



FACULTAD DE BIOLOGÍA

GRADO EN BIOLOGÍA

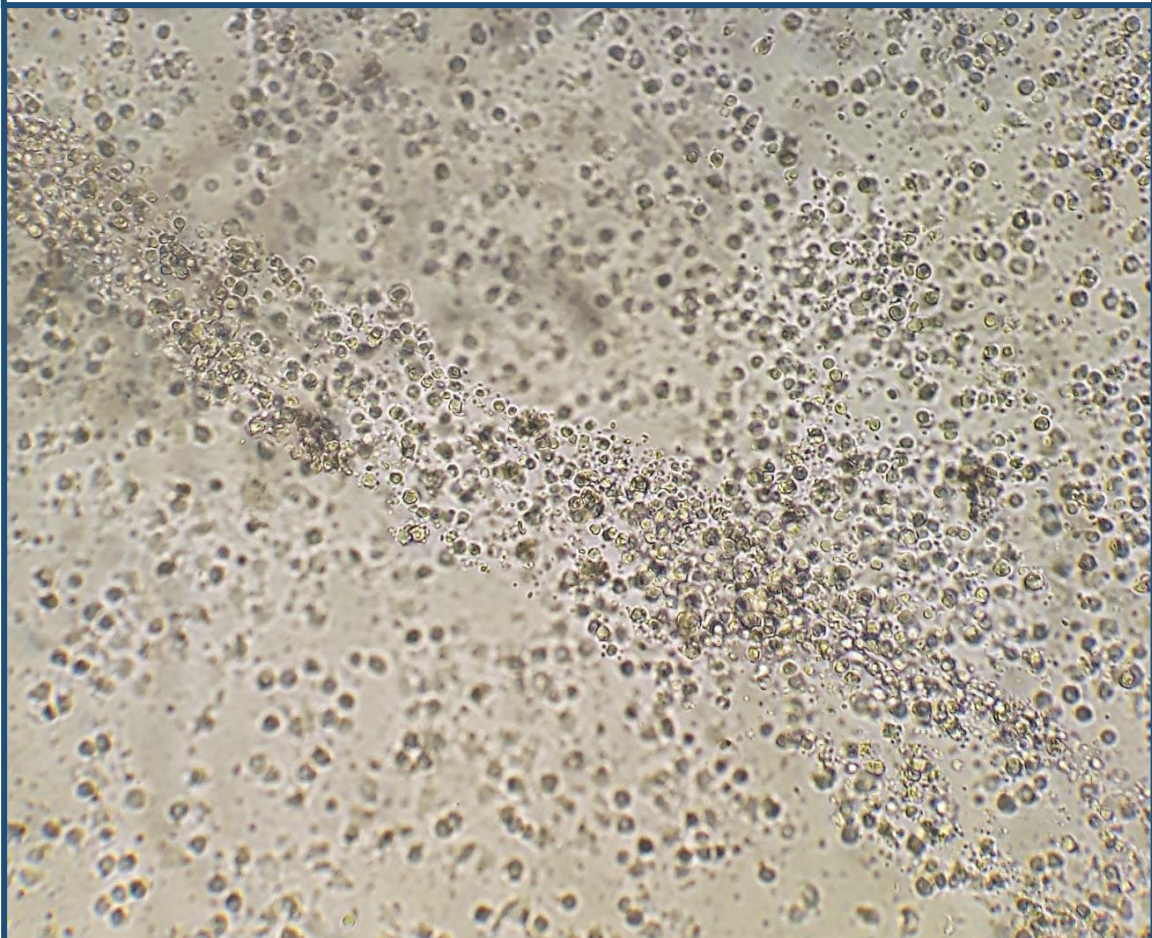
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

**INFLUENCIA DE LA ADENOSINA Y DE LOS
RECEPTORES DE ADENOSINA EN LA
DIFERENCIACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE
MONOCITOS**

ADRIANA SAS BARBEITO

2016-2017

Trabajo fin de Grado



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. MATERIAL Y MÉTODOS	4
3.1. Muestras biológicas	4
3.2. Material y reactivos.....	4
3.3. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica: gradiente de Ficoll®	5
3.4. Purificación de monocitos por doble gradiente	6
3.5. Purificación de monocitos por adherencia.....	7
3.6 Cultivo de los monocitos <i>in vitro</i>	7
3.7 Marcaje directo por inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo	8
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
5. CONCLUSIONES	16

ABREVIATURAS:

A	Ados	<i>Axencia de doazón de órganos e sangue</i>	Agencia de donación de órganos y sangre
	APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>	Células presentadoras de antígenos
B	BC	<i>Buffy Coat</i>	Concentrado leucocitario
	BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	Albúmina de suero bovino
C	CD14	<i>Cluster of Differentiation 14</i>	Cúmulo de diferenciación 14
	CD86	<i>Cluster of Differentiation 86</i>	Cúmulo de diferenciación 86
D	DCs	<i>Dendritic Cells</i>	Células dendríticas
	DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>	Dimetilsulfóxido
F	FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>	Suero bovino fetal
	FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>	Isotiocinato de fluoresceína
	FSC	<i>Forward Scatter</i>	Dispersión frontal
G	Gm	<i>Geometric mean</i>	Media geométrica
	GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
I	iDC's	<i>Immature Dendritic Cells</i>	Células dendríticas inmaduras
	IL-4	<i>Interleukin-4</i>	Interleucina-4
L	LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>	Lipopolisacáridos
M	MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>	Intensidad media de fluorescencia
	MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>	Complejo mayor de histocompatibilidad
	moDCs	<i>Monocyte-derived Dendritic cells</i>	Células dendríticas derivadas de monocitos
N	NECA	<i>5'-(N- ethylcarboxiamido)adenosine</i>	5'-(N- Etilcarboxiamido)adenosina
P	PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>	Patrones moleculares asociados con patógenos.
	PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>	Células mononucleares de sangre periférica
	PE	<i>Phycoerythrin</i>	Ficoeritrina
	PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>	Receptores de reconocimiento de patrones
R	RBCs	<i>Red Blood Cells</i>	Células rojas de la sangre
	RT	<i>Room Temperature</i>	Temperatura ambiente
S	SSC	<i>Side Scatter</i>	Dispersión lateral
T	TB	<i>Trypan Blue</i>	Azul de Tripán
	TCR	<i>T Cell Receptor</i>	Receptor de célula T

RESUMEN

La adenosina (Ado) es una molécula endógena moduladora de la respuesta inflamatoria. Este nucleósido se encuentra a bajas concentraciones en condiciones normales, pero condiciones como la hipoxia, necrosis, estrés metabólico y daño tisular (ej., cáncer u otras enfermedades) incrementan su síntesis y liberación. Ado interfiere en la activación de los macrófagos y en la diferenciación de monocitos a través de cuatro receptores asociados a proteínas G: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃. El objetivo de este trabajo fue comprobar la acción que ejerce la adenosina sobre la diferenciación de monocitos a células dendríticas (DCs, *Dendritic Cells*) así como describir la acción de sus receptores A_{2A} y A_{2B} en dicho proceso. Para lograrlo, se cultivaron poblaciones de monocitos obtenidos a partir de concentrados leucocitarios (BC, *Buffy Coats*) de donantes sanos en presencia de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) e interleucina-4 (IL-4, *Interleukin-4*), un análogo no selectivo y más potente de adenosina, la 5'-(N-Etilcarboxiamido)adenosina (NECA, *5'-(N- ethylcarboxiamido) adenosine*) y dos antagonistas de sus receptores: CV69 (A_{2A}R antagonista) y SYAF030 (A_{2B}R antagonista). Los resultados obtenidos indican que la adenosina interfiere en la diferenciación de los monocitos hacia DCs inflamatorias dando lugar a una población de células con características intermedias entre ambos tipos celulares. Sin embargo, no se ha logrado discernir el receptor de adenosina involucrado entre los dos candidatos más probables: A_{2A}R y A_{2B}R.

