones tolerizados, mientras que para los no tratados se observa un mayor porcentaje celular para el control (**Figura 21A**). En cuanto al nivel de expresión, la exposición a la OVA parece disminuir la diferencia en la expresión entre las muestras tolerizadas y no tratadas tanto para las células CD11c y CD103 (**Figura 22A y 22B**)

Por otro lado para las marcaciones anti T $\gamma\delta$ no se observan grandes diferencias para el porcentaje celular (**Figura 21B**), pero se ve una importante diferencia en el nivel de expresión de estos linfocitos entre tolerizados y no tratados observando el mayor pico en la mezcla de OVA+LTC4, lo que remarca la estimulación que genera el LTC4 en la proliferación de linfocitos T, en este caso los T $\gamma\delta$, abundantes en la mucosa del intestino (**Figura 22C**).

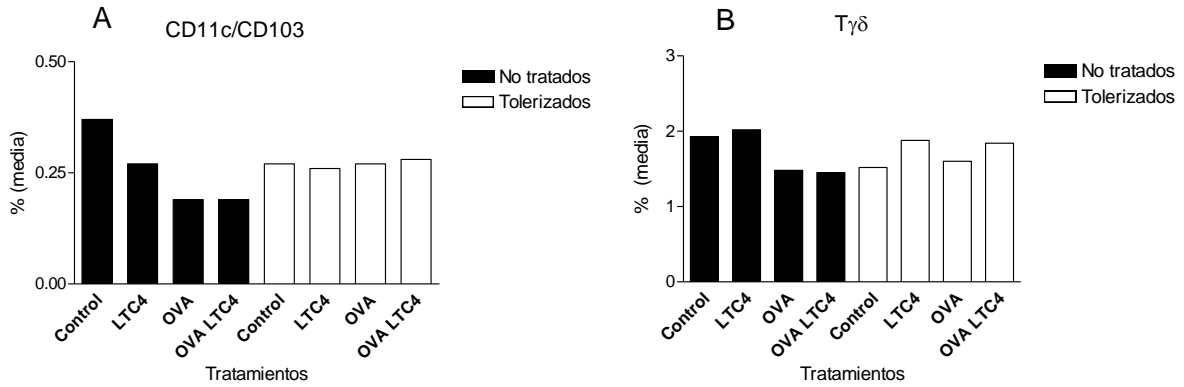


Figura 21: Ensayo a 6 días de cultivo: Muestras de epitelio intestinal de ratones tolerizados y no tratados con OVA fueron cultivadas durante 6 días y tratadas o no con OVA y LTC4. Las muestras se analizaron por citometría de flujo con anticuerpos anti-CD11c, anti-CD103 y anti-Tγδ. El gráfico representa la media porcentual de células CD11c⁺/CD103⁺ (A) y Tγδ⁺ (B).

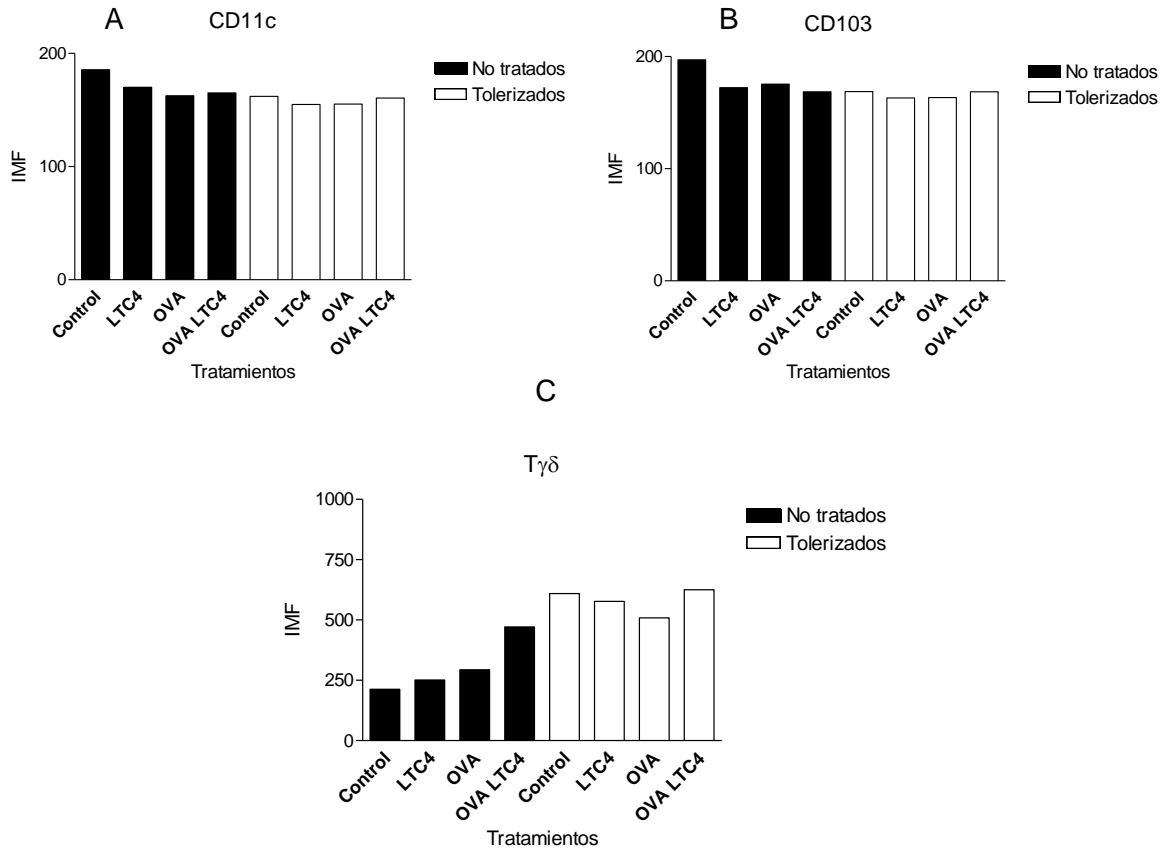


Figura 22: Los resultados se expresan como valores de IMF de células CD11c⁺ (A), células C103⁺ (B) y Tγδ⁺ (C) de un único ensayo. Las muestras de endotelio de intestino de ratones tolerizados y no tolerizados fueron cultivadas durante 6 días y tratadas con OVA y LTC4.

