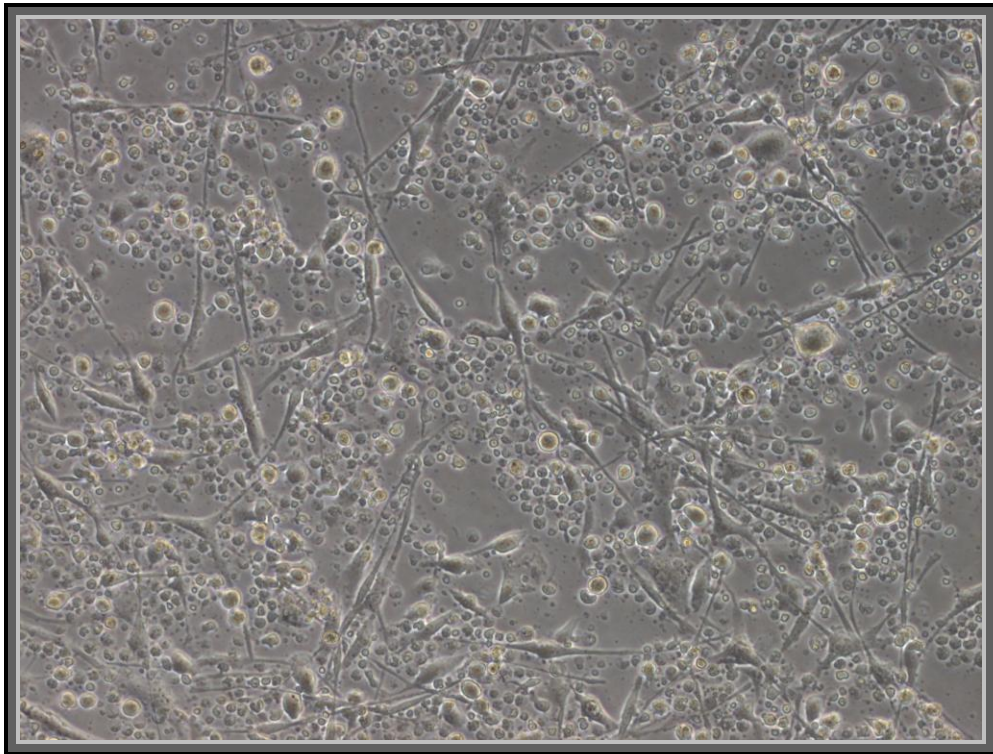


# PROYECTO FIN DE MÁSTER

## PAPEL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA NEOVASCULARIZACIÓN TUMORAL

ISABEL SEGURA GIL

---



# ÍNDICE

<b>1.INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1.CÉLULAS DENDRÍTICAS	1
1.1.1.Historia y origen	1
1.1.2.Función	2
1.2.CÉLULAS DENDRÍTICAS Y CÁNCER	6
1.3.NANOBIOMEDICINA	8
1.3.1.Nanopartículas y aplicaciones	10
<b>2.OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>3.MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
3.1.OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	13
3.1.1.Muestras para la obtención de células y separación de las distintas fases	13
3.1.2.Contaje y viabilidad celular	13
3.1.3.Productos y condiciones de cultivo	14
3.2.COCULTIVOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	14
3.2.1.Cocultivos de DCs	14
3.3.EXPERIMENTACIÓN IN VIVO	15
3.3.1.Extracción de médula ósea murina y vehiculización de células dendríticas	15
3.3.2.Inoculación del tumor y de las DCs con nanopartículas	16
3.3.3.Recogida de muestras	17
3.4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	17
3.4.1.Citometría de flujo	17
3.4.2.Anticuerpos	17
3.4.3.Inmunofenotipado	18
3.4.4.Anatomía patológica	19
3.4.4.1.Tinción de Perls	19
3.4.4.2.Inmunohistoquímica	19
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>21</b>
4.1.CULTIVOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	21
4.1.1.Rendimiento de la extracción monocítica desde sangre periférica	21
4.1.2.Citometría de flujo	21
4.2.COCULTIVOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	27
4.2.1.Expresión de marcadores característico de células dendrítica	27
4.2.2.Expresión de marcadores característicos de células endoteliales	28
4.2.2.1.Calibrado VEGF	28
4.2.2.2.Marcadores fenotípicos	29
4.3.EXPERIMENTACIÓN <i>IN VIVO</i>	33
4.3.1.ANATOMÍA PATOLÓGICA	33
4.3.1.1.Tinción de Perls	33
4.3.1.2.Inmunohistoquímica	33
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>36</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>38</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. CÉLULAS DENDRÍTICAS

### 1.1.1. Historia y origen

Las células dendríticas (DCs) representan una población heterogénea de células inmunocompetentes de origen hematopoyético que se encuentran en la mayoría de los tejidos así como en los órganos linfoides primarios y secundarios. En determinados estadios de maduración presentan unas proyecciones de tipo arbóreo, dendritas, por las que reciben el nombre.

Las DCs fueron identificadas como células del sistema inmune por Steinman en 1973 al encontrarlas en órganos linfoides periféricos de ratón (Steinman y Cohn, 1973. J Exp Med), pero anteriormente ya habían sido identificadas en la piel por Langerhans, en 1868, que pensó que dada su morfología ramificada podían ser células nerviosas y posteriormente por Birbeck, en 1961, cuando por microscopía electrónica observó unos orgánulos citoplasmáticos de estructura trilaminar que no se asociaban a ninguna célula nerviosa.

Actualmente se acepta que hay dos caminos de diferenciación y maduración de las DCs: el linaje linfóide y el linaje mielóide (Shortman y Liu, 2002. Nat Rev Immunol). Ambos derivan de una célula progenitora hematopoyética común  $CD34^+$  que podemos encontrar en la médula ósea. En el caso de la estirpe mielóide, presentan fenotipo  $CD11c^+$ ,  $CD13^+$ ,  $CD33^+$ ; requieren factor estimulante de colonias granulo-monocíticas (GM-CSF) para sobrevivir (Cuellar et al., 2004. Universitas Scientarum) y se ha demostrado que cultivando estos progenitores *in vitro* en presencia de GM-CSF e IL-4 son capaces de diferenciar de monocitos a DCs (Inaba et al., 1993. J Exp Med). Por el contrario, se ha demostrado que este progenitor, cultivado en presencia de IL-3, diferencia a una DC plasmocitoide cuyo fenotipo es  $CD11c^-$ ,  $CD123^+$  siendo este último el receptor para IL-3. Las DCs mieloides se encuentran en tejidos periféricos, lugares de inflamación y órganos linfoides secundarios (Kapsenberg, 2003. Nat Rev Immunol) mientras que las DCs plasmocitoides, que tienen un progenitor común  $CD34^+CD38^-CD7^+$  con linfocitos T, B y NK (Wu et al., 1991. J Exp Med; Traver et al., 2000. Science; Manz et al., 2001. Ann NY Acad Sci), se encuentran principalmente en órganos linfoides secundarios (Rissoan et al., 1999. Science).

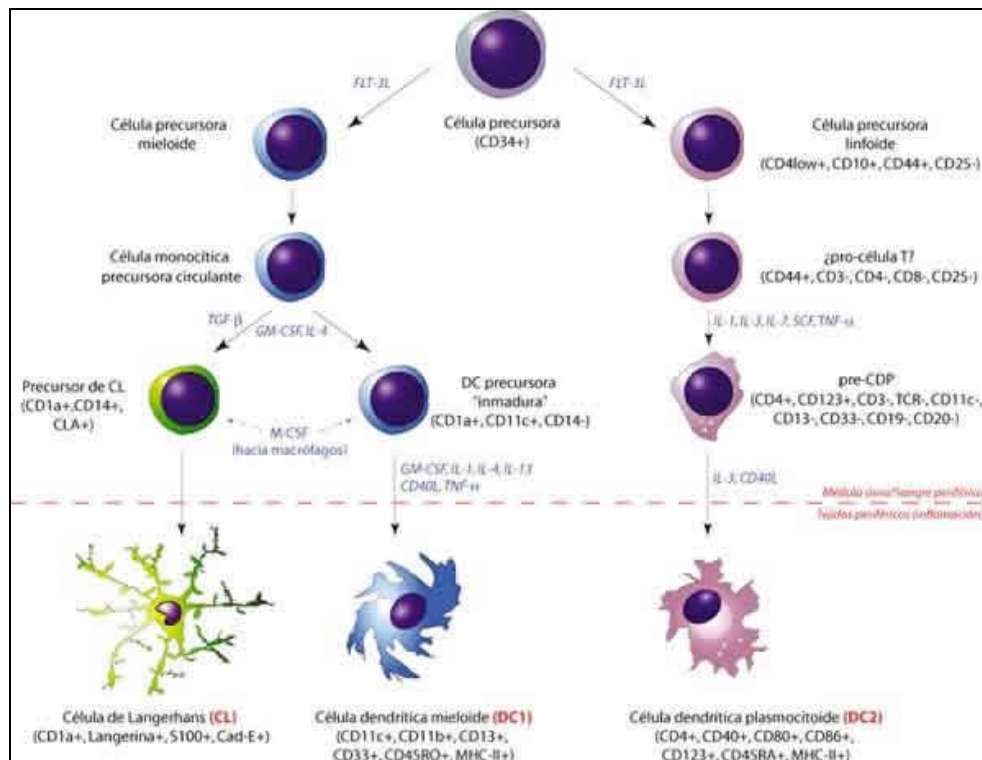


Figura 1: Diferentes precursores y subtipos de células dendríticas con sus fenotipos característicos

### 1.1.2. Función

La función de las DCs es actuar como presentadoras de antígeno a otras células del sistema inmune que llevarán a cabo la respuesta inmunológica tras ser activadas (Steinman, 1991. Annu Rev Immunol). La capacidad de reconocer, captar, procesar y presentar el antígeno (Ag) les ha valido el nombre de células presentadoras de antígeno (APC, Antigen presenting cell) profesionales. Las DCs intervienen tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa. En la respuesta innata se da una rápida lucha frente a las infecciones por su capacidad fagocítica (Janeway y Medzhitov, 2002. Annu Rev Immunol) mientras que la respuesta adaptativa es mucho más lenta, específica y capaz de generar memoria antigénica. Se ha descrito que las células dendríticas inmaduras (iDCs) pueden ayudar en la regulación de los linfocitos T (LT) promoviendo tolerancia y las células dendríticas maduras (mDCs) estimulan a los LT efectores promoviendo la inmunidad (Banchereau et al., 2000. Annu Rev Immunol; Steinman, 2003. APMIS).

Las iDCs se encuentran ampliamente distribuidas en tejidos periféricos no linfoides y se encargan de ir buscando patógenos, captando antígenos y procesándolos. Para esto, tienen una alta variedad de receptores de patrones moleculares que sirven

para el reconocimiento antigénico. Estos receptores son del tipo Toll Like Receptors (TLR) (Akira et al., 2001. Nat Immunol), receptores de manosa, lecitinas de tipo C como el DC-SIGN (CD209) (Geijtenbeek et al., 2000. Cell), receptores scavenger, etc.

Las DCs, al de reconocer específicamente patrones moleculares propios de patógenos (PAMPs) pueden interaccionar con un amplio abanico de Ag, ya sean exógenos como células tumorales o infectadas por virus, o bien células necróticas y/o apoptóticas del propio organismo.

El mecanismo mediante el cual las DCs captan el Ag puede ser por fagocitosis, macropinocitosis o endocitosis mediada por receptor. Esta última parece ser la más importante y hay una amplia variedad de receptores: FcγR, de tipo lecitina C, de tipo scavenger, etc.