1. INTRODUCCIÓN

La respuesta inmunitaria constituye el conjunto de acciones que desempeña el sistema inmunitario frente a una infección, mediante mecanismos innatos o adaptativos. La inmunidad adaptativa se caracteriza por su especificidad y está mediada por los linfocitos B (respuesta humoral) y T (respuesta celular). Existen dos tipos de linfocitos T atendiendo a su receptor de antígenos (TCR), linfocitos T $\alpha\beta$ y T $\gamma\delta$; dentro de los primeros podemos distinguir entre linfocitos T citolíticos o CD8⁺ y linfocitos T colaboradores, *helper* o CD4⁺ (Regueiro *et al.*, 2010). Estos últimos, se dividen en linfocitos T efectores (Th1, Th2, Th17, etc.) y linfocitos T reguladores (*Treg*). En cambio, la inmunidad innata se caracteriza por su rapidez e inespecificidad y en ella confluyen un amplio conjunto de tipos celulares con una herramienta común que les permite reconocer a los microorganismos: los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, *Pattern*

Recognition Receptors). Estos receptores reconocen patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP, *Pathogen Associated Molecular Pattern*) como los lipopolisacáridos (LPS, *Lipopolysaccharide*) de la superficie de ciertas bacterias (Fainboim & Geffner, 2011). Este tipo de inmunidad está mediada por el complemento, los interferones, los linfocitos NK y los fagocitos; estos últimos son los agentes celulares innatos del sistema inmunitario y los principales son granulocitos, neutrófilos, macrófagos y las DCs (Regueiro *et al.*, 2010).

Las DCs son un conjunto de células que actúan como vínculo entre la inmunidad innata y adaptativa gracias a la presencia de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) de clase II en su superficie, que las convierten en células presentadoras de antígenos (APC, *Antigen Presenting Cells*) profesionales (Male *et al.*, 2013). Existen dos poblaciones de DCs, las migratorias y las residentes (Segura *et al.*, 2012). Algunas DCs proceden de precursores como los monocitos, que se encuentran en circulación y se dirigen hacia los tejidos donde residen como células dendríticas inmaduras (iDCs, *immature Dendritic Cells*) dedicadas a la captura y procesamiento de antígenos (Ag) gracias a su capacidad endocítica y fagocítica (Wilkin *et al.*, 2001). Bajo la influencia de una variedad de señales de peligro, las DCs entran en un proceso de diferenciación (maduración) y migran hacia los órganos linfoides secundarios (La Sala *et al.*, 2001), donde se convierten en APC profesionales adquiriendo la capacidad de activar a las células T vírgenes, desencadenando así la respuesta inmunitaria adaptativa y orientando su curso gracias a la liberación de diferentes familias de citocinas que inducen la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ en diferentes perfiles. Son células que se caracterizan por expresar elevados niveles de moléculas de MHC y moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, pero son deficientes en moléculas propias de otros linajes como CD14, un marcador de monocitos y macrófagos (Fainboim & Geffner, 2011). La sangre periférica humana tiene un pequeño número de DCs, pero los monocitos circulantes pueden ser una importante fuente de precursores (Giordano *et al.*, 2003) ya que en un contexto inflamatorio, se diferencian a poblaciones discretas de DCs. Esta vía de desarrollo puede ser reproducida *in vitro* mediante el uso de GM-CSF e IL-4, dando lugar a la expresión de marcadores característicos de DCs y eliminando aquellos de monocitos y macrófagos (Challier *et al.*, 2012).

Pese a que las reacciones inflamatorias e inmunológicas protegen de las invasiones de microorganismos, también pueden desencadenar daño tisular; es por ello que el organismo genera distintos mecanismos con el fin de limitar este daño. La adenosina, un nucleósido de purina, es una molécula endógena que posee un papel central en la regulación de la respuesta inmune y en la limitación de la destrucción tisular. Aunque está constitutivamente presente en el espacio extracelular en bajas concentraciones, el estrés metabólico incrementa notablemente sus niveles (Haskó & Cronstein, 2004). Este incremento extracelular de Ado puede tener lugar mediante dos mecanismos no excluyentes: la generación intracelular y la generación extracelular. En el primer caso, cuando se alcanzan elevadas concentraciones de adenosina en la célula, esta se libera a espacio extracelular a través de transportadores especializados. En el segundo, se liberan precursores de nucleótidos de adenina como el ATP que son catalizados gracias a ectonucleotidasas (Haskó *et al.*, 2009). Ado es reconocida por cuatro tipos de receptores (ARs), pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃. A través de ellos, se encarga de potenciar la respuesta inflamatoria cuando se encuentra a bajas concentraciones, mientras que actúa con funciones antiinflamatorias en aquellos tejidos o células dañadas donde se ha incrementado su síntesis y las concentraciones son elevadas. Estos efectos antagónicos de Ado se explican, entre diversas causas, por la expresión diferencial de ARs en los tejidos, las diferentes afinidades de los mismos por Ado y las diferentes rutas de trasducción de señales. Así por ejemplo, A₁R y A_{2A}R son ARs de alta afinidad, mientras que A_{2B}R y A₃R lo son de baja. Igualmente, algunos ARs como A₁ o A₃ son capaces de reducir los niveles de cAMP, mientras que otros como A_{2A} o A_{2B} elevan su concentración intracelular (Haskó & Cronstein., 2004). Así en relación a la activación de macrófagos, Ado regula negativamente vía A_{2A} (mayoritariamente) la activación de la vía clásica/proinflamatoria activada por PAMPs, lo que lleva a un descenso de la producción de TNF α y otras citocinas; al mismo tiempo favorece una activación alternativa, desencadenada por IL-4, en la que participa mayormente el receptor A_{2B} (Haskó & Pacher, 2012).