Si bien en ninguno de los ensayos se observaron grandes diferencias en el reclutamiento celular entre los ratones tolerizados y no tolerizados, sí se observa la tendencia del LTC4 a generar un efecto antagonista a la OVA, principalmente sobre LT y CD

tolerogénicas. Parecería ser que el LTC4 afecta la respuesta efectora tanto en ratones tolerizados como en ratones controles, aunque la etiología de este mecanismo todavía no es clara.

9.2.5. El cocultivo en monocapa epitelial de intestino de ratón mostró un gran efecto en la expresión de células dendríticas tolerogénicas

Teniendo en cuenta que demostramos que las CD estimuladas con LTC4 modificaban su respuesta de citoquinas hacia un perfil anti-inflamatorio en presencia de las células del epitelio intestinal, decidimos evaluar si esto era consecuencia de la inducción de un perfil de CD regulatorias o tolerogénicas (CD11c⁺/CD103⁺). Para analizar este punto, se cocultivaron muestras de intestino de ratón con CD inmaduras obtenidas de precursores de médula ósea de ratones BALB/C. Se generó un cultivo de monocapa epitelial a partir del intestino delgado de ratones tolerizados y no tolerizados con OVA. La monocapa así generada se enfrentó con CD estimuladas con o sin LPS (10 µM) y tratadas o no con LTC4 (10⁻⁸ µM). A diferencia de lo visto en la **Figura 19** se observó una fuerte disminución en el porcentaje de CD CD11c⁺/CD103⁺ en las muestras provenientes de ratones tolerizados, sólo cuando la monocapa fue incubada por CD activadas con LPS, LTC4 o su combinación (**Figura 23 A**). El mismo efecto se encontró al analizar las medias de expresión por célula (IMF) (**Figura 23 B y C**). Estos resultados nos llevan a concluir que el efecto anti-inflamatorio observado al interactuar las CD-LTC4 con el epitelio no fue dependiente de la adquisición de un fenotipo regulatorio por las CD, quizás el mismo dependa de la inducción de citoquinas anti-inflamatorias como el TGF-β y/o IL-10.

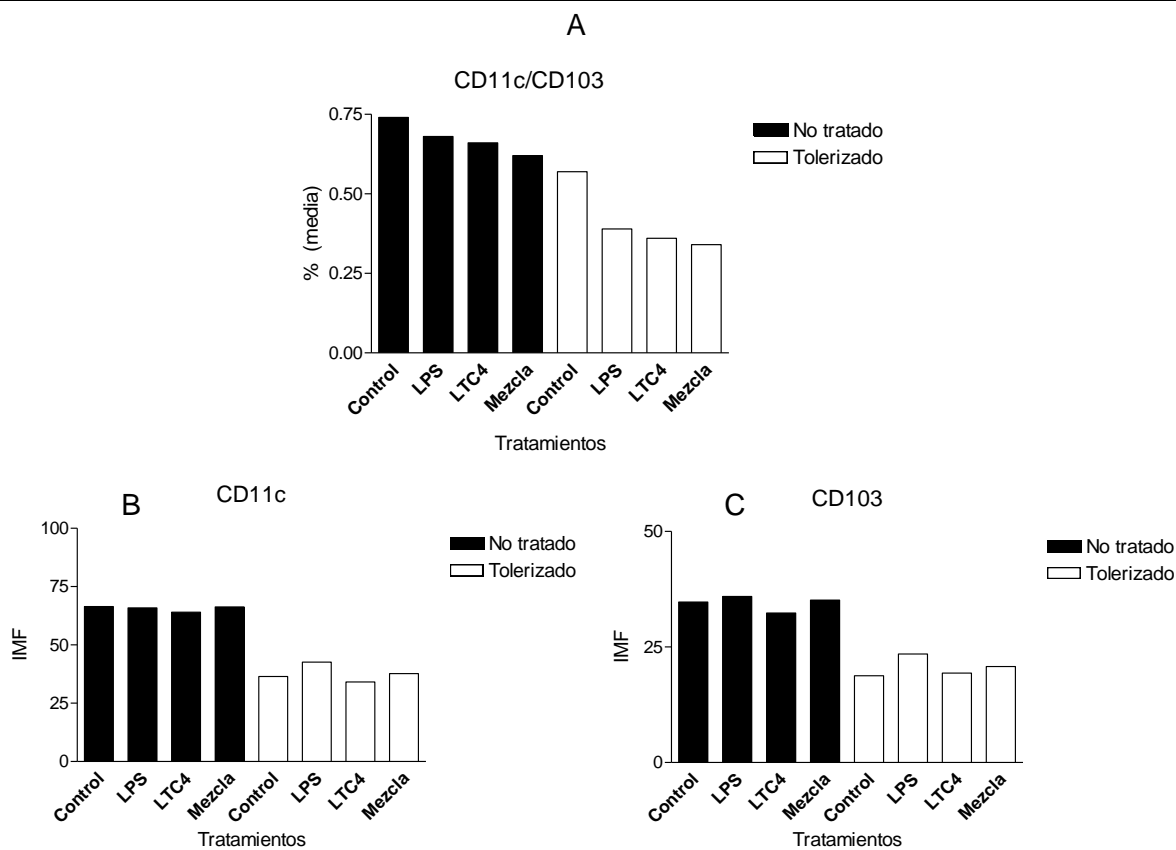


Figura 23: Muestras de intestino delgado de ratones tolerizados y no tratados con OVA fueron cocultivadas con CD inmaduras de médula ósea en cultivo de monocapa epitelial de ratón por 24 Hs y tratadas con LPS y LTC4. Se muestra el porcentaje promedio de células CD11c+/CD103+ (A) y la intensidad media de fluorescencia (IMF) de los receptores CD11c y CD103 (B y C, respectivamente) de un único ensayo.