Las características funcionales de las DCs varían en función de su estado de diferenciación. Cuando tiene lugar la invasión por el patógeno, los precursores de las DCs (monocitos CD14<sup>+</sup>) son atraídos a los focos de inflamación por citoquinas (Sallusto y Lanzavecchia, 1999. J Exp Med) y se diferencian a iDCs que son muy eficientes captando antígeno. Por el contrario, en su estadio inmaduro, las DCs tienen baja capacidad de estimular a los LT y es por esto que presentan baja cantidad de MHC, y de moléculas coestimuladoras como son CD40, CD83 y CD86 (Dhodapkar et al., 2001. J Exp Med).

Una vez que el antígeno es endocitado y procesado, la función de las DCs cambia, así como su fenotipo. Las DCs abandonan el tejido periférico y migran vía linfática hacia los nódulos linfáticos. Durante esta migración se producen diversos pasos de maduración intermedia y, entre otros, la expresión del receptor CCR7 que favorece esta migración (Saeki et al., 1999. J Immunol; Geissmann et al., 2002. J Exp Med). Es entonces cuando las DCs pierden su capacidad de reconocer Ag y de procesarlo y ganan la de activar a los LT. Para esto expresan altos niveles de MHC-II en su superficie donde presentan el Ag a los LT, y aumentan los niveles de moléculas coestimuladoras para la activación de estos (CD40 y CD86) (Reis e Sousa, 2006. Curr Opin Immunol). A este cambio fenotípico y funcional se conoce como maduración de las DCs.

Una vez que el Ag está en el interior de la célula, este puede ser procesado bien por vía MHC-I o bien por vía MHC-II dependiendo de su procedencia. Si el Ag proviene de una proteína intracelular, éste será presentado a los LT citotóxicos CD8<sup>+</sup> por vía MHC-I, que se encuentra presente en la mayoría de las células. En cambio, si la

proteína es exógena y ha sido endocitada, como es en el caso de las DCs, la ruta de presentación es mediante MHC-II, que presenta el péptido a LT helper  $CD4^+$ . Estas moléculas de MHC-II están presentes de manera constitutiva y en altas concentraciones en células con función presentadora de Ag como son las DCs, los linfocitos B y de manera inducible en los macrófagos. En este caso, una vez el Ag está dentro de la célula es degradado por catepsinas del endosoma en péptidos más pequeños. La molécula de MHC-II se ensambla en el retículo endoplasmático rugoso (RER) y lo hace también con la cadena invariante Ii (CD74) que dirige la clasificación celular y evita que se una péptidos incorrectos en la hendidura de MHC-II. Estos complejos son transportados al aparato de Golgi en vesículas que se van a fusionar posteriormente con el endosoma que contiene los péptidos procesados. En ese ambiente ácido, la cadena invariante se degrada permaneciendo sólo un pequeño fragmento en la hendidura, péptido CLIP, que posteriormente será sustituido por el péptido a presentar. Así, el conjunto MHC-II-péptido exógeno, es transportado hasta la membrana plasmática celular donde queda expuesto para la presentación del péptido a linfocitos  $CD4^+$ .

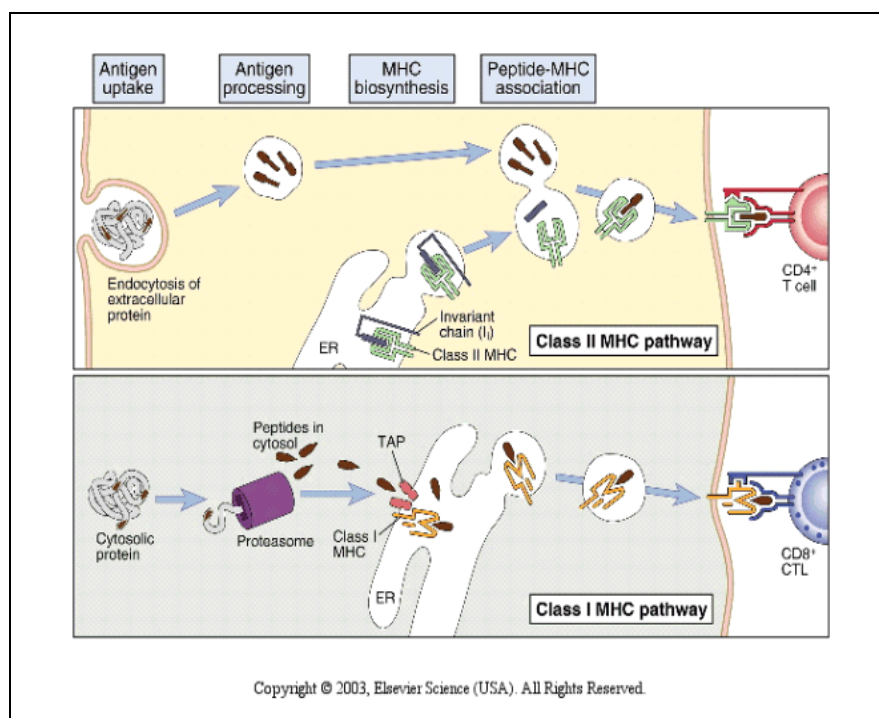


Figura 2: las 2 vías de carga de péptidos en MHC para ser presentados en la membrana de las DCs.

expresión de quimiocinas que atraen a las DCs y ahí se da la presentación antigénica. Para que se de esta presentación antigénica, debe de haber un reconocimiento específico del Ag en la superficie de la molécula MHC-II por parte del receptor del LT, TCR, así como la



expresión de moléculas coestimuladoras que sean reconocidas por los correceptores presentes en la superficie del linfocito para activarlo y que se de la respuesta inmunológica. Así CD40 se une a su ligando CD40L en las  $CD4^+$  y  $CD8^+$  y CD86 lo hace con CD28 expresada en  $CD8^+$  (Inaba et al., 2000. J Exp Med; Hauss et al., 1995. Eur J Immunol). La unión DC-LT es más estrecha gracias a la presencia de moléculas de adhesión presentes en ambas membranas celulares.

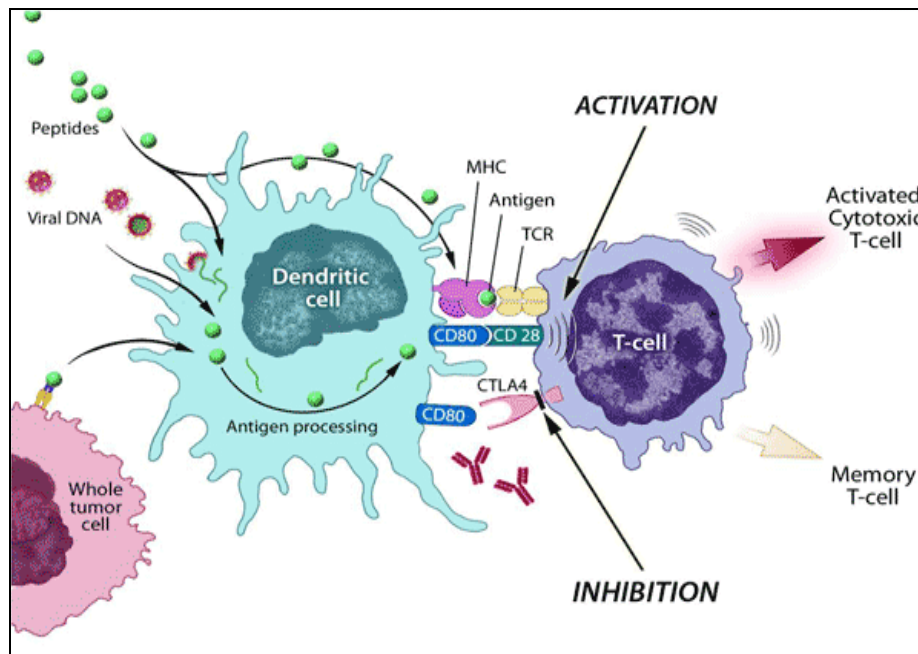


Figura 3: Presentación antigénica por parte de la DC al linfocito T mediada por MHC y moléculas coestimuladoras.

Las DCs tienen una característica que las diferencia de otras CPA y es que son capaces de activar linfocitos T “naive” (Sallusto y Lanzavecchia, 2000. Immunol Rev). En cuanto al tipo de respuesta inmune que producen puede ser tipo Th1 o Th2 en función de las citoquinas secretadas (O’Garra. 1998. Immunity). Las mDCs secretan IL-12 que como se ha demostrado, generan una respuesta Th1 (Macatonia et al., 1995. J Immunol), sin embargo, si la interleuquina presente es IL-4 se promueve una respuesta de tipo Th2.

## 1.2. CÉLULAS DENDRÍTICAS Y CÁNCER

En los individuos adultos, el proceso de formación de vasos sanguíneos se conoce como angiogénesis o neovascularización (Kumar et al., 2005. Elsevier). Hasta hace

unos años, se pensaba que la vascularización de los tumores malignos se producía exclusivamente mediante brotes vasculares a partir de vasos pre-existentes. Sin embargo, posteriormente se ha demostrado que hay diferencias morfológicas y estructurales entre las células endoteliales "*per se*" y en las presentes en procesos de neovascularización de algunos tipos tumorales. Esto puede deberse a que tienen distinto origen y el origen de estas últimas parece ser el reclutamiento de progenitores endoteliales procedentes de la médula ósea que se diferencian a células endoteliales "de novo" (endotelial-like cells) en el tumor, y forman ahí los nuevos vasos (Rumpold et al., 2004. J Cell Mol Med; Coukos et al., 2005. Br J Cancer).

Tanto en el caso de tumores localizados como para que se desarrolle una metástasis es necesario que se de un proceso de angiogénesis. En el primer caso, los tumores pueden aumentar su tamaño aproximadamente 1-2 milímetros sin que sus demandas metabólicas sean restringidas. Sin embargo, debido a la limitada difusión de oxígeno y nutrientes, para crecer por encima de ese tamaño el tumor debe cambiar a un fenotipo angiogénico (Folkman, 1995b. N Eng J Med). Este proceso es regulado por factores pro- y anti-angiogénicos (Carmeliet y Jain, 2000. Nature) y uno de los más potentes proangiogénicos es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Su sobreexpresión ha sido demostrada en una gran variedad de tumores sólidos (Ferrara, 2003. Nat Med). En el segundo caso, la neovascularización permite la dispersión de células malignas a focos tumorales secundarios.

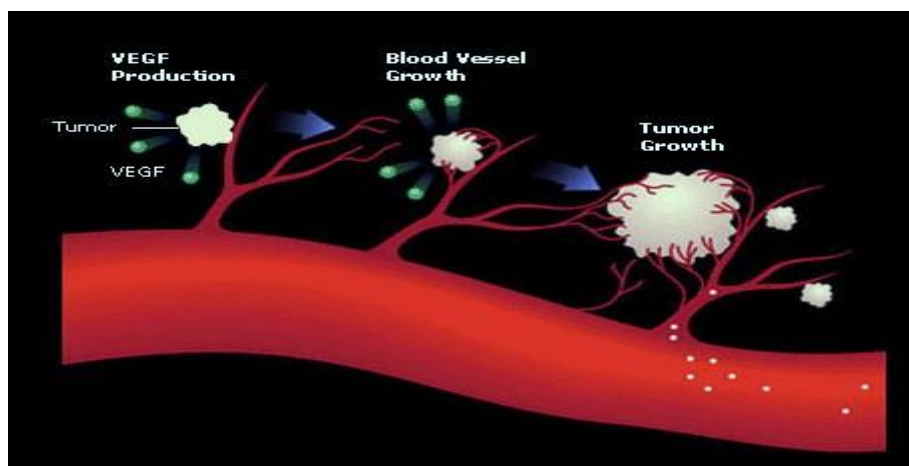


Figura 4: Neovascularización de tumor estimulada por liberación tumoral de VEGF.