En este trabajo, se van a comprobar los efectos de la adenosina, mediante el uso de un agonista inespecífico de sus receptores, la NECA, así como comprobar si los receptores A_{2A} y/o A_{2B} están implicados en dichos efectos.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es determinar si existe un efecto antiinflamatorio o proinflamatorio de Ado sobre el proceso de diferenciación de monocitos de sangre periférica humana en DCs y si dichos efectos están mediados por sus dos principales ARs: A_{2A}R y A_{2B}R.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestras biológicas

Las muestras biológicas a partir de las cuales se realizó la obtención de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) y posterior purificación de monocitos, consistieron en concentrados leucocitarios de donantes sanos, facilitados por la *Axencia de doazón de órganos e sangue* (Ados, Agencia de donación de órganos y sangre). Las extracciones de sangre de las que procedieron los BCs fueron tomadas 1-2 días antes de la realización de cada experimento y dichos concentrados fueron conservados a temperatura ambiente (RT, *Room Temperature*) hasta el día de su uso.

3.2. Material y reactivos

Como material de plástico se emplearon tubos de centrifuga de 15 mL (Labcon Superclear[®] centrifuge tubes, Labcon, California, USA) y tubos cónicos de polipropileno de 50 mL (Corning, Falcon[®], Nueva York, USA), placas de cultivo de 24 pocillos de fondo plano de poliestireno (BD Falcon[®] Multiwell[™] 24 well, BD, España) y tubos de citometría de poliestireno de 5 mL con fondo redondo (Corning, Falcon[®], Nueva York, USA). El contaje celular se realizó en cámara de Neubauer (Blau Brand, Alemania), con ayuda de un microscopio invertido (Wilovert[®]) y de un contador celular (Milky Way[®] Counter, Taiwan).

De la casa comercial Sigma-Aldrich[®], España se han obtenido los siguientes reactivos: RPMI-1640, NECA, Histopaque[®]-1077, Percoll[®], antibiótico (Penicilina + Estreptomina) y albúmina de suero bovino (BSA, *Bovine Serum Albumin*). Este último, junto con Azida sódica (E. Merck) fueron empleados para la elaboración del tampón PBS-BSA 0.05% (p/v) Azida sódica. Los compuestos Cloruro sódico (NaCl), Cloruro potásico (KCl), Fosfato disódico dodecahidratado (Na₂HPO₄ x 12 H₂O), Fosfato monopotásico

(KH₂PO₄) y Bicarbonato sódico (empleado para suplementar el RPMI-1640) fueron suministrados por la casa comercial Panreac Química S.A., España.

Para la diferenciación de monocitos a células dendríticas se emplearon las citocinas GM-CSF e IL-4 (PreproTech, Londres, Reino Unido) y para el marcaje se emplearon los anticuerpos *Fitc Mouse Anti-Human CD86* y *Fitc Mouse Anti-Human CD14*; así como el isotipo *Fitc Mouse IgG1k Isotype Control* (Pharmigen™, BD Biosciences, España).

Para la realización de los experimentos se emplearon los siguientes aparatos: Citómetro de Flujo (BD FACSort™, BD, España), centrífuga con rotor basculante GH-3.8 (Beckman GS-6R Centrifuge, Marshall Scientific, USA), campana de flujo laminar (Telstar BioSTAR^{Plus}, Telstar, España) y una estufa de CO₂ con atmósfera húmeda (Heraeus, Alemania).

Todo el material no estéril como recipientes de vidrio o puntas de micropipetas, fue esterilizado en autoclave (Autoester-G). Como método de esterilización del RPMI-1640 se empleó una unidad de filtrado (Millipore® Stericup™ filter units, 0.22 µm).

3.3. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica: gradiente de Ficoll®

La purificación de las PBMCs se realizó a partir de un BC, mediante el uso de gradientes de densidad de Ficoll®. Este procedimiento se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar para mantener la esterilidad. Así mismo, el material de plástico, los reactivos y las diferentes soluciones empleadas fueron también estériles. Se realizó una dilución 1:4 del BC en medio RPMI-1640. Sobre 10 mL de Ficoll® (añadidos previamente a dos tubos de 15 mL) fueron depositados cuidadosamente 20 mL de la dilución anterior, evitando la mezcla entre ambos líquidos. Se centrifugó a 400 xg, 20 min, sin freno (RT). Tras la centrifugación se obtuvieron cuatro regiones: la región superior formada por el plasma y las plaquetas, la banda constituida por las PBMCs, el Ficoll® y el *pellet* o precipitado, constituido por las células rojas de la sangre (RBCs, *Red Blood Cells*). Se extrajo la banda formada por las PBMCs con ayuda de una pipeta *pasteur* estéril y se resuspendió en 15 mL de RPMI-1640. A continuación, se centrifugó a 350 xg, 7 min, con freno (RT). Las PBMCs fueron lavadas en un volumen de 10 mL de RPMI-1640, repitiendo las condiciones de centrifugación del paso anterior. Posteriormente, se tomaron 10 µL de células y se mezclaron

con 10 μ L de Azul de Tripán (TB, *Trypan Blue*) (colorante azoico que nos permitirá diferenciar las células vivas de las muestras basándose en la selectividad de la membrana a este tipo de compuestos) y 180 μ L de medio RPMI-1640 (dilución 1:20) para el estudio de la viabilidad y la cuantificación celular. 10 μ L de esta mezcla fueron cargados en la Cámara de Neubauer, realizando el conteo celular con ayuda de un microscopio óptico invertido y de un contador celular. Finalmente el cálculo del número de células se obtuvo empleando la siguiente expresión matemática:

Nº absoluto de células = nº de células en un cuadrante (16 cuadrículas) x factor de dilución (20) x volumen de células (10 mL) x factor de conversión (10 000).

3.4. Purificación de monocitos por doble gradiente (Protocolo adaptado de Repnik, Knzevic, & Jeras, 2003)

Tras el conteo celular, las PBMCs fueron ajustadas a una densidad celular de $50 \cdot 10^6$ células/ mL, para ello fue normalmente necesario centrifugar a 230 xg, 7 min, con freno (RT), se eliminó el sobrenadante y se añadió el volumen de RPMI-1640 necesario en función del número de PBMCs. Para realizar el gradiente hiperosmótico se depositaron (tubo de 15 mL) cuidadosamente 3 mL ($150 \cdot 10^6$ células) de PBMCs sobre una solución constituida por 4.85 mL de Percoll®, 4.15 mL de agua destilada estéril y 1 mL de 1.6 M NaCl estéril, centrifugando posteriormente a 630 xg, 15 min, sin freno (RT). La finalidad de este primer gradiente fue separar monocitos (banda superior) de linfocitos (*pellet* celular). Tras la centrifugación, con la ayuda de una *pasteur* estéril se recogió la banda de monocitos y se resuspendió en 10 mL de medio RPMI-1640. Las células fueron posteriormente centrifugadas a 350 xg, 7 min, con freno (RT), se retiró el sobrenadante con una *pasteur* estéril y nuevamente se resuspendieron en un volumen de 3 mL de medio RPMI-1640. Esta suspensión celular fue depositada cuidadosamente (tubo de 15 mL) sobre una solución isoosmótica constituida por 4.15 mL de Percoll®, 4.85 mL de agua destilada autoclavada y 1 mL de 1.5 M NaCl estéril; tras lo cual se centrifugó a 350 xg, 15 min, sin freno (RT). La finalidad de este segundo gradiente fue la separación de monocitos de plaquetas y células muertas. Tras la centrifugación se retiró el sobrenadante con ayuda de una *pasteur* estéril y se resuspendió el precipitado con 5 mL de medio RPMI-1640. Tras un nuevo proceso de centrifugación a 350 xg, 7 min, con freno (RT), el sobrenadante fue retirado (*pasteur* estéril) y las células resuspendidas en 5 mL de medio completo: RPMI-1640, 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS, *Fetal Bovine Serum*) inactivado (56 °C, 30 min), 100 IU/ mL penicilina y 100 μ g/ mL estreptomicina.