10. Discusión de resultados

En el presente proyecto se estudió el efecto del LTC₄, potente regulador de la respuesta inflamatoria, sobre poblaciones celulares de la mucosa intestinal. Los estudios se realizaron utilizando un modelo de ratones BALB/c tolerantes a la OVA mediante su ingestión por vía oral. Para poder así, estudiar las consecuencias de la ruptura de la tolerancia sobre la mucosa intestinal por el LTC₄ y cómo esto puede determinar el desarrollo de respuestas inflamatorias. Para lo cual, evaluamos su efecto sobre la diferenciación de una subpoblación especial de este tipo de células: las CD tolerogénicas presentes en el intestino delgado, que cumplen un rol destacado en la inducción de tolerancia a antígenos solubles.

Para poder llegar a conclusiones relevantes del mecanismo *in vivo* de tolerancia oral y el efecto del LTC₄ en el microambiente intestinal se realizaron distintas pruebas *in vitro* para simular las condiciones reales. Para ello, se tomaron muestras de intestino y GM de ratones BALB/c tolerizados y no tratados y se realizaron ensayos de cocultivo con CE (tanto líneas celulares como cultivo en monocapa de extracto intestinal), los cuales se trataron con mezclas de LPS, LTC₄ y OVA para posteriormente medir las células por citometría de flujo y las citoquinas producidas por el método ELISA.

Los resultados confirman que la tolerancia oral es sistémica y que efectivamente en los ratones tolerizados hay un mayor reclutamiento de linfocitos T helper y CD tolerogénicas y plasmocitoides, así como una disminución de los T CD8 en comparación con los controles. Esto concuerda con el estado de tolerancia inducido por la OVA, y la activación de perfiles celulares que puedan mantener la homeostasis interna del intestino.

Pero el núcleo de este trabajo se basó en el LTC₄ y su rol en la modulación de la regulación inmunitaria en el intestino a través de las CD y los LT. Estudios previos realizados sobre CD extraídas de médula ósea concluyeron que el LTC₄ inhibe la maduración de las mismas (Alvarez, *et al.*, 2011) pero en nuestro trabajo se estudiaron poblaciones celulares de tejidos intestinales y la acción del LTC₄ parece no ser aún concluyente. Nuestros resultados sugieren que el LTC₄ puede modificar las poblaciones celulares de los GM, disminuyendo la expresión de LT CD4 y CDs. Sin embargo, estos efectos conducentes a la cronificación de los procesos inflamatorios se ven suprimidos o disminuidos cuando el LTC₄ actúa sobre células que han sido puestas en contacto con epitelio intestinal.

Desde hace ya mucho tiempo se sabe que el epitelio responde a cambios en el ambiente mediante la secreción de citoquinas (*Stadnyk, 1994*). Las CE son capaces de secretar IL-6, IL-1, TGF- β , TNF- α y muchas otras variedades de citoquinas de acuerdo al estímulo que reciben. Además también pueden liberar quimiocinas para monocitos y linfocitos que se cree son importantes durante enfermedades infecciosas (*Stadnyk, 2002*). Con estos antecedentes y observando los resultados de este trabajo, podemos inferir que las CE cumplen un rol clave en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, liberando factores que tienden a conducir a estados de tolerancia, contrarrestando el efecto inflamatorio del LTC₄.

Como se esperaba, este mediador lipídico tiene la capacidad de modificar fenotípicamente a las CD y linfocitos T que participan en el mecanismo de tolerancia oral. Sin embargo, sorpresivamente se descubrió que ese efecto no es tan marcado si las células se cocultivaban con epitelio, y aunque esta respuesta no se debe a la expresión de CD tolerogénicas, se puede suponer que el epitelio intestinal probablemente estaría liberando citoquinas con actividad anti-inflamatoria que modificarían la funcionalidad de todas las células presentes en mucosa intestinal.

11. Conclusiones

A lo largo de este trabajo pudimos demostrar en poblaciones de intestino y GM de ratones tolerizados con OVA y comparados con ratones normales los siguientes puntos sobresalientes:

- Los ratones tolerizados mostraron un incremento de las poblaciones de CD plasmacitoides (CD11c⁺/B200⁺) y linfocitos TCD4⁺ en los GM.
- Se incrementó la población de linfocitos T γ δ en el intestino delgado de ratones tolerizados, así como la de linfocitos B, sin grandes modificaciones de los subtipos de CD.
- Por otra parte, la adición de LTC4 per se no parece tener un efecto pronunciado sobre los GM pero sí provoca un incremento de las CD plasmocitoides (CD11c⁺/B220⁺) y regulatorias (CD11c⁺/CD103⁺) cuando actúa junto a otro agonista inflamatorio como el LPS. Asimismo, ambos provocan una inhibición o disminución de la proporción de linfocitos CD4⁺.
- Cuando analizamos el tipo de citoquinas generadas por el LTC4 al interactuar con CD tratadas se encontraron en sobrenadantes de cultivo TNF- α e IFN- γ , sin embargo este efecto se vio contrarrestado en presencia de una monocapa de epitelio.
- Finalmente, encontramos que en cocultivos provenientes de ratones tolerizados con CD activadas, con LTC4 se inhibió la diferenciación hacia un perfil tolerogénico o regulatorio de CD como lo demuestra la inhibición de la población CD103⁺/CD11c⁺.

En conjunto, estos resultados indican que la administración en la dieta de un antígeno no provoca efectos similares a lo largo de toda la mucosa; sino efectos distintos como los observados en los sitios efectores (GM) y en los sitios inductivos del intestino delgado. Asimismo, si bien el LTC4 parece interferir con algunos aspectos fenotípicos de la mucosa y aún inducir, al actuar sobre CD, la liberación de citoquinas de etiología inflamatoria, la presencia de células del epitelio despliega mecanismos de compensación que mantienen la homeostasis del tejido.