En el año 2000 (Fernandez Pujol et al., 2000. Differentiation), se demostró que células sanguíneas mononucleares (CD14<sup>+</sup>), si se cultivaban en presencia de algunos factores angiogénicos adquirirían morfología y marcadores característicos de células endoteliales,



con un paso intermedio de diferenciación a DCs. Durante este proceso la célula adquiere algunos marcadores de células endoteliales (KDR o VEGFR-2, vWF o von Willebrand factor, VE-Cadherina o CD144), pierde marcadores característicos de leucocitos monocíticos como CD14 y también CD83, y siguen expresando marcadores de DCs tales como CD86 y MHC-II. (Choi et al., 2004. Annu Rev Immunol) Las DCs se confirmaron como las células leucocitarias más similares a las células endoteliales al ver que los monocitos en su proceso de endotelización adquirirían marcadores de DCs, por ejemplo CD1a (Harraz et al., 2001. Stem Cells).

Conejero-García et al (Conejero-García et al., 2004. Nat Med) obtuvieron DCs al cultivar células de médula ósea de ratón en un medio con GM-CSF. Posteriormente, estas DCs obtenidas fueron cultivadas en un medio suplementado con altas dosis de VEGF y se observó una progresiva diferenciación a células con características de células endoteliales a partir del 7º día de cultivo. Estas células ya diferenciadas expresaban CD34, CD31 y vWF, pero mantenían algunos marcadores característicos de DCs, como son CD11c y CD45.

Se acepta entonces el importante papel que tiene VEGF en el desarrollo tumoral. La sobre-producción tumoral de VEGF por parte del tumor puede inhibir la maduración de DCs, impidiendo una presentación de antígeno efectiva, evitando la acción del sistema inmunitario. Además se sirve de las DCs inmaduras como vehículo para la neovascularización (Gabrilovich et al., 1996. Nat Med). Pero, ¿afecta también a las DCs ya maduras presentes en el tumor?

Otros autores (Tian et al., 2001. J Immunol) observaron que el VEGI (inhibidor del factor endotelial de crecimiento vascular) estimula la maduración de las DCs activando el factor de transcripción JNK, asociado con la liberación de IL-12 y TNF característico de DCs maduras, así como a la expresión de moléculas co-estimuladoras y de adhesión. Por tanto, VEGI tiene propiedades antiangiogénicas al madurar las DCs, al contrario que lo que ocurre con VEGF.

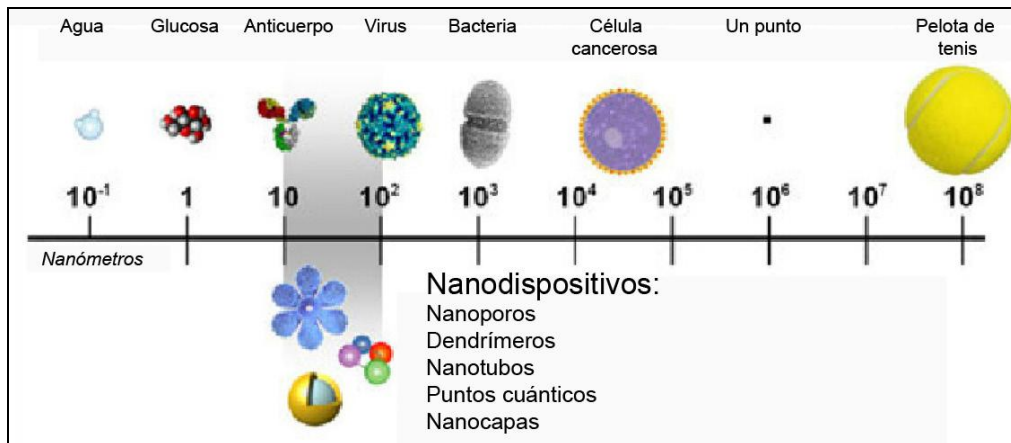
Pero hay trabajos que van más allá de la experimentación *in vitro* y dan indicios de la participación de DCs en la vascularización tumoral “*in vivo*”. En un trabajo publicado en 2004 (Conejero-García et al., 2004. Nat Med), se estudiaron tumores de ovario que producen diferente niveles de VEGF, y en los que inducen la expresión de b-defensinas (péptidos que atraen a las DCs) y así observar su actividad anti-tumoral. Se comprobó que en tumores secretores de altos niveles de VEGF y que expresaban b-

defensinas mostraban un incremento importante en el crecimiento. Además, presentaban vascularización muy desorganizada dando zonas hemorrágicas. Al estudiar la composición celular de estos vasos encontraron células CD11c<sup>+</sup> (marcador específico de CDs) mezcladas con células endoteliales, CD11c<sup>-</sup>. Estas células CD11c<sup>+</sup> expresaban simultáneamente CD45 (marcador leucocitario) y VE-cadherina y KDR (marcadores de células endoteliales). En otro trabajo (Conejero-García et al., 2005. Blood) se estudiaron suspensiones de células procedentes de tumores de ovario y observaron que hasta un 40 % de las células analizadas presentaba un fenotipo mixto entre célula leucocitaria y endotelial, CD45 y VE-cadherina. También se comprobó con implantes de matrigel en ratones que las células con fenotipo mixto, tenían capacidad angiogénica “*in vivo*”

Huarte et al, en el 2008 (Huarte et al., 2008. Can Res) vieron que la reducción de células CD11c<sup>+</sup> al mismo tiempo que se inoculaba el tumor ovárico en ratones, disminuía el tamaño de éste en 3 veces. También corroboraron lo mismo al reducir CD11c<sup>+</sup> en tumores ya establecidos puesto que también disminuía su crecimiento. Observaron una necrosis del tumor, comprobando así el fenotipo proangiogénico y el papel de las células dendríticas CD11c<sup>+</sup> en la vascularización tumoral.

### **1.3. NANOBIOMEDICINA**

En una conferencia impartida en 1959 por Richard Feynman, uno de los grandes físicos del siglo pasado, ya se aventuraba a decir que “había un montón de espacio en el fondo” imaginándose la cantidad de material a nivel molecular o atómico que se podía fabricar y sacar partido de él. Unas cuantas décadas después, nos encontramos con que la nanociencia es un área emergente de la ciencia que estudia los sistemas de dimensiones comprendidas entre 0 y 100 nm, es decir  $10^{-9}$  veces mas pequeño que la unidad del metro.

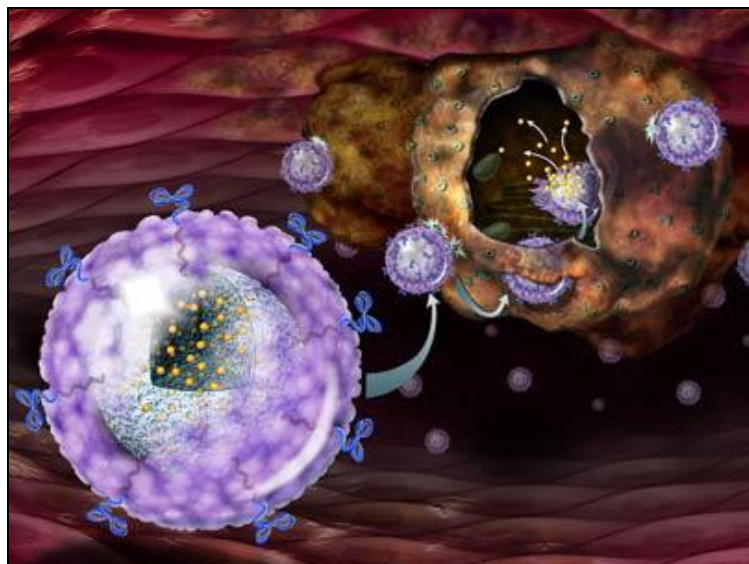


*Figura 5:* Imagen que muestra la escala desde 0,1 nm que mide una molécula de agua hasta los 10 cm que mide una pelota de tenis. Los nanodispositivos más utilizados miden entre 10-100 nm.

La nanotecnología es un campo multidisciplinar, que necesita de la colaboración estrecha de varias ramas de la ciencia como la biología, la física, la química, la tecnología, etc. Una de las principales razones del éxito de este campo es la posibilidad de tener el control de las propiedades fundamentales de los materiales que utilizamos pero también es clave para el estudio de los sistemas biológicos a veces inaccesibles por su tamaño molecular. La unión de estas dos características hace de la nanotecnología un campo de investigación y trabajo atractivo y fundamental para el siglo XXI.

La nanotecnología ofrece un amplio abanico de posibilidades en biología molecular y medicina. En el campo de los fármacos, en continua evolución, se han desarrollado algunos fármacos que al ser introducidos en sistemas nanoestructurados, permiten mejorar la entrada a través del torrente sanguíneo así como pueden tener una mayor selectividad en las células diana. También en medicina, supone una ventaja en el diagnóstico mediante biosensores, así como en la liberación de ácidos nucleicos en la terapia génica. La posibilidad de fabricar materiales a esa escala y de biofuncionalizarlos hace posible mejorar, controlar y eliminar toxicidad.

En el caso más cercano que nos ocupa, la nanotecnología y el cáncer, hay gran cantidad de avances desde unos años aquí. Desde mejorar el diagnóstico precoz usando biosensores formados por nanopartículas biofuncionalizadas con anticuerpos (Ac) frente a antígenos sobreexpresados en o por tejidos pre-y/o tumorales (Kularatne et al., 2002. Citometry), hasta una mejora terapéutica vectorizando los fármacos hacia las células diana, localizando mejor su acción y evitando daños colaterales a células sanas.



*Figura 6:* En un primer plano se observa una nanopartícula cargada con fármacos y rodeada de moléculas que van a reconocer específicamente receptores en la célula diana cancerosa que se ve detrás. En ella se ve como se internalizan las NPs y liberan el fármaco en el interior de la célula para destruirla.

### 1.3.1. Nanopartículas y aplicaciones

El tamaño nanométrico de las partículas conlleva una organización y separación especial de los átomos que las forman dando como resultado una características físico-químicas propias (Poole, 2003. Introduction to nanotechnology). Además, estas características pueden ser modificadas al gusto de las necesidades de la experimentación que se quiera llevar a cabo.

Pueden recubrirse con materiales hidrofílicos que les permita unirse a moléculas lipofílicas y así vencer barreras de solubilidad como puede ofrecer la membrana plasmática, pueden recubrirse de sustancias biocompatibles (Brigger et al., 2002. Adv Drug Deliv Rev) y llevar en su interior carga muy variable y evitar así citotoxicidad.

Como he citado anteriormente, son inmensos los tipos de nanopartículas disponibles e inmensas las aplicaciones que se pueden hacer con ellas.

Algunas de las nanopartículas (NP) con las que está trabajando nuestro grupo son las nanopartículas magnéticas (NPM), compuestas por materiales ferromagnéticos como la magnetita. Estas NPM, mediante la aplicación de un campo magnético externo, son capaces de perturbar el momento magnético nuclear de los átomos de hidrógeno que las rodean y son utilizadas con agentes de contraste en imagen por resonancia magnética (MRI). Si bien es cierto que suelen ir recubiertas para controlar mejor algunas propiedades como la biocompatibilidad y toxicidad.