Finalmente el número absoluto de monocitos y su viabilidad fueron contabilizados como previamente se describió pero empleando una dilución celular 1:2 (10 μ L de TB + 10 μ L de suspensión celular) en un tubo *eppendorf* de 1.5 mL estéril.

3.5. Purificación de monocitos por adherencia

Con el fin de agilizar el proceso de purificación de monocitos y obtener mejores rendimientos en cuanto a pureza y número final de células, en numerosos ensayos el último de los gradientes (isoosmótico) fue sustituido por un protocolo de adherencia, basado en las diferentes propiedades adherentes de linfocitos y monocitos. Así, tras recoger la banda de monocitos del gradiente hiperosmótico las células fueron depositadas en un tubo de 15 mL y llevadas a un volumen final de 5 mL con RPMI-1640. Los monocitos fueron contados (dilución 1:2 con TB; cámara de Neubauer) y ajustados a una concentración de $2 \cdot 10^6$ células/ mL con RPMI-1640. A continuación se añadieron 0.5 mL ($1 \cdot 10^6$ células) por pocillo en una placa de 24 pocillos (p24) y se permitió la adherencia 2 h a 37 °C (5% de CO₂). Finalmente, las células no adherentes fueron eliminadas mediante un lavado suave con RPMI-1640 y las células adherentes que permanecieron en el fondo del pocillo fueron cubiertas con 2 mL de medio completo.

3.6 Cultivo de los monocitos *in vitro*

Los monocitos obtenidos mediante el protocolo de doble gradiente fueron cultivados en una p24 (empleando los pocillos necesarios para cada experimento) en medio completo, durante 48 h, a 37 °C (5% de CO₂); con una densidad inicial de 200 000 células/ mL. En cambio, los monocitos purificados mediante el protocolo de adherencia fueron cultivados en las mismas condiciones, si bien la densidad inicial fue ligeramente superior (~500 000 células/ mL).

Los monocitos fueron diferenciados a células dendríticas (moDCs, *monocyte-derived Dendritic Cells*) mediante cultivo *in vitro* durante 72 h con un factor de crecimiento de monocitos/ granulocitos (GM-CSF; 20 ng/ mL; 200 IU/ mL), suplementado con un inhibidor de la diferenciación hacia macrófagos: IL-4 (40 ng/ mL; 200 U/ mL).

Algunos pocillos fueron suplementados con NECA así como con antagonistas de los receptores A_{2A} (CV69) y A_{2B} (SYAF030), que han sido generados y proporcionados por el grupo de Eddy Sotelo Pérez

(Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares-CiQUS, Universidad de Santiago de Compostela). Tanto la NECA como los antagonistas fueron resuspendidos en Dimetilsulfóxido (DMSO, *Dimethyl Sulfoxide*).

3.7 Marcaje directo por inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo

Las células fueron marcadas inmunofluorescentemente y analizadas mediante citometría de flujo tras su aislamiento (monocitos) o bien tras el cultivo *in vitro* (moDCs). En el primer caso el propósito fue analizar la pureza inicial de la población de monocitos mediante el estudio de los marcadores CD14 y CD86 y para ello se utilizaron ~100 000 células por tubo de citometría. En el segundo caso la finalidad fue determinar los niveles finales de los mismo marcadores tras el cultivo *in vitro*; en estos ensayos se resuspendieron las células de cada pocillo de la placa con el mismo número de pipeteos y se recogieron dichas células para tubos de 15 mL; se lavaron los pocillos con 2 mL de PBS pH 7.4 frío para recoger las células más adherentes y se depositaron en el mismo tubo de 15 mL. Finalmente se realizó el conteo de las células con ayuda de una cámara de Neubauer (por duplicado) empleando una dilución 1:2 con TB y se añadió un número idéntico de células (< 100 000 células) por cada tubo de citometría, ajustando dicho número en función de aquellas condiciones de cultivo *in vitro* que generaban un menor número de células final.

Para el marcaje inmunofluorescente se emplearon tanto anticuerpos específicos anti-CD14 (*mouse anti human CD14-FITC*) y anti-CD86 (*mouse anti human CD86-FITC*) como un control isotópico (isotipo-FITC) que permitió evaluar la unión inespecífica de los anticuerpos a las células. Se añadieron 2 mL de PBS-BSA frío a cada tubo de citometría y se centrifugaron a 230 xg, 7 min, con freno (4 °C). Se decantaron los tubos para eliminar el sobrenadante y se incubaron con 5 µL del anticuerpo correspondiente durante 20 min en oscuridad; tras la incubación se realizó un lavado con PBS-BSA frío en las mismas condiciones que el anterior. Finalmente decantamos nuevamente el sobrenadante y añadimos 0.5 mL de PBS-BSA.

Las muestras fueron leídas en el citómetro FACSTMSort y se llevó a cabo el análisis de los siguientes parámetros a) Dispersión frontal (FSC, *Forward Scatter*), que está correlacionado positivamente con el tamaño de las células analizadas; b) Dispersión lateral (SSC, *Side Scatter*), que nos permite evaluar la granularidad o complejidad; c) El porcentaje de células positivas para cada marcador determinado y d) La

media geométrica de intensidad de fluorescencia, que es una estima del número medio de moléculas de interés por célula. Los ficheros de citometría con formato FCS2.0 fueron analizados mediante el programa WinMDI 2.9 (*Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry*), un software de acceso libre generado por Joe Trotter.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 El análogo de adenosina no selectivo NECA interfiere en el proceso de diferenciación de monocitos hacia células dendríticas (moDCs)

Para poder evaluar el efecto de adenosina sobre el proceso de diferenciación *in vitro* desde monocitos a moDCs los primeros ensayos que se diseñaron estuvieron encaminados a obtener una elevada pureza de las poblaciones de monocitos a partir de células mononucleares (linfocitos + monocitos) de sangre periférica humana. En estos primeros trabajos se empleó el protocolo de doble gradiente de Percoll® (hiperosmótico + isoosmótico) descrito en el apartado 3.4. Este protocolo fue empleado previamente en el laboratorio con el mismo propósito y de manera exitosa. Sin embargo, por razones no totalmente claras, estas primeras purificaciones generaron un bajo rendimiento (número absoluto de monocitos purificados) y poblaciones con insuficiente grado de viabilidad y pureza (gran cantidad de linfocitos contaminantes). Debido a ello el último gradiente (isoosmótico) fue sustituido por un proceso de adherencia, ya que los linfocitos no son células adherentes, a diferencia de los monocitos. Como resultado de esta mejora del protocolo, se observó un aumento notable del número absoluto de monocitos purificados ($75 \pm 3.21\%$) y de su pureza ($83.7 \pm 0.47\%$) por lo que se adoptó dicho protocolo para los experimentos posteriores.