Las conclusiones de los resultados, aunque no han confirmado totalmente nuestra hipótesis, son de gran utilidad para continuar con la comprensión de los mecanismos involucrados en la inducción de tolerancia oral a proteínas de la comida. El estudio del efecto de una molécula pro-inflamatoria, como el LTC4, sobre las poblaciones celulares de la mucosa intestinal nos permite elaborar nuevas teorías sobre las posibles vías mediante las cuales se generan las enfermedades inflamatorias del tracto intestinal e incluso suponer nuevas terapias

para otras enfermedades autoinmunes que involucren la participación de CD tolerogénicas y LT regulatorios para alterar el curso de la respuesta inflamatoria. A sabiendas de que las CD especializadas de la mucosa intestinal pueden dirigir a los linfocitos a respuestas sistémicas y llevar la tolerancia a todo el organismo, la tolerancia oral ha sido utilizada para prevenir y/o tratar ratones inducidos con una variedad de desórdenes autoinmunes, por lo que la vía oral podría ser utilizada como una terapia alternativa para tratar pacientes con enfermedades inmunitarias como la artritis, la encefalomiелitis o la diabetes. Si bien este tipo de terapia es altamente atractiva por su presunta baja toxicidad, facilidad de administración y mecanismo de acción antígeno-específico, su éxito depende de encontrar un antígeno target y las dosis óptimas de administración y de desarrollar marcadores que permitan medir su efecto.

Por otro lado, varios estudios han demostrado que el LTC₄ administrado en una sola dosis a ratones en los que se indujo previamente un modelo de tolerancia oral, mostraban un incremento del reclutamiento de leucocitos inflamatorios como los eosinófilos y mastocitos. Además, ha sido ampliamente documentado que los CysLT son quimioattractantes de los eosinófilos y que aumentan su sobrevivencia (*Bandeira-Melo and Weller, 2003*). Estas respuestas inflamatorias asociadas a un excesivo incremento de eosinófilos afectan principalmente a las mucosas intestinales y gástricas (*Pawar, et al., 2008*) y el LTC₄ muestra un gran impacto en el epitelio intestinal, que se manifiesta como un acortamiento de las microvellosidades y disminución en las proporciones de linfocitos T CD8 $\gamma\delta^+$. Estas células están asociadas con el mantenimiento de la integridad de ese epitelio, lo que sugiere fuertemente que la alteración de esta mucosa podría ser percibida como un signo de “daño” por las CD induciendo su migración a los sitios inductores de la mucosa para activar así la subsecuente respuesta efectora. Nuestros resultados también demuestran que en extracto de epitelio intestinal el LTC₄ puede modificar el reclutamiento de linfocitos T $\gamma\delta$ y CD CD11c⁺/CD103⁺. Esto confirma el ya estudiado impacto del LTC₄ sobre la homeostasis de la mucosa intestinal. Sin embargo, el estudio de la interacción entre las CE, las CD y los LT en el microambiente intestinal y los posibles mediadores intercelulares, como el LTC₄, que afectan la homeostasis, debe expandirse aún más para llegar a comprender los mecanismos subyacentes de las diversas enfermedades autoinmunes que afectan la mucosa y aplicar estos conocimientos para desarrollar tratamientos a enfermedades humanas del tracto intestinal que todavía permanecen latentes.

12. Anexos

Anexo 1: Técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Esta es una técnica de inmunoensayo que se utiliza para detectar antígenos presentes en cualquier tipo de fluido. La técnica radica en la inmovilización del antígeno debido a la insolubilidad generada por la adsorción en una fase sólida, como por ejemplo una superficie de poliestireno. La detección se realiza mediante un anticuerpo específico al antígeno, ligado a una proteína capaz de generar un producto detectable, como un cambio en la longitud de onda absorbida por la muestra.

Existen varias variantes de este ensayo: en el ELISA directo, las placas se preparan recubriendo los pocillos con la muestra, luego se incuba con el anticuerpo marcado y se revela por quimioluminiscencia u fluorescencia. En el ELISA indirecto, la técnica es la misma, solo que se utilizan dos anticuerpos, uno primario y otro secundario, que se une específicamente al anterior lo que permite la amplificación de la señal y una mayor sensibilidad. El tercer tipo de ELISA es el tipo sándwich, en el cual los pocillos se recubren primero con anticuerpos específicos para el antígeno a evaluar y luego se coloca la muestra; por último se utiliza otro anticuerpo específico contra el antígeno, que se pegará a él formando un “sándwich”.

Anexo 2: adyuvante de Freund

Los adyuvantes son sustancias que cuando se mezclan con un antígeno y se inyectan con él, mejoran la inmunogenicidad de ese antígeno. La inmunogenicidad es la capacidad de una sustancia de generar una respuesta inmune ya sea humoral o celular.

El adyuvante de Freund es uno de los más utilizados en el área de investigación. Se usa como una emulsión de agua en aceite y es diseñado para proveer la continua liberación del antígeno necesaria para estimular una fuerte y persistente respuesta inmune.

13. Bibliografía

AGRAWAL, Sudhanshu, GUPTA, Sudhir and AGRAWAL, Anshu. Human dendritic cells activated via dectin-1 are efficient at priming th17, cytotoxic cd8 t and b cell responses. *PLoS one*. 2010, vol. **5**, p.

AKIRA, S., TAKEDA, K. and KAISHO, T. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology*. 2001, vol. **2**, p. 675-680.

ALVAREZ, Carolina, AMARAL, María, LANGELLOTTI, Cecilia and VERMEULEN, Mónica. Leukotriene c(4) prevents the complete maturation of murine dendritic cells and modifies interleukin-12/interleukin-23 balance. *Immunology*. 2011, vol. **134**, p. 185-197.

AMARAL, Maria, ALVAREZ, Carolina, LANGELLOTTI, Cecilia, JANCIC, Carolina, SALAMONE, Gabriela, GEFFNER, Jorge and VERMEULEN, Mónica. Thioperamide induces cd4 cd25 foxp3 regulatory t lymphocytes in the lung mucosa of allergic mice through its action on dendritic cells. *Journal of asthma and allergy*. 2011, vol. **4**, p. 93-102.