Las aplicaciones de estas NPM son variadas: separación magnética, MRI para visualizar cualquier órgano así como biodistribución de células cargadas con estas NPM o la hipertermia que provoca la muerte celular causado por altas temperaturas.

## 2. OBJETIVOS

- Establecer cultivos de DCs a partir de leucocitos monocíticos humanos y de médula ósea de ratón en condiciones reproducibles para verificar la implicación de estas células en el proceso de vascularización tumoral.
- Determinar el cambio fenotípico de DCs a “*like-endothelial cells*” mediante cocultivos con diferentes células tumorales: HeLa (coriocarcinoma ovárico) y B16F10 (murine melanoma cell line).
- Vehicular las DCs con nanopartículas y así ver “*in vivo*” su biodistribución y su capacidad de vascularización en la zona tumoral.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

##### 3.1.1. Muestras para la obtención de células y separación de las distintas fases

Se realizaron 12 cultivos de células dendríticas (DCs) a partir de leucocitos monocíticos obtenidos de bolsas de 500 ml de sangre periférica de pacientes hiperglobúlicos procedentes del banco de sangre del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa que se dejaron reposar toda la noche en posición vertical y a temperatura ambiente para obtener una separación natural de fases. De las tres fases resultantes y ya en campana de flujo laminar (*danLAF-o-matic/ VFRS-1206*) para mantener la esterilidad, se recogió la fase intermedia (la fase blanca) y se realizó un proceso de separación con dextrano (*Sigma-Aldrich*) al 0,9% de NaCl (*Panreac*) en proporción 1:1 (dextrano: sangre) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se recogió la fase superior de esta separación y con ella, se llevó a cabo otra separación en gradiente de Ficoll (*Histopaque 1077, Sigma*) también en proporción 1:1, añadiendo primero el Ficoll y después la muestra para evitar que las fases se mezclen. Se centrifugó a 1400 rpm, 30 minutos a 20° C, sin freno y se recogió el anillo resultante en la interfase que contiene la fase blanca de la sangre que es la que nos interesa. Se resuspendió la muestra obtenida en PBS, y se hicieron 4 lavados de 10 minutos cada uno, dos a 1200 rpm y posteriormente, dos a 800 rpm para eliminar las plaquetas.

##### 3.1.2. Contaje y viabilidad celular

Se realizó el contaje celular en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) utilizando el colorante Trypan Blue para estudiar la viabilidad celular. Este no es permeable en células cuya membrana está intacta (células vivas) y sí es capaz de penetrar en las células muertas que tienen la membrana celular dañada. Así pues, en el microscopio óptico, se observan las células muertas teñidas de azul y las vivas de un color blanco- amarillento brillante. Se cogió una alícuota de 25 µL de nuestra muestra homogeneizada y una alícuota de la misma cantidad de Trypan Blue al 0,4% en NaCl 0,15M (*Sigma-Aldrich*).

### 3.1.3. Productos y condiciones de cultivo

Se resuspendió el pellet celular en medio RMPI 1640 (*Lonza*) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB, *Sigma*, *heat inactivated*), un 1% de antibióticos (*Sigma Aldrich*. 10000 unidades de penicilina y 10 mg streptomycin/ml) y un 1% de L-Glutamina (*Sigma Aldrich*, 200mM), y se sembró en diferentes recipientes para cultivo celular dependiendo de los diferentes análisis que se iban a realizar con las células mejora a posterioridad. Habitualmente, en una placa de 6 pocillos (*Falcon*) con un volumen final de 3 ml de medio de cultivo completo o bien en frascos de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con tapón de rosca y filtro (*Falcon*), con un volumen final de 6 ml de medio de cultivo completo. Se incubó durante dos horas en estufa de cultivo celular (*Binder*), a 37°C y con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y tras esas dos horas, se eliminó lo que no había quedado adherido a la placa ya que las células monocíticas si que lo hacen y se adicionó medio de cultivo completo suplementado con las citoquinas GM-CSF (*Sigma*) e IL-4 (*Sigma*) a una concentración de 25 ng/ml cada una para inducir la diferenciación de monocitos a células dendríticas inmaduras (iDCs), que se renovaron el día 3, 5 y 7. El 5º día de , cuando las DCs están es estadio inmaduro, se estimuló el cultivo paralelamente con LPS (lipopolisacárido, 50 ng/ml, *Sigma-Aldrich*) y con un cóctel de citoquinas: IL-1β, IL-6 y TNFα a concentración de 10 ng/ml para inducir la maduración de las CDs (mCDs).

## 3.2. COCULTIVOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

### 3.2.1. Cocultivos de DCs

Una vez establecidos los cultivos anteriores, a día 7, se realizaron 6 cocultivos con las líneas tumorales HeLa (carcinoma ovárico humano) y B16F10 (melanoma murino), así como con sus sobrenadantes obtenidos de su cultivo.

En la placa de 6 pocillos donde estaban las mCDs, se dejó uno como control cambiando los 3 ml de RPMI 10% y citoquinas como en los cultivos anteriores, y se adicionó 1 ml del mismo a día 9 y día 11. En otros dos pocillos se colocó una membrana semipermeable (*Cell culture insert*, *Beckton-Dickinson*) que evita el contacto entre los dos tipos celulares pero que permite el paso de factores secretados in situ por las células

tumorales hacia las DCs y viceversa. Sobre esta membrana se colocaron  $2 \times 10^5$  células de HeLa en un pocillo y  $2 \times 10^5$  de B16F10 en otro. Se adicionó 1 ml de medio a día 9 y 11. Se hicieron dos puntos paralelos de cada uno en sendas placas de cultivo.

En otros dos pocillos se añadió sobrenadante obtenido de cultivos celulares de HeLa y B16F10, que fue filtrado por una membrana de  $0,2 \mu\text{m}$  (*Mackerey-Nagel*) para eliminar los posibles restos celulares, y fueron complementados con el 1% de su volumen con antibióticos y L-glutamina. Se congeló y se fue adicionando 3 ml a día 7 y 1 ml a día 9 y día 11. Se hicieron dos puntos paralelos de cada uno en sendas placas de cultivo.

En estas mismas placas, en el último pocillo, se añadieron los 3 ml de medio con citoquinas y además se adicionó VEGF (*Sigma*) en concentración de 50 ng/ml en una y 250 ng/ml en otra. Esto se eligió así tras realizar una recta de calibrado de VEGF a distintas concentraciones: 0, 10, 50, 100, 250 y 500 ng/ml.

A día 14-15 de cultivo, se soltaron las células dendríticas y se hizo citometría de flujo para el estudio de marcadores característicos de dichas células.

### **3.3. EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO***

#### **3.3.1. Extracción de médula ósea murina y vehiculización de células dendríticas (DCs)**

Se utilizaron 4 ratones hembras de 6 semanas de la línea C57 BL16/J. Se sacrificaron en cámara de  $\text{CO}_2$  y se recogieron las patas traseras. Ya en cabina de flujo laminar para tener condiciones de esterilidad se eliminó todo el tejido muscular que cubría los huesos con pinzas y bisturí y se obtuvieron así los fémur y las tibias, dos por individuo. Para obtener la médula ósea del interior de estos se realizó un pequeño corte con unas tijeras en cada uno de los extremos del hueso y con la ayuda de la presión de una jeringuilla (10 ml, *ICO 3 plus*) y PBS se produjo la extracción de la médula. Se resuspendió el tejido en PBS para disgregarlo, y se filtró por una membrana de nylon (Cell strainer, *BD Falcon*) para eliminar posibles restos de tejido y recolectar únicamente la fase celular. También se realizó una lisis eritrocitaria con agua destilada

durante 30 segundos, para eliminar los eritrocitos que suelen ser tóxicos para los cultivos de la serie monocítica.

Se hicieron 3 lavados ya con medio de cultivo completo RPMI 1640 al 10% a 1400, 1200 y 800 rpm, en ese orden. Para eliminar la población linfocítica que no interesaba, se deplecionó añadiendo a la suspensión celular un cóctel de anticuerpos monoclonales anti-CD4, anti-CD8 y anti B-220 durante 60 minutos a 37 °C. Posteriormente, se realizó el conteo celular con Trypan Blue y se sembró en placas de cultivo con GM-CSF (Mouse recombinant, *Sigma* G0282) e IL-4 murinas (Mouse recombinant, *Sigma* I1020) en las mismas condiciones que en los cultivos citados anteriormente. En este caso, en lugar de cambiar el medio en los días oportunos, se adicionó, sin eliminar el anterior.

A día 7, estas DCs se incubaron con nanopartículas (NPs) de hierro-carbono (FeC) al 1%, a razón de 100 µl/pocillo de cultivo para obtener una concentración aproximada de 0,1 mg/animal; fueron facilitadas por el Instituto de Nanociencia de Aragón (INA). La eficacia de incorporación así como la citotoxicidad de estas NPs ya fue comprobada anteriormente por el grupo mediante microscopía electrónica y MTT, respectivamente. (Goya et al., 2008. *Cell Bio Int*)

A las 24 horas de la adición de las NPs, se retiró el sobrenadante de los pocillos, se lavó dos veces con medio de cultivo para eliminar el exceso de NPs, se recogieron las DCs pegadas con rasqueta y se centrifugó la muestra 2 veces a 800 rpm para eliminar las NPs que no hubiesen sido endocitadas por las células. Se recogen en un volumen final de medio de 300 µl en un eppendorf porque al inocularlo se pierde algo de volumen, y así inocular exactamente 200 µl/animal.

### **3.3.2. Inoculación del tumor y de las DCs con nanopartículas (NPs)**

La experimentación in vivo de la inoculación de tumor se realizó en ratones hembras de 6 semanas de la línea C57 BL16/J con los cuales se formaron 2 grupos: un grupo problema con 5 animales y un grupo control con 3. A los animales del grupo problema se les inyectaron por vía subcutánea en la parte dorsal  $1,5 \times 10^5$  células/animal de melanoma murino (línea B16F10) en un volumen final de 200 µl RPMI 1640 sin SFB para que no haya interacciones. Para la inoculación los animales fueron

anestesiados con isofluorano a concentración inicial del 4% y del 2% para el mantenimiento durante la inoculación. Este procedimiento fue realizado por gente cualificada para ello.

Diez días después del inóculo tumoral, se dilató con lámpara de infrarrojos la vasculatura de vena caudal de la cola y se inyectaron por vía intravenosa las células dendríticas que contenían las NPs. Del grupo problema se les inyectaron NPs a 4 ratones y se dejó uno como control, sólo con el inóculo tumoral. Del grupo control, se inyectaron las NPs a dos animales y otro se dejó como control sin tumor ni NPs.

### **3.3.3. Recogida de muestras**

24 horas después de la inoculación de DCs+NPs, se sacrificaron los animales y se extirparon bazo, hígado, pulmón riñón, nódulos linfoides contralaterales e ipsilaterales, así como el tumor desarrollado en el dorso del animal y se recogieron en formaldeído neutro al 10% para el estudio de anatomía patológica y en suero salino para la determinación de hierro. Estas últimas se congelaron a -20° C hasta su utilización. La realización de estos experimentos fue supervisada por el Servicio Científico Técnico de Valoración Funcional del IACS.