Con el fin de analizar el efecto de adenosina sobre la diferenciación *in vitro* de monocitos en moDCs se empleó un agonista no selectivo de los receptores de adenosina denominado NECA; $K_i = 14$ nM, 20 nM y 6.2 nM para A_1 , A_{2A} y A_3 , respectivamente y $EC_{50} = 2.4$ μ M para A_{2B} (Volpini, R. *et al.*, 2004). El primer paso fue comprobar si NECA tenía un efecto sobre los niveles de CD14 y CD86 en moDCs y si estos efectos eran dependientes de la dosis de este agonista. Para ello, tras aislar los monocitos, estos fueron cultivados durante 72 h en presencia de GM-CSF (factor de crecimiento) e IL-4 (inhibidor de la diferenciación hacia macrófagos) y diferentes concentraciones de NECA: 0, 1.25, 2.5, 5 y 10 μ M. Tras el periodo de cultivo *in*

in vitro, las células fueron marcadas inmunofluorescentemente bien con anti CD14-FITC, anti CD86-FITC o un anticuerpo isotipo-FITC. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo y los resultados obtenidos fueron los siguientes: la expresión de CD14, normalmente muy reducida en moDCs después de 3 días de diferenciación *in vitro* ($13.44 \pm 10.22\%$) se incrementó en presencia de NECA, lo cual indica que este agonista interfiere con dicho proceso de diferenciación. Se observó además un efecto dependiente de la dosis, pero con un *plateau* entre 5 y 10 μM (**Fig. 1A**) en el que nunca se alcanzaron los valores de expresión de partida de CD14 en monocitos, mucho más altos ($94.45 \pm 2.5\%$). Por otro lado, la expresión de CD86 se redujo en moDCs en presencia de dosis crecientes de NECA (**Fig. 1B**) si bien no se llegó a alcanzar un *plateau* como en el caso de CD14. En base a estos experimentos, se decidió emplear en los siguientes ensayos concentraciones entre 5-10 μM de NECA, indicativas de que los receptores de Ado que estaban actuando y eran responsables de este efecto sobre CD14 y CD86 eran de baja afinidad (A_{2B} y A_3 ; siendo dentro de ellos A_{2B} el candidato principal, debido al incremento que produce en los niveles de cAMP y a su papel en inmunosupresión) (Haskó & Cronstein, 2004). Además dado que CD86 es una molécula coestimuladora, este efecto de NECA (y por lo tanto Ado) implicaba que estas moDCs eran APC menos eficientes, lo que ahonda sobre el papel inmunosupresor de Ado en el sistema inmunológico.

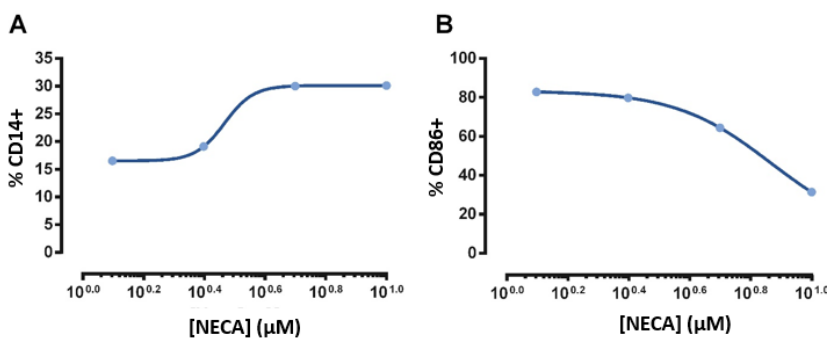


Figura 1. Efectos dosis-dependientes de la NECA en la expresión de CD14 y CD86. Monocitos humanos CD14+ fueron aislados de las PBMCs y cultivados durante 48 h en presencia de IL-4, GM-CSF y diferentes concentraciones de NECA. Para el marcaje se emplearon los anticuerpos anti-CD14-FITC (A) y anti-CD86-PE (B).

El efecto potenciador de NECA sobre la expresión de CD14 solo fue observado sobre el porcentaje de moDCs positivas para este marcador (**Fig. 1A**) pero no para la intensidad media de fluorescencia (MFI, Gm) (datos no mostrados), un parámetro correlacionado con el número promedio de moléculas en la superficie de las células; el significado de esta diferencia es desconocido. Estudios anteriores han mostrado también un efecto positivo y dependiente de dosis de NECA sobre la expresión de CD14 en moDCs (Novitskiy *et al.*, 2008) lo que concuerda con nuestros resultados, mientras que otros investigadores observaron una relación directa entre CD14 (MFI, Gm) y la concentración de NECA (Sciaraffia *et al.*, 2014),

que, como ya se mencionó, nosotros no observamos. Este grupo observa además que cAMP, actuando a través de los ARs A_{2A} y A_{2B}, es capaz de reducir la expresión de CD1a en moDCs, una glucoproteína que media la presentación antigénica y que es empleada como marcador de diferenciación de DCs. Por lo tanto nuestros datos y los de estos investigadores señalan un papel de moléculas extracelulares como Adenosina u otras relacionadas como ATP o cAMP en la supresión de la diferenciación de monocitos hacia moDCs.

4.2 La NECA revierte la diferenciación de monocitos a DC's y da lugar a células en un estado de maduración intermedio entre DC's inmaduras y monocitos

Para profundizar en los efectos de NECA sobre la diferenciación de moDCs se tomaron imágenes de las células en cultivo, y se analizó su morfología mediante citometría de flujo. Se observa que la nueva población obtenida tras inducir la diferenciación de monocitos en moDCs en presencia de NECA (5-10 μ M) muestra características morfológicas aparentes propias de DCs como la presencia de largas dendritas (**Fig. 2B**) a pesar de la mayor expresión de CD14 y menor expresión de CD86 vistas anteriormente, que las acerca más a monocitos.

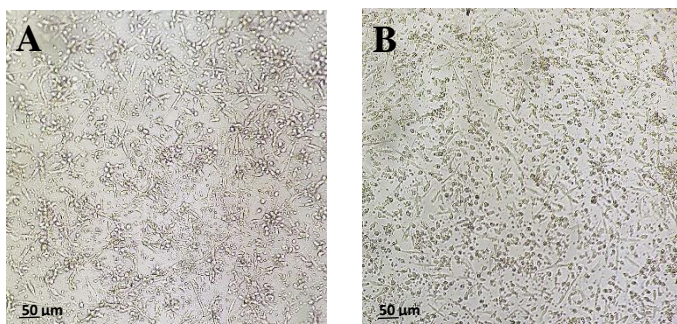


Figura 2. Imagen tomada de un microscopio óptico invertido (40 X) donde se refleja la morfología de las moDCs sin tratamiento (**A**) y las moDCs tratadas con NECA (**B**). En ambos casos, los monocitos procedían del mismo BC y fueron incubados **A.** con GM-CSF + IL-4 y **B.** con GM-CSF + IL-4 + NECA (5 μ M). Las células presentan una morfología similar, próxima a la de iDCs.