AMARAL, Maria, DAVIO, Carlos, CEBALLOS, Ana, SALAMONE, Gabriela, CAÑONES, Cristian, GEFFNER, Jorge and VERMEULEN, Mónica. Histamine improves antigen uptake and cross-presentation by dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2007, vol. **179**, p. 3425-3433.

ARDAVÍN, Carlos. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nature reviews. Immunology*. 2003, vol. **3**, p. 582-590.

BANDEIRA-MELO, Christianne and WELLER, Peter. Eosinophils and cysteinyl leukotrienes. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 2003, vol. **69**, p. 135-143.

BERGEROT, I., ARREAZA, G., CAMERON, M., BURDICK, M., STRIETER, R., CHENSUE, S., CHAKRABARTI, S. and DELOVITCH, T. Insulin b-chain reactive cd4+ regulatory t-cells induced by oral insulin treatment protect from type 1 diabetes by blocking the cytokine secretion and pancreatic infiltration of diabetogenic effector t-cells. *Diabetes*. 1999, vol. **48**, p. 1720-1729.

BLUMBERG, R., SAUBERMANN, L. and STROBER, W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Current opinion in immunology*. 1999, vol. **11**, p. 648-656.

BOYTON, Rosemary and ALTMANN, Daniel. Is selection for tcr affinity a factor in cytokine polarization? *Trends in immunology*. 2002, vol. **23**, p. 526-529.

BYRUM, R., GOULET, J., SNOUWAERT, J., GRIFFITHS, R. and KOLLER, B. Determination of the contribution of cysteinyl leukotrienes and leukotriene b4 in acute inflammatory responses using 5-lipoxygenase- and leukotriene a4 hydrolase-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1999, vol. **163**, p. 6810-6819.

CATALANO, Alfonso, RODILOSSI, Sabrina, CAPRARI, Paola, COPPOLA, Vincenzo and PROCOPIO, Antonio. 5-lipoxygenase regulates senescence-like growth arrest by promoting ros-dependent p53 activation. *The EMBO journal*. 2005, vol. **24**, p. 170-179.

COOMBES, Janine, SIDDIQUI, Karima R., ARANCIBIA-CÁRCAMO, Carolina, HALL, Jason, SUN, Cheng-Ming, BELKAID, Yasmine and POWRIE, Fiona. A functionally specialized population of mucosal cd103+ dcs induces foxp3+ regulatory t cells via a tgf-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine*. 2007, vol. **204**, p. 1757-1764.

CURTSINGER, J., SCHMIDT, C., MONDINO, A., LINS, D., KEDL, R., JENKINS, M. and MESCHER, M. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive cd4+ and cd8+ t cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1999, vol. **162**, p. 3256-3262.

CHAILLOUS, L., LEFÈVRE, H., THIVOLET, C., BOITARD, C., LAHLOU, N., ATLAN-GEPNER, C., BOUHANICK, B., MOGENET, A., NICOLINO, M., CAREL, J., LECOMTE, P., MARÉCHAUD, R., BOUGNÈRES, P., CHARBONNEL, B. and SAÏ, P. Oral insulin administration and residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes: A multicentre randomised controlled trial. Diabète insuline orale group. *Lancet*. 2000, vol. **356**, p. 545-549.

CHEN, Yaping, CHOU, Kevin, FUCHS, Elaine, HAVRAN, Wendy and BOISMENU, Richard. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta t cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002, vol. **99**, p. 14338-14343.

CHO, Sang-Heon. Pharmacogenomic approaches to asthma treatment. *Allergy, asthma & immunology research*. 2010, vol. **2**, p. 177-182.

DANESE, Silvio, SANS, Miquel and FIOCCHI, Claudio. Inflammatory bowel disease: The role of environmental factors. *Autoimmunity reviews*. 2004, vol. **3**, p. 394-400.

DANNULL, J., SCHNEIDER, T., LEE, W. T., DE ROSA, N., TYLER, D. S. and PRUITT, S. K. Leukotriene c4 induces migration of human monocyte-derived dendritic cells without loss of immunostimulatory function. *Blood*. 2012, vol. **119**, p. 3113-3122.

DEL RIO, Maria-Luisa, BERNHARDT, Günter, RODRIGUEZ-BARBOSA, Jose-Ignacio and FÖRSTER, Reinhold. Development and functional specialization of cd103+ dendritic cells. *Immunological reviews*. 2010, vol. **234**, p. 268-281.

DEL RIO, Maria-Luisa, RODRIGUEZ-BARBOSA, Jose-Ignacio, KREMMER, Elisabeth and FÖRSTER, Reinhold. Cd103- and cd103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to cd4+ and cd8+ t cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2007, vol. **178**, p. 6861-6866.

ERGUN-LONGMIRE, Berrin, MARKER, John, ZEIDLER, Adina, RAPAPORT, Robert, RASKIN, Philip, BODE, Bruce, SCHATZ, Desmond, VARGAS, Alfonso, ROGERS, Douglas, SCHWARTZ, Sherwyn, MALONE, John, KRISCHER, Jeffrey and MACLAREN, Noel. Oral insulin therapy to prevent progression of immune-mediated (type 1) diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004, vol. **1029**, p. 260-277.

FARIA, Ana, GOMES-SANTOS, Ana, GONÇALVES, Juliana, MOREIRA, Thais, MEDEIROS, Samara, DOURADO, Luana and CARA, Denise. Food components and the immune system: From tonic agents to allergens. *Frontiers in immunology*. 2013, vol. **4**, p. 102.

FARIA, Ana, MARON, Ruth, FICKER, Sabine, SLAVIN, Anthony, SPAHN, Thomas and WEINER, Howard. Oral tolerance induced by continuous feeding: Enhanced up-regulation of transforming growth factor-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of autoimmunity*. 2003, vol. **20**, p. 135-145.

FARIA, Ana and WEINER, Howard. Oral tolerance. *Immunological reviews*. 2005, vol. **206**, p. 232-259.

FARIA, Ana and WEINER, Howard. Oral tolerance: Therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clinical & developmental immunology*. 2006, vol. **13**, p. 143-157.