## **3.4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS**

### **3.4.1. Citometría de flujo**

Mediante la técnica de citometría de flujo se estudió el fenotipado de las DCs usando diversos anticuerpos monoclonales característicos de esta estirpe celular. En todos los casos se estudió marcaje de membrana.

### **3.4.2. Anticuerpos**

Los anticuerpos monoclonales estaban marcados fluorescentemente de manera indistinta bien con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o bien con ficoeritrina (PE) y se usaron como controles de isotipo silmutest G1 (FITC)/ G2a (PE) y simultest G2a (FITC)/ G1 (PE) ambos de BD (*Beckton & Dickinson*) en una dilución 1:11.

### 3.4.3. Inmunofenotipado

Se obtuvieron las DCs que estaban en cultivo adheridas al plástico con una rasqueta para evitar daños en las proteínas de membrana que podría causar la tripsina, habitualmente usada para esto. Se centrifugó a 1200 rpm durante 7 minutos, se hizo el conteo celular, se eliminó el sobrenadante y se preparó una suspensión celular de  $5 \times 10^4$  células en 50  $\mu$ l de PBS- EDTA 2mM por cada punto experimental que se quería estudiar.

Se añadieron a tubos *eppendorf* los anticuerpos monoclonales, 5  $\mu$ l, y los 50  $\mu$ l de la suspensión celular obteniendo así una dilución 1:11. Se vorteo para homogeneizar la muestra y se incubó durante 15 minutos, a 4°C y en oscuridad, para facilitar la unión antígeno-anticuerpo.

Tras la incubación se hizo un lavado para eliminar el anticuerpo que no había unido específicamente a su antígeno. Se realizó un *spin* en la minifuga (*Eppendorf centrifuge 5415-R*), se eliminó el sobrenadante y se volvió a resuspender el pellet celular con PBS- EDTA 2mM. Se repitió la operación y la resuspensión fue en 200  $\mu$ l, volumen final para realizar la citometría, y se puso la muestra en los tubos para citometría de flujo (*Beckman*). En este último punto se adicionó Sitox Blue (*Molecular probes, Invitrogen*) a una dilución 1:1000 para medir la viabilidad celular ya que es capaz de penetrar en las células que tienen la membrana dañada (muertas), unirse al DNA y dar fluorescencia.

La citometría se realizó con el equipo FACS Aria del Servicio Científico Técnico de Separación Celular y Citometría del IACS a día 0, 3, 5, 7 tanto del sobrenadante como de las células adheridas, para ver la diferencia de marcadores fenotípicos en los cultivos de CDs iniciales en los cuales se midieron CD14 (*Caltag*), CD83 (*eBioscience*), CD86 (*eBioscience*), DC-SIGN (*perCP-Cy, Beckton & Dickinson*), HLA-DR (*Beckman Coulter*), CD1a (*Caltag*); marcadores de monocitos, de iCDs y de mDCs .

En el caso de los cocultivos a día 14-15 de cultivo, se soltaron las células dendríticas como se cita anteriormente y se estudiaron de marcadores fenotípicos característicos tanto de DCs (CD86 (*eBioscience*), CD11c (*Inmunotech*), CD45



(eBioscience), DC-SIGN (*perCP-Cy*, Beckton & Dickinson), HLA-DR (Beckman Coulter) ) como de células endoteliales (VE-caderina, CD34 (Beckman Coulter), CD31 (eBioscience), CD54 (Beckman Coulter), KDR anti- hVEGFR2 (R&D Systems).

Este procedimiento es el que se siguió también con las células dendríticas obtenidas de ratón con anticuerpos murinos CD3, CD4, CD8, CD11C, CD14, CD40, CD45, CD80 y CD86 todos de *eBioscience*.

#### **3.4.4. Anatomía patológica**

Se realizó con el apoyo y asesoramiento del Servicio Científico Técnico de Anatomía Patológica del I+CS. Se fijó en el formaldehído, se realizó una deshidratación alcohólica con gradaciones de alcohol. Se llevó a cabo la inclusión en parafina de los tejidos seleccionados en la necropsia de los ratones y se realizaron cortes seriados del bloque a 3 micrómetros y se realizó una tinción de Perls para detectar hierro de las NPs y técnicas de inmunohistoquímica para detectar el hierro y diversos marcadores de DCs.

##### **3.4.4.1. Tinción de Perls**

Se utilizaron como reactivos ferrocianuro potásico al 5% en agua destilada, ácido clorhídrico al 5% en agua destilada y rojo nuclear.

Se desparafinaron las preparaciones en xileno e hidrataron en soluciones de concentración creciente de alcohol hasta agua corriente. Después se trataron las preparaciones con una mezcla de las soluciones de ferrocianuro potásico al 5% y ácido clorhídrico al 5% a partes iguales, durante 30 minutos y se lavaron con agua corriente durante un minuto. Posteriormente, se contrastaron las preparaciones con rojo nuclear durante 5 minutos, se lavaron y por último, se deshidrataron en soluciones crecientes de alcohol, se aclararon con xileno y se montaron con el medio de montaje.

En los resultados se espera ver el hierro férrico, incluida la hemosiderina, en azul y los núcleos de las células en rojo.

##### **3.4.4.2. Inmunohistoquímica**

Esta técnica se realizará con anticuerpo monoclonales frente a CD40, CD3, CD80, CD86 Y CD11c. Se esperan positividad para CD40, CD80, CD86 Y CD11c,

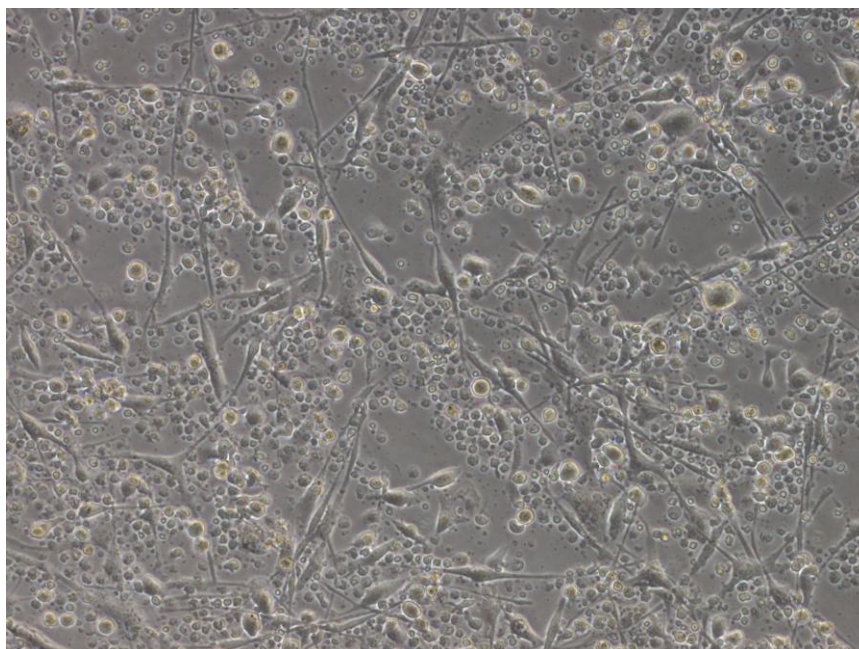
mientras que se espera que CD3 salga negativo puesto que es el marcador característico de linfocitos T.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. CULTIVOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

#### 4.1.1. Rendimiento de la extracción monocítica desde sangre periférica.

Se obtuvieron una media de 400 millones de células de la serie blanca por bolsa de sangre que fueron sembradas en los recipientes de cultivo. Gran parte de ellas eran linfocitos que fueron eliminados tras las dos horas de pegado, quedando una parte mucho menor (la fracción monocítica). No se observaban apenas células muertas con la tinción de Trypan Blue. Con el paso de los días se iban despegando del plástico y se perdieron células respecto al inicio del cultivo.



*Figura 7:* Cultivo de DCs visto por microscopía óptica a 10 aumentos.

#### 4.1.2. Citometría de flujo

Se analizó el fenotipo mediante citometría de flujo de las células en cultivo a día 3, 5 y 7, este último día las que habían sido estimuladas con LPS y con CQ. También se hizo citometría a día 0 del sobrenadante resultante después de las dos horas de pegado en la estufa. En los histogramas obtenidos y basándonos en el tamaño y complejidad celular se diferenciaron dos poblaciones bien definidas, la población 1 (P1) y la población 2 (P2). P1 tenía un tamaño y complejidad mayor y P2 tenían menor tamaño y menor complejidad.

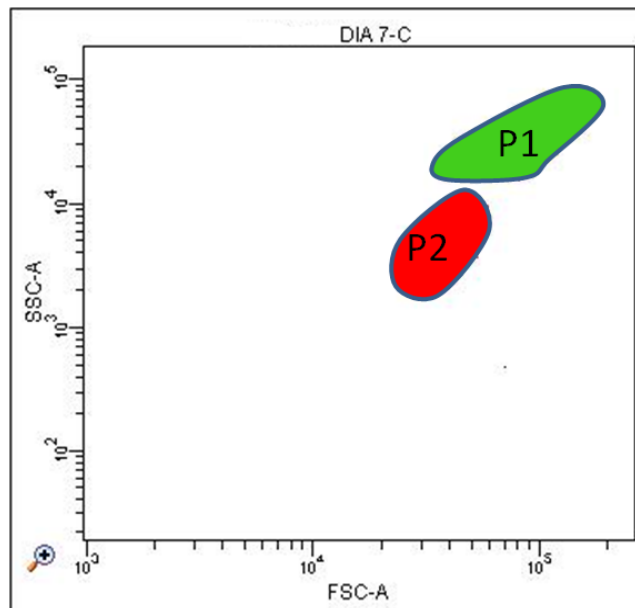
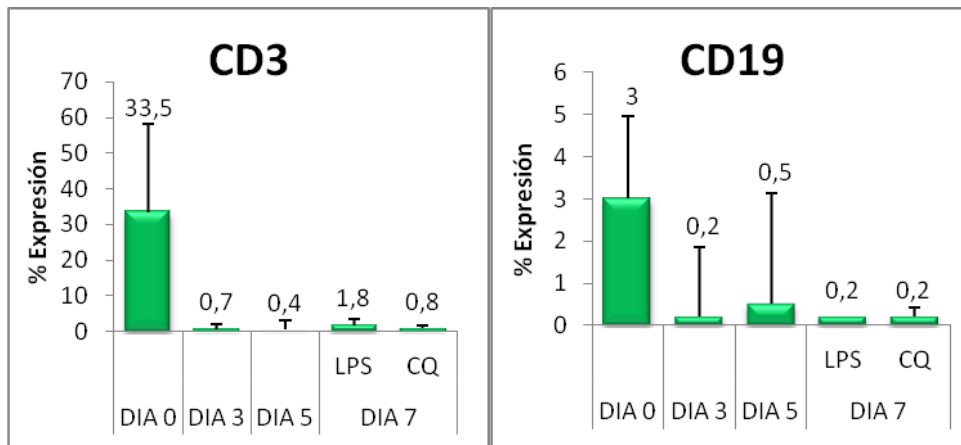


Figura x: Diagrama de citometría de flujo que representa complejidad (SSC-a) frente a tamaño (FSC-A) en el que se observan dos poblaciones diferentes.

P1 presentaba marcadores característicos de células dendríticas como CD1a, CD11c, CD40, CD80, CD83, CD86 y HLA-DR y P2 era positivo para marcadores típicos de linfocitos T y B como CD3 y CD19, respectivamente, siendo la mayoría linfocitos T. En ambas población había una expresión moderadamente alta del antígeno leucocitario CD45. A continuación se muestran los histogramas con los datos obtenidos en detalle de cada marcador fenotípico.