Por otro lado, los ensayos de citometría (**Fig. 3**) mostraban: a) la presencia de una población heterogénea de moDCs en ausencia de NECA, formada por dos subpoblaciones superpuestas de monocitos todavía sin diferenciar y moDCs (**Fig. 3A**), lo que indicaba que el proceso de diferenciación no era completo todavía; b) una reducción de la complejidad de las moDCs en presencia de NECA (**Fig. 3B**), dando lugar a una población con características intermedias entre monocitos y moDCs coincidente con los resultados de CD14 y CD86.

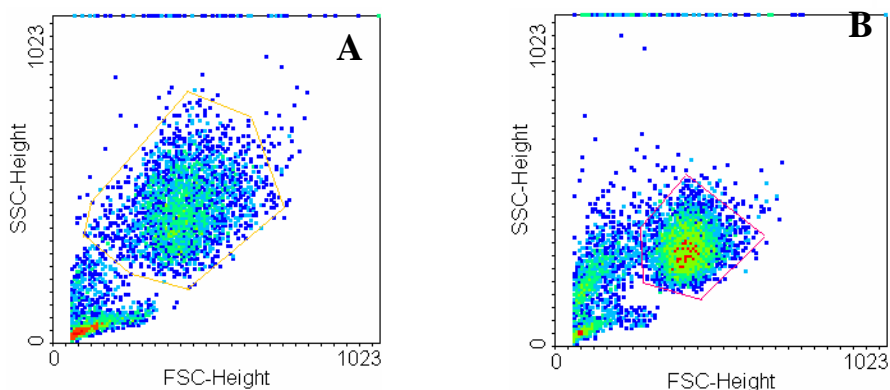


Figura 3. Tamaño y complejidad de las células tratadas con GM-CSF e IL-4 en ausencia (A) y presencia (B) de NECA. *Dot plots* obtenidos tras la realización de la citometría y análisis de los datos con el programa *WinMDI 2.9*. La concentración de NECA empleada en este ensayo fue de 10 μ M. Los resultados que se muestran son representativos de $n= 9$ realizados. FSC-Height representa la dispersión frontal de la luz en el citómetro, y es un parámetro directamente correlacionado con el tamaño celular. SSC-Height representa la dispersión lateral de la luz y está correlacionado con la complejidad interna de las células, que tiene que ver por ejemplo con la forma del núcleo, la cantidad y tipo de gránulos/ orgánulos en el citoplasma o la morfología de la membrana externa.

Con el fin de comprobar la influencia de la variabilidad biológica sobre el efecto de NECA (10 μ M) en la diferenciación *in vitro* de moDCs se realizó un análisis de la expresión de los marcadores CD14 y CD86 mediante citometría de flujo. Se estudió tanto el % como la MFI (Gm) para ambos marcadores en 5 individuos. Como se ve en la **Fig. 4** NECA produjo un aumento significativo de la expresión de CD14 en moDCs (%), pero no así la intensidad (MFI; Gm). En cambio, NECA produjo una reducción de la expresión de CD86 (% y MFI).

Las DCs obtenidas a partir de los monocitos en presencia de GM-CSF e IL-4 son caracterizadas por expresar los marcadores CD80 y CD86 (Zarif *et al*, 2016), lo que concuerda con la elevada expresión de este último en las células que no fueron tratadas con NECA. En contraste, nuestros resultados obtenidos en relación al efecto de NECA sobre la expresión de CD86 (**Fig. 1** y **Fig. 4**) difieren de los obtenidos en otros trabajos, donde muestran que los monocitos cultivados con GM-CSF e IL-4 en presencia de cAMP exógeno (tras haber demostrado la similitud entre la diferenciación de los mismos en presencia de NECA y cAMP) presentan una regulación positiva de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (Sciaraffia *et al.*, 2014). Otros estudios muestran así mismo, una elevada expresión de CD86 en presencia de elevadas concentraciones de NECA (30 μ M) (Novitskiy *et al.*, 2008). El tratamiento de las células con ATP da lugar al mismo efecto, regulando positivamente la expresión de CD86 (Wilkin *et al*, 2001), lo que se puede relacionar con el efecto de la adenosina ya que el ATP puede ser un precursor de la misma (Haskó & Pacher,

2012). Actualmente no disponemos de una hipótesis que explique la diferencia entre nuestros resultados y los de otros investigadores en relación al efecto de NECA sobre CD86 en moDCs.