FEUERSTEIN, G. Leukotrienes and the cardiovascular system. *Prostaglandins*. 1984, vol. **27**, p. 781-802.

GARDINE, C., GENTILE, F., PELLEGRINI, C., GIALLAURIA, F., TORELLI, G., KOUKI, T. and DEGROOT, L. Multiple fragments of human tg are capable of inducing oral tolerance to whole human tg. *Journal of endocrinological investigation*. 2003, vol. **26**, p. 294-300.

GATTI, Evelina and PIERRE, Philippe. Understanding the cell biology of antigen presentation: The dendritic cell contribution. *Current opinion in cell biology*. 2003, vol. **15**, p. 468-473.

GEISSMANN, Frederic. The origin of dendritic cells. *Nature immunology*. 2007, vol. **8**, p. 558-560.

GOULET, J., SNOUWAERT, J., LATOUR, A., COFFMAN, T. and KOLLER, B. Altered inflammatory responses in leukotriene-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994, vol. **91**, p. 12852-12856.

GUERMONPREZ, Pierre, VALLADEAU, Jenny, ZITVOGEL, Laurence, THÉRY, Clotilde and AMIGORENA, Sebastian. Antigen presentation and t cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology*. 2002, vol. **20**, p. 621-667.

HADIS, Usriansyah, WAHL, Benjamin, SCHULZ, Olga, HARDTKE-WOLENSKI, Matthias, SCHIPPERS, Angela, WAGNER, Norbert, MÜLLER, Werner, SPARWASSER, Tim, FÖRSTER, Reinhold and PABST, Oliver. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of foxp3+ regulatory t cells in the lamina propria. *Immunity*. 2011, vol. **34**, p. 237-246.

HAMADA, Satoru, UMEMURA, Masayuki, SHIONO, Takeru, TANAKA, Kensho, YAHAGI, Ayano, BEGUM, M., OSHIRO, Kiyotetsu, OKAMOTO, Yuko, WATANABE, Hisami, KAWAKAMI, Kazuyoshi, ROARK, Christina, BORN, Willi, O'BRIEN, Rebecca, IKUTA, Koichi, ISHIKAWA, Hiromichi, NAKAE, Susumu, IWAKURA, Yoichiro, OHTA, Takao and MATSUZAKI, Goro. Il-17a produced by gammadelta t cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection in the liver. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2008, vol. **181**, p. 3456-3463.

HELGADOTTIR, Anna, MANOLESCU, Andrei, THORLEIFSSON, Gudmar, GRETARSDOTTIR, Solveig, JONSDOTTIR, Helga, THORSTEINSDOTTIR, Unnur, SAMANI, Nilesh, GUDMUNDSSON, Gudmundur, GRANT, Struan, THORGEIRSSON, Gudmundur, SVEINBJORNSDOTTIR, Sigurlaug, VALDIMARSSON, Einar, MATTHIASON, Stefan, JOHANNSSON, Halldor, GUDMUNDSDOTTIR, Olof, GURNEY, Mark, SAINZ, Jesus, THORHALLSDOTTIR, Margret, ANDRESDOTTIR, Margret, FRIGGE, Michael, TOPOL, Eric, KONG, Augustine, GUDNASON, Vilmundur, HAKONARSON, Hakon, GULCHER, Jeffrey and STEFANSSON, Kari. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nature genetics*. 2004, vol. **36**, p. 233-239.

HIROTA, Keiji, TURNER, Jan-Eric, VILLA, Matteo, DUARTE, João H, DEMENGEOT, Jocelyne, STEINMETZ, Oliver M and STOCKINGER, Brigitta. Plasticity of th17 cells in peyer's patches is responsible for the induction of t cell-dependent iga responses. *Nature immunology*. 2013, vol. **14**, p. 372-379.

ILIEV, I., MILETI, E., MATTEOLI, G., CHIEPPA, M. and RESCIGNO, M. Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory t-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal immunology*. 2009, vol. **2**, p. 340-350.

ILIEV, Iliyan, MATTEOLI, Gianluca and RESCIGNO, Maria. The yin and yang of intestinal epithelial cells in controlling dendritic cell function. *The Journal of experimental medicine*. 2007, vol. **204**, p. 2253-2257.

INABA, K., INABA, M., ROMANI, N., AYA, H., DEGUCHI, M., IKEHARA, S., MURAMATSU, S. and STEINMAN, R. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow

cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine*. 1992, vol. **176**, p. 1693-1702.

IVANOV, Ivaylo, ZHOU, Liang and LITTMAN, Dan. Transcriptional regulation of th17 cell differentiation. *Seminars in Immunology*. 2007, vol. **19**, p. 409-417.

JAENSSON, Elin, URONEN-HANSSON, Heli, PABST, Oliver, EKSTEEN, Bertus, TIAN, Jiong, COOMBES, Janine, BERG, Pia-Lena, DAVIDSSON, Thomas, POWRIE, Fiona, JOHANSSON-LINDBOM, Bengt and AGACE, William. Small intestinal cd103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *The Journal of experimental medicine*. 2008, vol. **205**, p. 2139-2149.

JANEWAY, Charles A., TRAVERS, Paul, WALPORT, Mark and SHLOMCHIK, Mark J. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. (2005).

JOHANSSON-LINDBOM, Bengt, SVENSSON, Marcus, PABST, Oliver, PALMQVIST, Caroline, MARQUEZ, Gabriel, FÖRSTER, Reinhold and AGACE, William. Functional specialization of gut cd103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective t cell homing. *The Journal of experimental medicine*. 2005, vol. **202**, p. 1063-1073.

JONULEIT, H., KÜHN, U., MÜLLER, G., STEINBRINK, K., PARAGNIK, L., SCHMITT, E., KNOP, J. and ENK, A. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *European journal of immunology*. 1997, vol. **27**, p. 3135-3142.

JOZEFOWSKI, Szczepan, BIEDROŃ, Rafał, BOBEK, Malgorzata and MARCINKIEWICZ, Janusz. Leukotrienes modulate cytokine release from dendritic cells. *Immunology*. 2005, vol. **116**, p. 418-428.