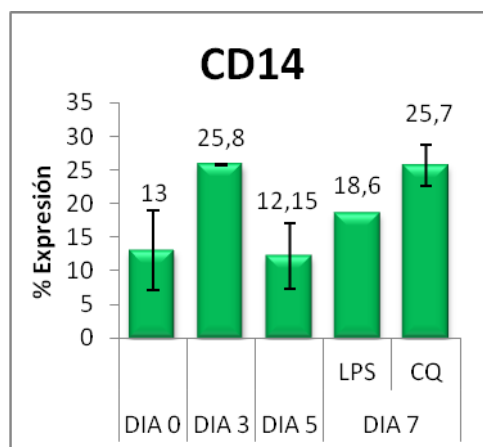
#### 4.1.2.1. Expresión de **CD3** y **CD19**.

CD3 y CD19 son marcadores de membrana característicos de linfocitos T y linfocitos B, respectivamente. En nuestros experimentos se observó que a día 0 de cultivo, en el sobrenadante recogido tras las 2 horas de pegado en placa, había un 33,5% de LT y un 3% de LB. A día 3 su expresión había disminuido y se mantenían niveles muy bajos hasta el último día de cultivo cuando los valores eran de 0,2 % para LB y de 0,8% para LT, por lo tanto fueron considerados como marcajes nulos.



#### 4.1.2.2. Expresión de **CD14**.

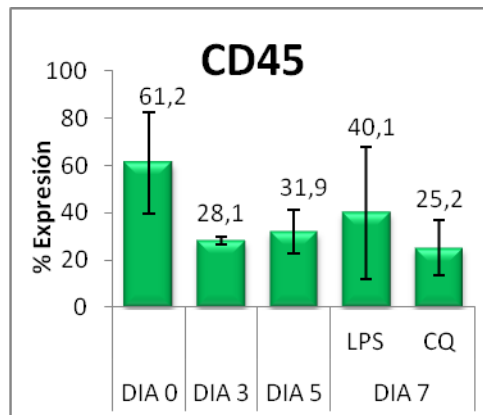
Es un marcador característico de monocitos, células de las cuales derivan las DCs que estudiamos. A día 0 la expresión es de 13%, es lo que cabe esperar puesto que lo que medimos ese día fue el sobrenadante tras el tiempo del pegado en placa, en el cual, los monocitos deberían haber quedado adheridos. Sin embargo, el resto de días se mide la población adherida, y los valores deberían ir decreciendo sucesivamente. Se observa un mayor descenso en el día 5, y un poco menor a día 7 con LPS. Esto puede deberse a la diferencia de los puntos de experimentación, puesto que estaban sembrados independiente el uno del otro.



#### 4.1.2.3. Expresión de **CD45**.

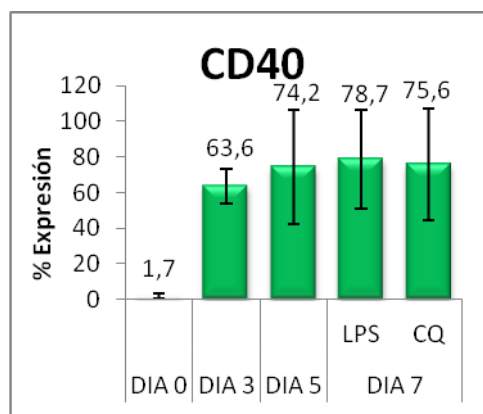
CD45 es un antígeno panleucocitario que se expresa en todas las células nucleadas de origen hematopoyético. Según nuestros resultados, aunque desciende desde el inicio del cultivo se mantiene en niveles medios hasta el final, de un 65,15% hasta un 40,1% en la maduración con LPS. Se usa el descarte de la contaminación por eritrocitos. Las diferencias pueden deberse también a que los diferentes días esaban en

diferentes pocillos, pero aún así, después de 7 días de cultivos los eritrocitos no deberían ser un problema.



#### 4.1.2.4. Expresión de **CD40**.

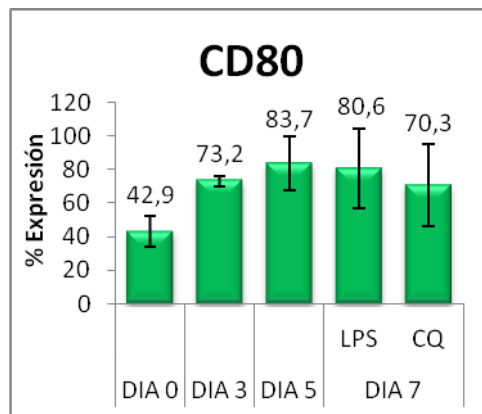
Es una proteína de membrana que se expresa en todas las APC y es un marcador de activación, y por tanto aparece en la membrana de las DCs. En nuestro estudio, al inicio se expresa en muy bajo porcentaje, un 1,7%. Es a partir del día 3 cuando empieza a expresarse en altos niveles y aumentando progresivamente hasta alcanzar un máximo en las células a día 7 que han sido estimuladas con LPS y ya están en estadio maduro donde lo expresan el 78,7% de las células del cultivo, lo que corrobora q están más expresados en mDCs..



#### 4.1.2.5. Expresión de **CD80**.

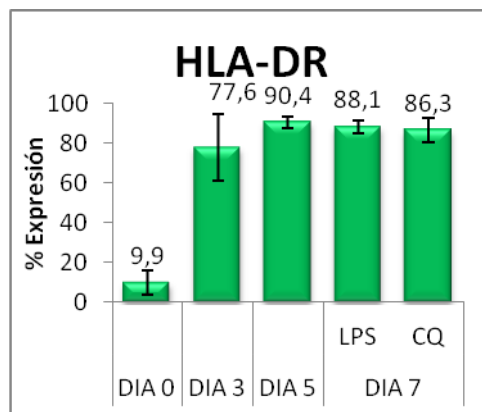
Se expresa en linfocitos B y T activados así como en monocitos y DCs. Se observa un crecimiento paulatino desde el control hasta las iDCs manteniéndose en mDCs con LPS como inductor a la maduración y un 10% menos con CQ.





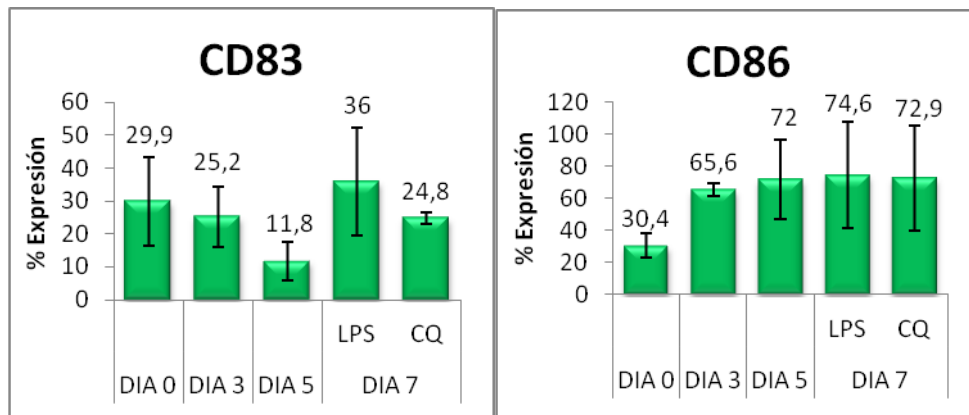
#### 4.1.2.6. Expresión de **HLA-DR**, **CD83** y **CD86**.

Estos son por norma general marcadores de DCs maduras. HLA-DR es la molécula de MHC-II encargada de presentar a los LT el Ag procesado por las DCs inmaduras. La expresión es alta tanto en moléculas inmaduras (día 5) como en maduras (día 7) rondando los valores el 90% de expresión. Además hay poca desviación en estos resultados.



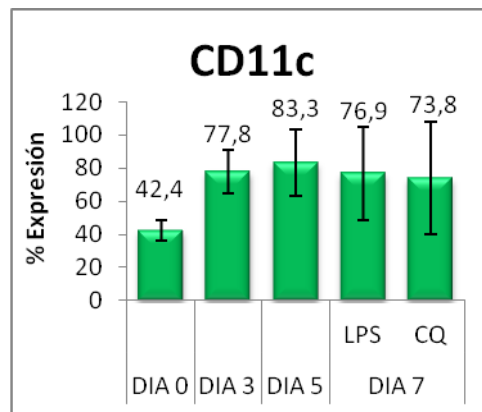
En el caso de CD83 y CD86 son moléculas coestimuladoras necesarias para la activación de los LT. En CD83 se ve una variación entre el estadio inmaduro y maduro ya que en el día 5 había expresión del 11,75% y aumentar hasta un 36% a día 7 cuando el estímulo es el LPS, siendo más de un 10% menos cuando el estímulo es el cóctel de citoquinas. Esto permite diferenciar fenotípicamente las DCs inmaduras de las maduras (Dummer et al., 1995) Si observamos la expresión de CD86, la expresión va aumentando paulatinamente desde un 30,4% que encontramos el día 0 de cultivo hasta un 74,6% cuando han sido estimuladas con LPS. Sigue siendo menos la expresión cuando el

estímulo es el cóctel de citoquinas, 72,95%. Esto corrobora junto con el HLA-DR el fenotipo de DCs maduras, aunque el marcador diferencial entre ellas sea CD83.



#### 4.1.2.7. Expresión de **CD11c**.

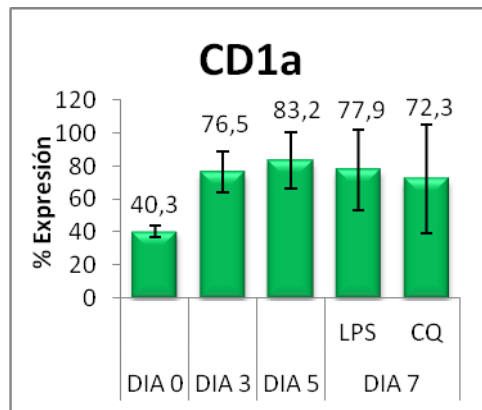
El marcador CD11c es característico de las células dendríticas de origen mieloide y se observaron altos porcentajes tanto en DCs imaturas como en maduras. Hubo altos porcentajes a partir del día 3 de cultivo en torno a un 77%, con el máximo de 83,3% el día 5 previo a la estimulación, disminuyendo levemente en mDCs pero manteniéndose altos.



#### 4.1.2.8. Expresión de **CD1a**.

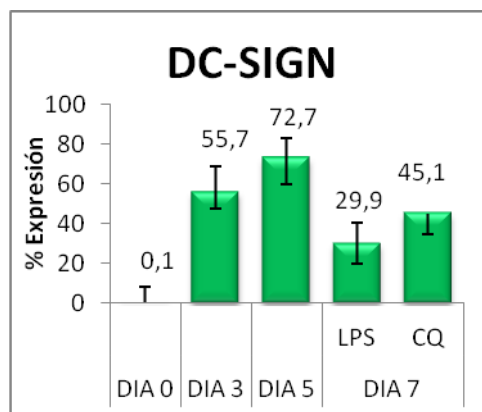
Es un marcador de DCs que ha generado mucha controversia. Según la literatura seguida para estos experimentos, cabía esperar altos porcentajes de expresión cuando las DCs estaban en estadio de inmadurez y que lo perdiesen en gran medida cuando estaban maduras. En nuestros datos no se observa dicha disminución. Se dan valores altos,

rondado el 75-80%, en todos los estadios de la DC puesto que aunque hay descenso cuando han madurado, éste es bastante moderado.