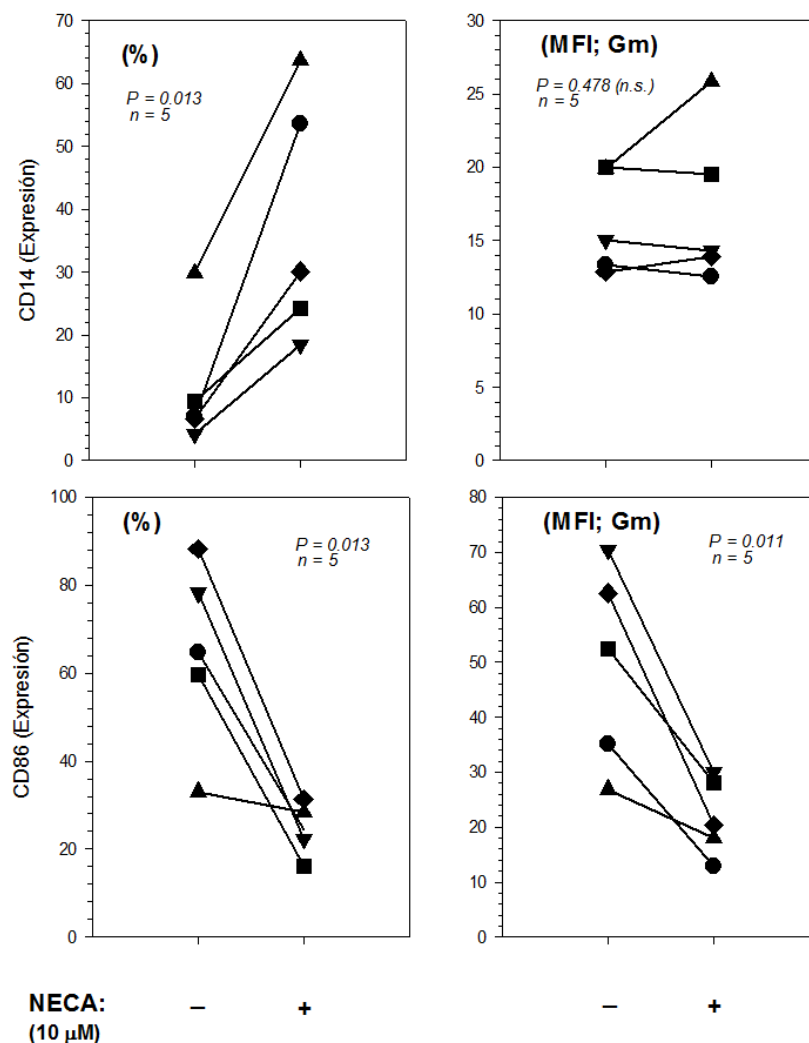


Figura 4. Expresión de CD14 y CD86 en ausencia y presencia de NECA. Los monocitos, procedentes de 5 donantes sanos y diferenciados a moDCs en presencia de GM-CSF e IL-4 fueron cultivadas en ausencia (-) y en presencia (+) de NECA (10 μM). Esta molécula induce el aumento de células CD14+ y reduce el de CD86+; el nº medio de moléculas de cada marcador expresado por célula positiva varía en el mismo sentido en el caso de CD86 y no muestra cambios significativos en el caso de CD14. El estadístico empleado fue *paired t-test* (el valor p mostrado se corresponde con el *Two-tailed P-value*)

4.3 El efecto de los inhibidores SYAF030 y CV69 sobre los receptores de adenosina no produce cambios significativos en los niveles de expresión de CD14 y CD86

La adenosina juega un papel clave como mediador anti-inflamatorio e inmunosupresivo actuando mayoritariamente a través de los receptores A_{2A} (Schiedel *et al.*, 2013), debido a la mayor afinidad de los mismos por la Ado, ya que los receptores A_{2B} necesitan una concentración mayor para activarse (Haskó *et*

al., 2009). Para comprobar cuál de los ARs estaba implicado en el proceso de generación de la población celular con características intermedias entre monocitos e iDCs y moDCs, se llevó a cabo la incubación de los mismos en presencia de GM-CSF, IL-4, NECA y alternativamente dos antagonistas de dichos receptores: CV69 ($A_{2A}R$) y SYAF030 ($A_{2B}R$). Estos antagonistas fueron titulados previamente (0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μM) y los resultados obtenidos no mostraron un efecto dosis-respuesta claro, pero sí un efecto citotóxico a concentraciones $>1 \mu M$, por lo que para estos ensayos se decidió emplear una concentración reducida de 0.1 μM en ambos casos.

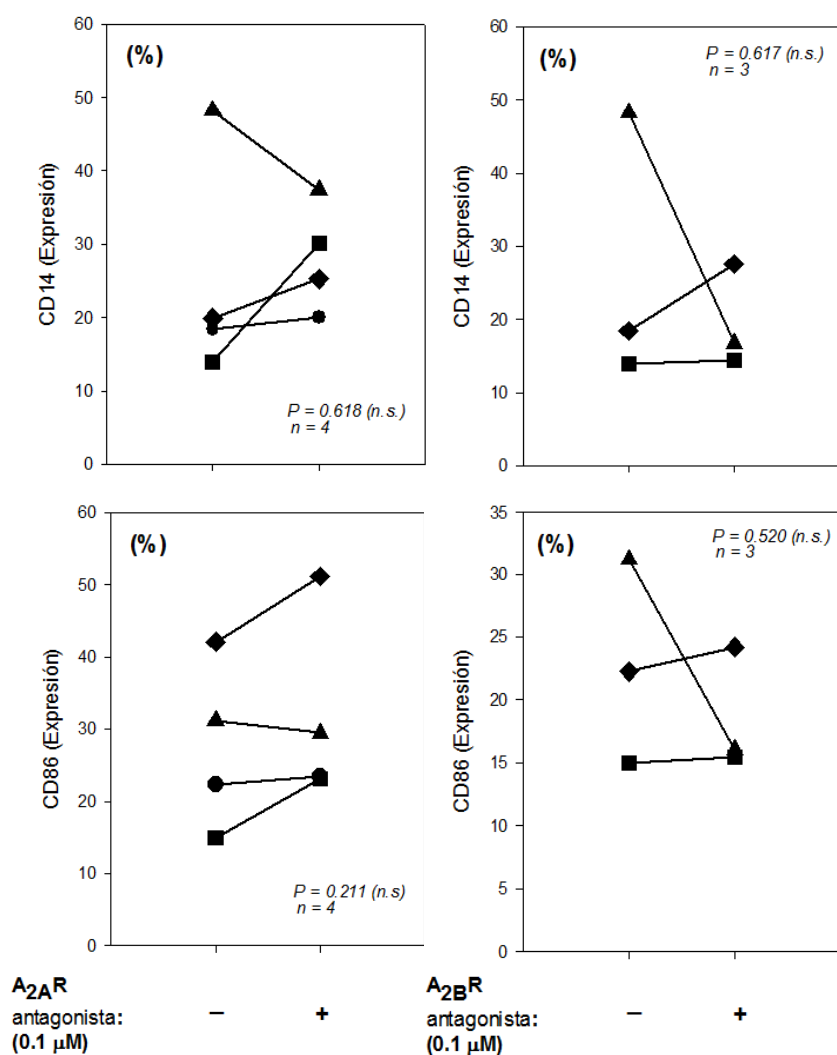


Figura 5. Expresión de CD14 y CD86 en moDCs generadas en presencia de GM-CSF, IL-4 y NECA bajo la influencia de antagonistas de $A_{2A}R$ (CV69) o $A_{2B}R$ (SYAF030). Los datos obtenidos no muestran diferencias significativas en la expresión de CD14 y CD86 en ausencia y presencia de antagonistas. El número de ensayos realizados fue de 4, con moDCs procedentes de diferentes donantes y la concentración de NECA empleada fue de 5 μM . El estadístico empleado fue *paired t-test* (el valor p mostrado es el *Two-tailed P-value*).

Aunque el número de ensayos es muy reducido ($n = 4$), se puede apreciar que la presencia de los antagonistas CV69 y SYAF030 no elimina de forma significativa el efecto de NECA (5 μM) sobre la expresión de CD14 o CD86 (% y MFI) (Fig. 5). No obstante los efectos de estos antagonistas parecen ser dependientes de la expresión inicial de dichos marcadores en las moDCs, aunque el tamaño muestral no

permite extraer más conclusiones. Hace falta un mayor número de ensayos tanto con antagonistas como agonistas específicos de los diferentes ARs para discernir cuál o cuáles son responsables de los efectos de NECA (y por lo tanto Ado) sobre la diferenciación de monocitos en DCs.

4.4 El incremento de expresión de CD14 causado por NECA en moDCs está correlacionado positivamente con el número de células.

En paralelo a los ensayos de inmunofluorescencia y citometría de flujo, las células tras ser cultivadas *in vitro* fueron resuspendidas siguiendo los mismos procedimientos (independientemente del tratamiento al que fueran sometidas) y cuantificadas con la ayuda del microscopio invertido, un contador celular y una cámara de Neubauer. Los datos obtenidos nos permitieron relacionar la expresión de CD14 y CD86 con el número absoluto de células y determinar que existe una correlación directa entre la proliferación celular y la expresión de CD14 (**Fig. 6A**), mientras que la relación no fue significativa en el caso de CD86 (**Fig. 6B**).