JU, Ji-Hyeon, CHO, Mi-La, JHUN, Joo-Youn, PARK, Min-Jung, OH, Hye-Joa, MIN, So-Youn, CHO, Young-Gyu, HWANG, Seu-Yun, KWOK, Seung-Ki, SEO, Soo-Hong, YOON, Chong-Hyeon, PARK, Sung-Hwan and KIM, Ho-Youn. Oral administration of type-ii collagen suppresses il-17-associated rankl expression of cd4+ t cells in collagen-induced arthritis. *Immunology letters*. 2008, vol. **117**, p. 16-25.

KAWANO, Tetsuya, MATSUSE, Hiroto, TSUCHIDA, Tomoko, FUKAHORI, Susumu, FUKUSHIMA, Chizu, NISHINO, Tomoya and KOHNO, Shigeru. Cysteinyl leukotriene receptor antagonist regulates allergic airway inflammation in an organ- and cytokine-specific manner. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2014, vol. **20**, p. 297-302.

KEIR, Mary and SHARPE, Arlene. The b7/cd28 costimulatory family in autoimmunity. *Immunological Reviews*. 2005, vol. **204**, p. 128-143.

KILSHAW, Peter J. and HIGGINS, Jonathan M. G. Integrin $\alpha\beta7$: Molecular features and functional significance in the immune system. *I Domains in Integrins. Austin Texas: Landes Bioscience*. 2003, vol., p. 95-116.

KINDT, Thomas J., GOLDSBY, Richard A. and OSBORNE, Barbara A. *Inmunología de kuby*.(2007).

KRAUS, Thomas, TOY, Lisa, CHAN, Lisa, CHILDS, Joseph and MAYER, Lloyd. Failure to induce oral tolerance to a soluble protein in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2004, vol. **126**, p. 1771-1778.

LEE, S., SCHERBERG, N. and DEGROOT, L. Induction of oral tolerance in human autoimmune thyroid disease. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 1998, vol. **8**, p. 229-234.

LEFER, A. Thromboxane a2 and leukotrienes are eicosanoid mediators of shock and ischemic disorders. *Progress in clinical and biological research*. 1988, vol. **264**, p. 101-114.

LETTIS, L. Leukotrienes: Role in cardiovascular physiology. *Cardiovascular clinics*. 1987, vol. **18**, p. 101-113.

MACHIDA, I., MATSUSE, H., KONDO, Y., KAWANO, T., SAEKI, S., TOMARI, S., OBASE, Y., FUKUSHIMA, C. and KOHNO, S. Cysteinyl leukotrienes regulate dendritic cell functions in a murine model of asthma. *J Immunol*. 2004, vol. **172**, p. 1833-1838.

MARON, Ruth, SLAVIN, Anthony, HOFFMANN, Ethan, KOMAGATA, Yoshinori and WEINER, Howard. Oral tolerance to copolymer 1 in myelin basic protein (mbp) tcr transgenic mice: Cross-reactivity with mbp-specific tcr and differential induction of anti-inflammatory cytokines. *International immunology*. 2002, vol. **14**, p. 131-138.

MARTIN, Bruno, HIROTA, Keiji, CUA, Daniel, STOCKINGER, Brigitta and VELDHOEN, Marc. Interleukin-17-producing gammadelta t cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity*. 2009, vol. **31**, p. 321-330.

MERESSE, B., RIPOCHE, J., HEYMAN, M. and CERF-BENSUSSAN, N. Celiac disease: From oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Mucosal immunology*. 2009, vol. **2**, p. 8-23.

MOLODECKY, Natalie, SOON, Ing, RABI, Doreen, GHALI, William, FERRIS, Mollie, CHERNOFF, Greg, BENCHIMOL, Eric, PANACCIONE, Remo, GHOSH, Subrata, BARKEMA, Herman and KAPLAN, Gilaad. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012, vol. **142**, p. 46.

MONETINI, L., CAVALLO, M., SARUGERI, E., SENTINELLI, F., STEFANINI, L., BOSI, E., THORPE, R., POZZILLI, P. and IMMUNOTHERAPY DIABETES, group. Cytokine profile and insulin antibody igg subclasses in patients with recent onset type 1 diabetes treated with oral insulin. *Diabetologia*. 2004, vol. **47**, p. 1795-1802.

NAKAYAMA, Masafumi, TAKEDA, Kazuyoshi, KAWANO, Mitsuko, TAKAI, Toshiyuki, ISHII, Naoto and OGASAWARA, Kouetsu. Natural killer (nk)-dendritic cell interactions generate mhc class ii-dressed nk cells that regulate cd4+ t cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011, vol. **108**, p. 18360-18365.

NISS, Jan, BRAND, Stephan, GU, Xiubin, LANDSMAN, Limor, JUNG, Steffen, MCCORMICK, Beth, VYAS, Jatin, BOES, Marianne, PLOEGH, Hidde, FOX, James, LITTMAN, Dan and REINECKER, Hans-Christian. Cx3cr1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science (New York, N.Y.)*. 2005, vol. **307**, p. 254-258.

NURIEVA, Roza, CHUNG, Yeonseok, HWANG, Daehee, YANG, Xuexian, KANG, Hong, MA, Li, WANG, Yi-hong, WATOWICH, Stephanie, JETTEN, Anton, TIAN, Qiang and DONG, Chen. Generation of t follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of t helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity*. 2008, vol. **29**, p. 138-149.

PABST, Oliver and MOWAT, Allan Oral tolerance to food protein. *Mucosal immunology*. 2012, vol. **5**, p. 232-239.

PAWAR, Parag, JADHAV, Sameer, EGGLETON, Charles and KONSTANTOPOULOS, Konstantinos. Roles of cell and microvillus deformation and receptor-ligand binding kinetics in cell rolling. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2008, vol. **295**, p. 50.