#### 4.1.2.9. Expresión de **DC-SIGN**.

DC-SIGN puede actuar como receptor de adhesión uniéndose con gran afinidad a moléculas ICAM-2 e ICAM-3 (figdor et al 2002) para el proceso de captación de Ag (Banchereau 1998) y, por tanto, es el marcador de iCDs por excelencia. Como se puede ver en el gráfico inferior, es en el día 5, cuando tenemos las iDCs cuando se expresa en porcentaje más alto con un 72,7% bajando hasta un 29,85 tras la estimulación con LPS.

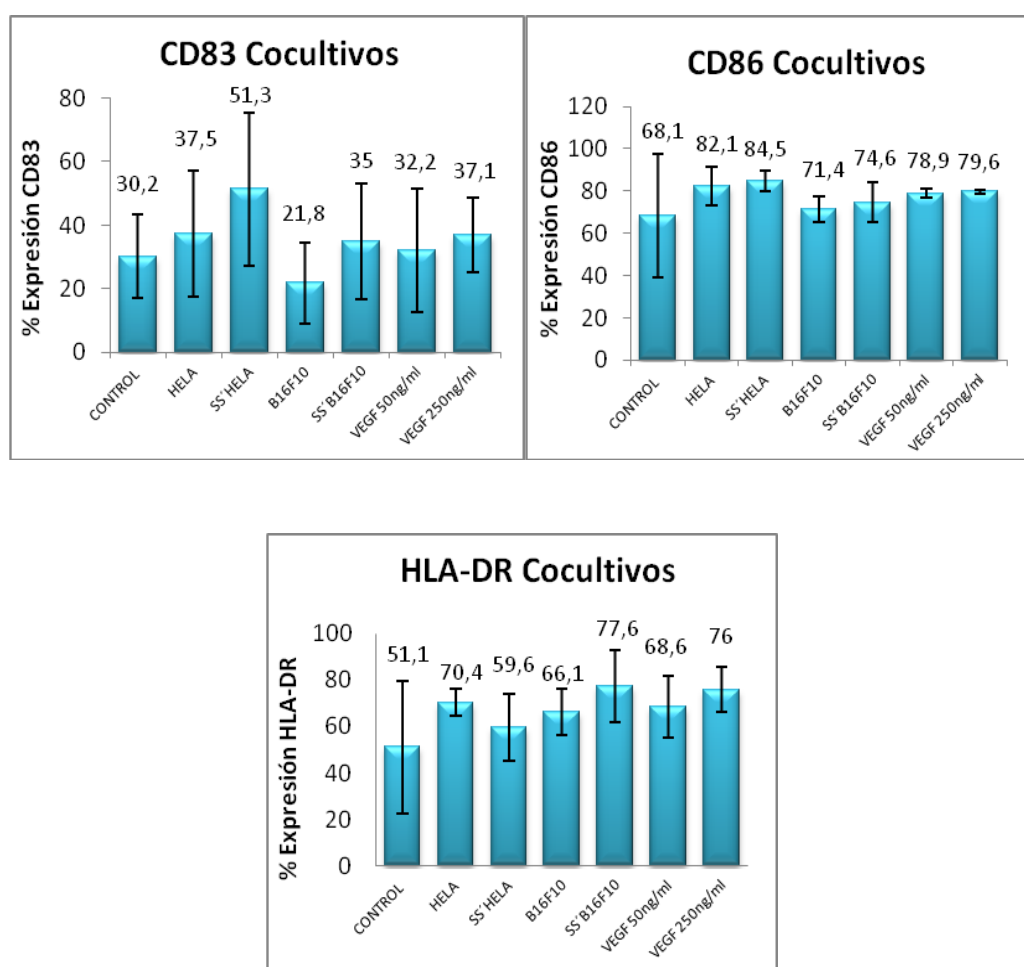


## 4.2. COCULTIVOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

### 4.2.1. Expresión de marcadores característicos de células dendríticas.

Se midieron a día 14 de cultivo los marcadores característicos de las células dendríticas maduras CD83, CD86 y HLA-DR, y se observó que todos aumentan respecto al control. La expresión más alta de CD83, con el 51,3% se da cuando las DCs

han sido adicionadas con sobrenadante de HeLa, sin embargo con el resto de estímulos tumorales y con VEGF la expresión es menor, alrededor del 30%. Con respecto a CD86, se expresan niveles elevados en todos los puntos alcanzando hasta un 84,5 % con SS´ de HeLa y el resto de puntos dan niveles superiores al control, que expresa un 68,1%. En el caso de HLA-DR también se observan niveles altos, en este caso con el SS´de B16F10 y 250ng/ml de VEGF que dan respectivamente unos valores de expresión de 77,6% y 76%. Esto viene a decir que en presencia de estímulos tumorales y de factores proangiogénicos las DCs mantienen su fenotipo de DCs maduras.

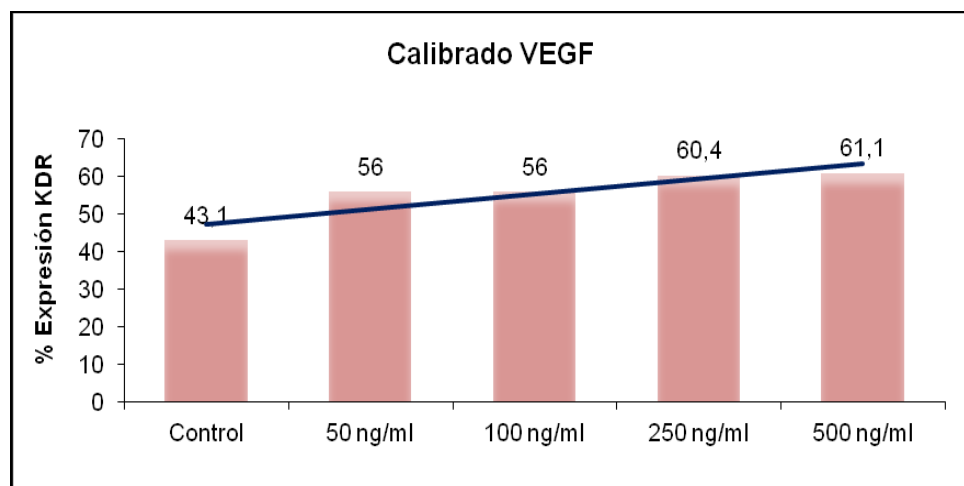


#### 4.2.2. Expresión de marcadores característicos de células endoteliales.

##### 4.2.2.1. Calibrado VEGF.

Realizamos una recta de calibrado de VEGF para evitar tener que poner todos los puntos en cada experimento que realicemos. Se comprobó midiendo por citometría de flujo la expresión de su receptor VEGFR-2 o KDR a cada concentración añadida de

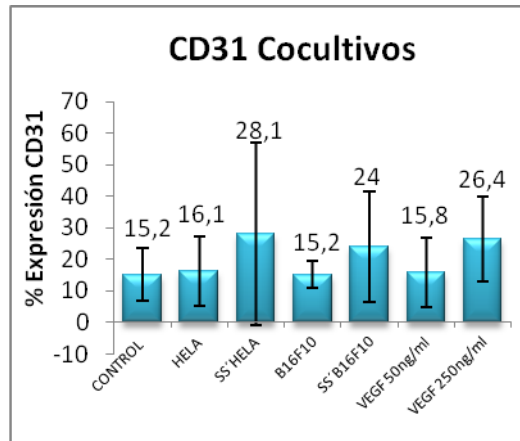
VEGF. El control negativo fueron DCs en cultivo sin adicionar nada y en este punto se ve una expresión de VEGF moderada de un 43,1%, aumentando hasta un 56% de expresión con 50 y 100 ng/ml, indistintamente, y sube un poco por encima de 60 cuando aumentamos las concentraciones hasta 250 y 500 ng/ml. Según estos datos, tomamos la decisión de, en los posteriores experimentos, utilizar únicamente los puntos de 50 y 250 ng/ml. La adición de VEGF hace a las DCs aumentar la expresión de su receptor en la membrana.



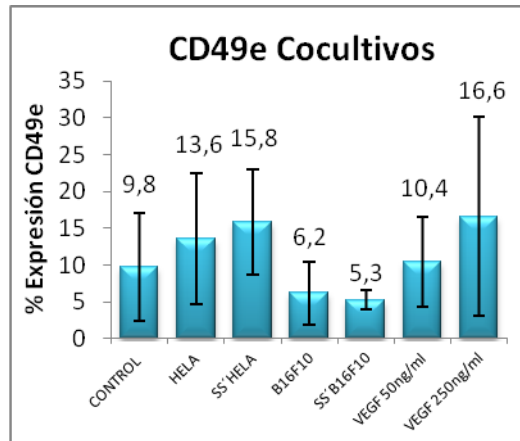
#### 4.2.2.2. Marcadores fenotípicos.

Para ver la posible diferenciación de las células dendríticas en células endoteliales en presencia de células tumorales, los factores secretados por estas y VEGF a 50 y 250 ng/ml medimos por citometría de flujo los marcadores característicos de estas últimas como son: CD31, CD54, CD105, CD106, CD144, CD146, CD49e Y KDR (VEGFR2).

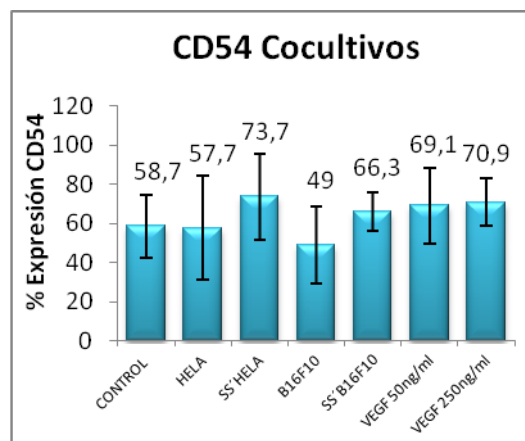
4.2.2.2.1. **CD31** o PECAMI es una proteína transmembrana de tipo I de la familia de las inmunoglobulinas que desempeña un papel importante en las interacciones adhesivas entre células endoteliales y entre estas y leucocitos. El control muestra una leve expresión, 15,2%, que se mantiene cuando añadimos las células tumorales, tanto HeLa como B16F10 y sube hasta un 28,1% con el SS HeLa aunque no son homogéneos los valores y con VEGF a 250 ng/ml ligeramente inferior. Por tanto, el fenotipo parece diferenciar hacia la célula endotelial.



4.2.2.2.2. **CD49e** expresa los niveles más altos con los mismos estímulos tumorales que CD31, con SS' B16F10 15,8 y alcanza un 16,6% con 250 ng/ml de VEGF. Esto es casi un 10% con respecto al control.

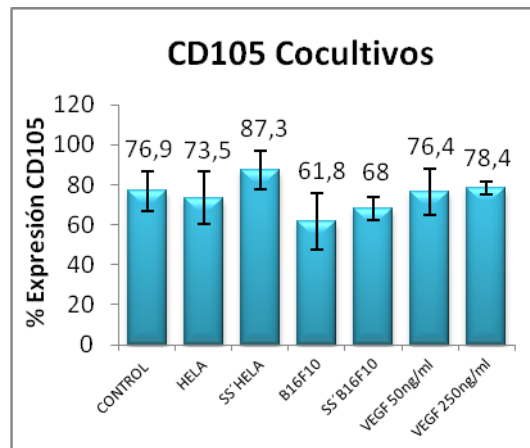


4.2.2.2.3. **CD54** disminuye su expresión ligeramente con ambas líneas tumorales y aumenta tanto con los SS' como con ambas concentraciones de VEGF. Alcanza el nivel más alto, 73,7 %, con el SS' de HeLa, nuevamente. Son porcentajes altos de expresión respecto al control.