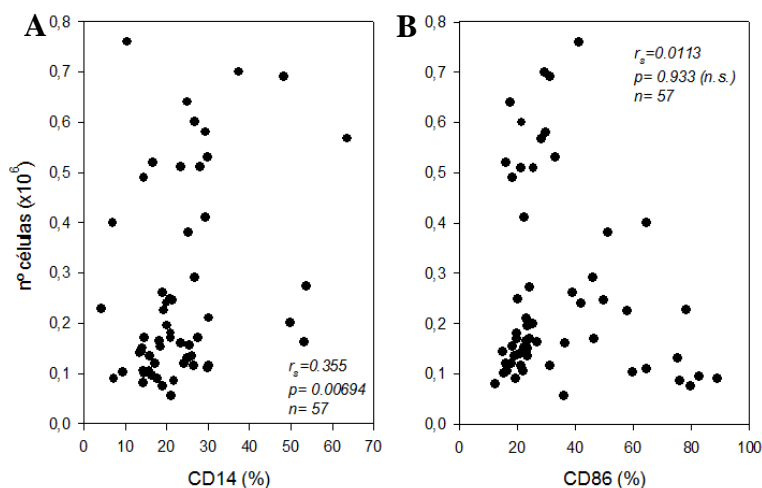


Figura 6. Correlación entre la expresión de CD14 y CD86 y la proliferación celular. En las gráficas se representa la correlación entre la expresión de ambos marcadores y el nº de células obtenidas. En la figura **A** se muestra la correlación del número absoluto de moDCs con la expresión de CD14, mientras que en la figura **B** se muestra la correlación con la expresión de CD86. Los resultados de correlación fueron obtenidos empleando un test de *Spearman*.

Estos resultados podrían asociarse con la mayor capacidad proliferativa de las células en un estado de indiferenciación, como es el caso de monocitos CD14+, frente a células diferenciadas como las moDCs CD14^{low}. La adenosina puede tener un efecto proliferativo o anti-proliferativo, estimulando el crecimiento celular o la apoptosis (Schiedel *et al*, 2013.) En este caso NECA estaría favoreciendo la proliferación celular o la supervivencia, incrementando el número absoluto final de moDCs.

5. CONCLUSIONES

1. NECA interfiere con la diferenciación de monocitos humanos en noDCs, aumentando la expresión de CD14, reduciendo la de CD86 y generando una población de APCs menos eficiente y con características híbridas entre monocitos y moDCs.
2. Los resultados experimentales disponibles por nuestro grupo no permiten valorar, en estos momentos, si los antagonistas selectivos de los receptores A_{2A} y A_{2B} son capaces de revertir el efecto de la NECA sobre la diferenciación de moDCs.
3. El efecto de NECA sobre la diferenciación de moDCs genera un aumento bien de la proliferación celular o de la supervivencia.

6. BIBLIOGRAFÍA

- **Challier, J.,** Bruniquel, D., Sewell, A. K. *et al.* 2012, “Adenosine and cAMP signalling skew human dendritic cell differentiation towards a tolerogenic phenotype with defective CD8+ T-cell priming capacity”, *Immunology*, vol. 138, no. 4, pp. 402-410.
- **Giordano, D.,** Magaletti, D. M., Clark, E. A. *et al.* 2003, “Cyclic nucleotides promote monocyte differentiation toward a DC-SIGN⁺ (CD209) intermediate cell and impair differentiation into dendritic cells”, *The Journal of Immunology*, vol. 171, no. 12, pp. 6421-6430.
- **Fainboim, L. & Geffner, J. 2011,** *Introducción a la Inmunología Humana*, 6^a Ed., Editorial Médica panamericana, Buenos Aires. ISBN: 9789500602709.
- **Haskó, G. & Cronstein, B. N. 2004,** “Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity”, *Trends in immunology*, vol. 25, no. 1, pp. 33-39.
- **Haskó, G.,** Csóka, B., Németh, Z. H. *et al.* 2009, “A(2B) adenosine receptors in immunity and inflammation”, *Trends in Immunology*, vol. 30, no. 6, pp. 263-270.
- **Haskó, G. & Pacher, P. 2012,** “Regulation of macrophage function by adenosine”, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, vol. 32, no. 4, pp. 865-869.
- **La Sala, A.,** Ferrari, D., Corinti, S. *et al.* 2001, “Extracellular ATP induces a distorted maturation of Dendritic Cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses”, *The Journal of Immunology*, vol. 166, no. 3, pp. 1611-1617.

- **Male, D.**, Brostoff, J., Roth, D. B. *et al.* 2013, *Inmunología*, 8ª Ed., Editorial Elsevier, Barcelona. ISBN: 9780702045486.
- **Novitskiy, S. V.**, Ryzhov, S., Zaynagetdinov. R. *et al.* 2008, “Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function”, *Blood Journal*, vol. 112, no. 5, pp. 1822-1831.
- **Regueiro González, J. R.**, López Larrea, C., Rodríguez González, S. *et al.* 2010, *Inmunología: Biología y patología del sistema inmunitario*, 4ª Ed., Editorial Médica panamericana, Madrid. ISBN: 9788498350036.
- **Repnik, U.**, **Knezevic, M. & Jeras, M.** 2003, “Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats”, *Journal of immunological methods*, vol. 278, no. 1-2, pp. 283-292.
- **Schiedel, A. C.**, Lacher, S. K., Linnemann, C. *et al.* 2013, “Antiproliferative effects of selective adenosine receptor agonist and antagonist on human lymphocytes: evidence for receptor-independent mechanism”, *Purinergic Signalling*, vol. 9, no. 3, pp. 351-365.
- **Sciaraffia, E.**, Riccomi, A., Lindstedt, R. *et al.* 2014, “Human monocytes respond to extracellular cAMP through A2A and A2B adenosine receptors”, *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 96, no. 1, pp. 113-122.
- **Segura, E.**, Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M-H. *et al.* 2012, “Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes”, *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 209, no. 4, pp. 653.
- **Volpini, R.**, Costanzi, S., Lambertucci, C. *et al.* 2004, “Adenosine receptor agonist: synthesis and binding affinity of 2-(aryl)alkythioadenosine derivatives”, *ARKIVOC*, vol. 5, pp. 301-311.
- **Wilkin, F.**, Duhant, X., Bruyns, C. *et al.* 2001, “The P2Y₁₁ receptor mediates the ATP-induced maturation of Human Monocyte-derived Dendritic Cells”, *The Journal of Immunology*, vol 166, no. 12, pp. 7172-7177.
- **Zarif, J. C.**, Hernandez, J. R., Verdone, J. E. *et al.* 2016, “A phased strategy to differentiate human CD14⁺ monocyte into classically and alternatively activated macrophages and dendritic cells”, *BioTechniques*, vol. 61, no. 1, pp. 33-41.