RHODES, Katherine, ANDREW, Elizabeth, NEWTON, Darren, TRAMONTI, Daniela and CARDING, Simon. A subset of il-10-producing gammadelta t cells protect the liver from listeria-elicited, cd8(+) t cell-mediated injury. *European journal of immunology*. 2008, vol. **38**, p. 2274-2283.

RIMOLDI, Monica, CHIEPPA, Marcello, SALUCCI, Valentina, AVOGADRI, Francesca, SONZOGNI, Angelica, SAMPIETRO, Gianluca, NESPOLI, Angelo, VIALE, Giuseppe, ALLAVENA, Paola and RESCIGNO, Maria. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nature immunology*. 2005, vol. **6**, p. 507-514.

ROBBIANI, D., FINCH, R., JÄGER, D., MULLER, W., SARTORELLI, A. and RANDOLPH, G. The leukotriene c(4) transporter mrp1 regulates ccl19 (mip-3beta, etc)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell*. 2000, vol. **103**, p. 757-768.

ROMANO, Mario and CLARIA, Joan. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: Implications for cancer therapy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003, vol. **17**, p. 1986-1995.

SCHULZ, Olga, JAENSSON, Elin, PERSSON, Emma, LIU, Xiaosun, WORBS, Tim, AGACE, William and PABST, Oliver. Intestinal cd103+, but not cx3cr1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *The Journal of experimental medicine*. 2009, vol. **206**, p. 3101-3114.

SERBINA, Natalya, SALAZAR-MATHER, Thais, BIRON, Christine, KUZIEL, William and PAMER, Eric. Tnf/inos-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*. 2003, vol. **19**, p. 59-70.

SHERIDAN, Brian and LEFRANÇOIS, Leo. Intraepithelial lymphocytes: To serve and protect. *Current gastroenterology reports*. 2010, vol. **12**, p. 513-521.

SPENCER, John, ISAACSON, Peter, MACDONALD, Tinisha, THOMAS, Abraham and WALKER-SMITH, John. Gamma/delta t cells and the diagnosis of coeliac disease. *Clinical and experimental immunology*. 1991, vol. **85**, p. 109-113.

STADNYK, Andrew. Cytokine production by epithelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1994, vol. **8**, p. 1041-1047.

STADNYK, Andrew. Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*. 2002, vol. **16**, p. 241-246.

STAINES, N., HARPER, N., WARD, F., MALMSTRÖM, V., HOLMDAHL, R. and BANSAL, S. Mucosal tolerance and suppression of collagen-induced arthritis (cia) induced by nasal inhalation of synthetic peptide 184-198 of bovine type ii collagen (cii) expressing a dominant t cell epitope. *Clinical and experimental immunology*. 1996, vol. **103**, p. 368-375.

STEINHILBER, Dieter, FISCHER, Astrid, METZNER, Julia, STEINBRINK, Svenja, ROOS, Jessica, RUTHARDT, Martin and MAIER, Thorsten. 5-lipoxygenase: Underappreciated role of a pro-inflammatory enzyme in tumorigenesis. *Frontiers in pharmacology*. 2010, vol. **1**, p. 143.

SUTTON, Caroline, LALOR, Stephen, SWEENEY, Cheryl, BRERETON, Corinna, LAVELLE, Ed and MILLS, Kingston. Interleukin-1 and il-23 induce innate il-17 production from gammadelta t cells, amplifying th17 responses and autoimmunity. *Immunity*. 2009, vol. **31**, p. 331-341.

SWIATCZAK, Bartłomiej and RESCIGNO, Maria. How the interplay between antigen presenting cells and microbiota tunes host immune responses in the gut. *Seminars in immunology*. 2012, vol. **24**, p. 43-49.

THIVIERGE, Maryse, STANKOVA, Jana and ROLA-PLESZCZYNSKI, Marek. Cysteinyl-leukotriene receptor type 1 expression and function is down-regulated during monocyte-derived dendritic cell maturation with zymosan: Involvement of il-10 and prostaglandins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2009, vol. **183**, p. 6778-6787.

THOMÉ, Rodolfo, FERNANDES, Luis, MINEIRO, Marcela, SIMIONI, Patricia, JOAZEIRO, Paulo and TAMASHIRO, Wirla. Oral tolerance and ova-induced tolerogenic dendritic cells reduce the severity of collagen/ovalbumin-induced arthritis in mice. *Cellular immunology*. 2012, vol. **280**, p. 113-123.

VAN FURTH, R. and COHN, Z. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1968, vol. **128**, p. 415-435.

VAROL, Chen, LANDSMAN, Limor, FOGG, Darin, GREENSHTEIN, Liat, GILDOR, Boaz, MARGALIT, Raanan, KALCHENKO, Vyacheslav, GEISSMANN, Frederic and JUNG, Steffen. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2007, vol. **204**, p. 171-180.

VOGELZANG, Alexis, MCGUIRE, Helen, YU, Di, SPRENT, Jonathan, MACKAY, Charles and KING, Cecile. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of t follicular helper cells. *Immunity*. 2008, vol. **29**, p. 127-137.

VREMEC, David, O'KEEFFE, Meredith, HOCHREIN, Hubertus, FUCHSBERGER, Martina, CAMINSCHI, Irina, LAHOUD, Mireille and SHORTMAN, Ken. Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells. *Blood*. 2007, vol. **109**, p. 1165-1173.

WEINER, Howard, DA CUNHA, Andre, QUINTANA, Francisco and WU, Henry. Oral tolerance. *Immunological reviews*. 2011, vol. **241**, p. 241-259.

WHITACRE, C., GIENAPP, I., MEYER, A., COX, K. and JAVED, N. Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1996, vol. **778**, p. 217-227.

YAMAZAKI, Sayuri and MORITA, Akimichi. Dendritic cells in the periphery control antigen-specific natural and induced regulatory t cells. *Frontiers in immunology*. 2013, vol. **4**, p. 151.

ZEUTHEN, Louise, FINK, Lisbeth and FROKIAER, Hanne. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology*. 2008, vol. **123**, p. 197-208.

ZHOU, Liang, CHONG, Mark and LITTMAN, Dan. Plasticity of cd4+ t cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009, vol. **30**, p. 646-655.