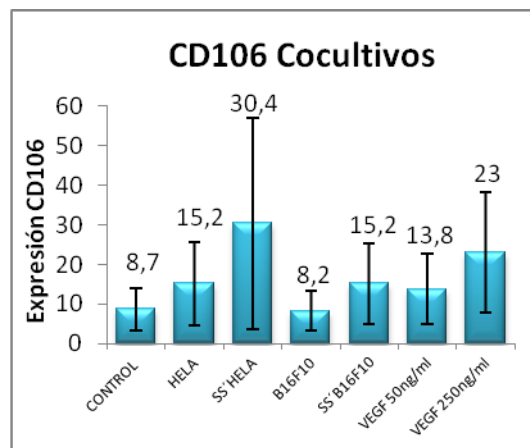




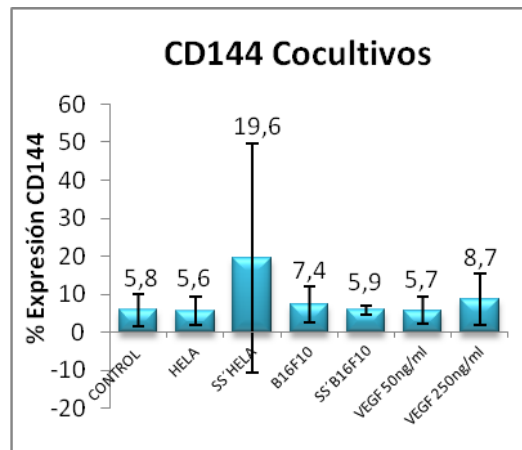
4.2.2.2.4. **CD105** o endoglina constituye un potente marcador de la neovascularización asociada a tumores (garcia del pozo-2008). Se expresa en niveles altos en todos los puntos, incluido el control, alcanzando un 87,3% con el SS HeLa. El nivel más bajo se da en las que han sido cultivadas con B16F10, 61,8%.



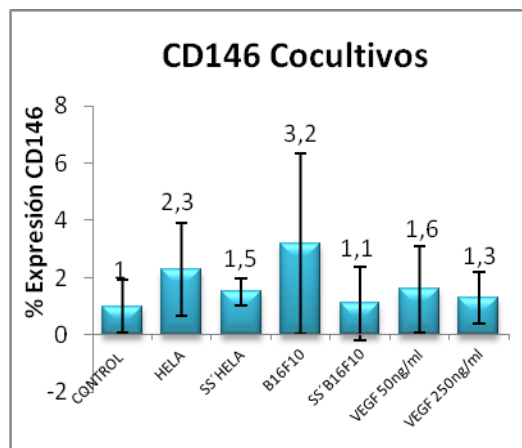
4.2.2.2.5. **CD106** es V-CAM se expresa en niveles bajos en todos los puntos, alrededor de un 10-15%, siendo el valor máximo de 30,4% cuando las DCs han sido cultivadas con SS HeLa, pero lo hace con una amplia variación entre los datos. Se necesitarían mas estudios tanto en citómetro como por *Western blott* para descartar que esté involucrado en el proceso de endotelización.



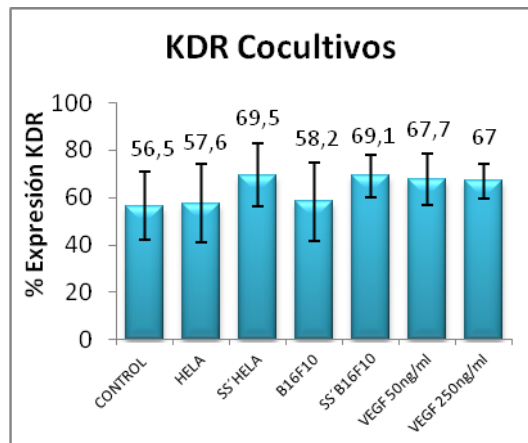
4.2.2.2.6. **CD144** o VE-Caderina no llega a un 10% de expresión en ningún punto experimental excepto en el punto del SS HeLa que sube hasta un 19,6% pero con una gran variación en los diferentes experimentos. Se necesitarían mas estudios tanto en citómetro como por *Western blott* para descartar que esté involucrado en el proceso de endotelización.



4.2.2.2.7. **CD146** o sialomucina da niveles de expresión muy bajos, se necesitarían mas estudios tanto en citómetro como por *Western blott* para descartar que esté involucrado en el proceso de endotelización.



4.2.2.2.8. **KDR o VEGFR2** es el receptor del factor de crecimiento endotelial (VEGF). Da valores de alrededor de un 50% en el control y se eleva tanto como con ambos SS' como con ambas concentraciones de VEGF, pero es mayor su expresión con los SS', un 69%.



En resumen, como ya se ha mencionado en la introducción, las DCs en su proceso de endotelización, expresan algunos marcadores de células endoteliales con altos porcentajes, y siguen manteniendo otros marcadores de CDs maduras e inmaduras como son HLA-DR, CD86 y en menos medida CD83. Tenemos por tanto unas células con fenotipo mixto. Otros marcadores que se expresan en niveles más bajos, algunos incluso pueden considerarse negativos, deben ser estudiados de nuevo y mediante otras técnicas para descartar con rotundidad su presencia en este proceso. Un marcador a tener en cuenta es el vWF, pero que debido a problemas con las casas comerciales, no lo hemos podido incluir como anticuerpo de citometría y habrá que realizar su determinación mediante western blott.

### 4.3. EXPERIMENTACIÓN IN VIVO

#### 4.3.1. ANATOMÍA PATOLÓGICA

##### 4.3.1.1. Tinción de Perls

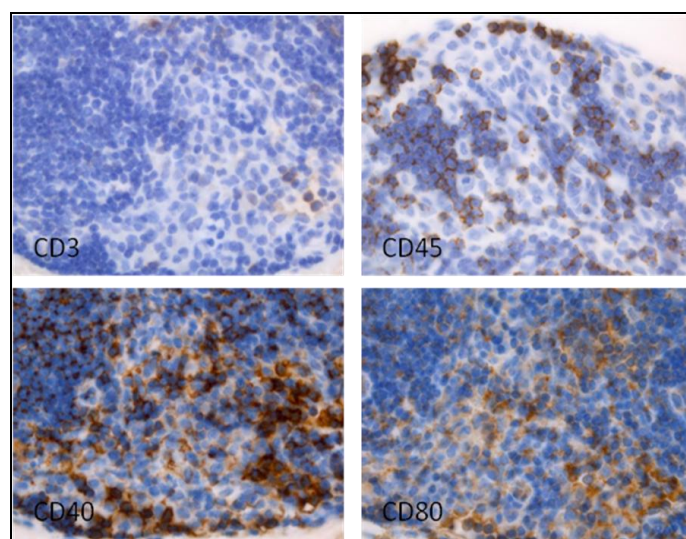
En este apartado no se pueden incluir resultados, ya que la cubierta de carbono de las NPM utilizadas en este proyecto, resulta una coraza para las mismas impidiendo la detección del hierro.

##### 4.3.1.2. Inmunohistoquímica

Se hizo sobre los nódulos linfoides de animales tratados y animales control. Los resultados fueron similares entre todos los animales del grupo tratado y similares entre los del grupo control.

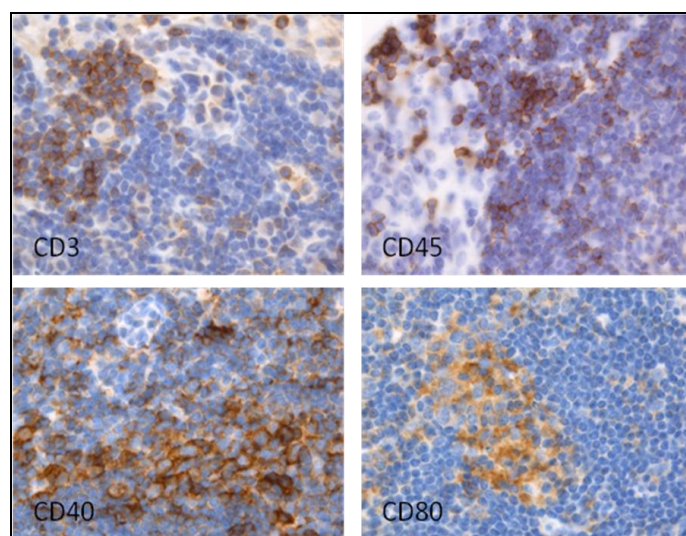
Animal tratado. Nódulo linfoide contralateral: se observan células vesiculosas morfológicamente compatibles con serie monocítica. Las áreas de tinción CD40, CD80

positivas y CD3 negativas (salvo escasas células dispersas). No se observa inmunotinción frente a CD11c ni CD86 (marcadores de DCs mieloides).



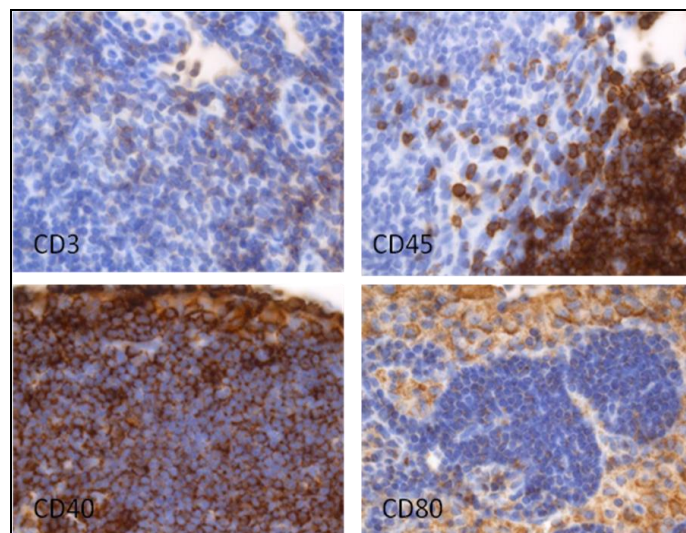
Imágenes con objetivo 60x de inmunohistoquímica frente a CD3, CD45, CD40 Y CD80 en nódulo linfoide contralateral del grupo tratado.

Animal tratado. Nódulo linfoide ipsilateral: Estaban incrementados de tamaño. Se observan mayor proporción de células vesiculosas morfológicamente compatibles con serie monocítica. Áreas de tinción CD40 numerosas, escasas CD80 positivas y áreas CD3 negativas (salvo escasas células dispersas). No se observa inmunotinción frente a CD11c ni CD86



Imágenes con objetivo 60x de inmunohistoquímica frente a CD3, CD45, CD40 Y CD80 en nódulo linfoide ipsilateral del grupo tratado.

Animal control: Nódulo linfoide de tamaño equivalente a los nódulos contralaterales en los animales tratados. Se observa menor número de células CD3 positivas que en animales tratados sobre todo con respecto a su nódulo ipsilateral. CD40 y CD80 ligeramente incrementados respecto a animales tratados. No se observa inmunotinción frente a CD11c ni CD86



Imágenes con objetivo 60x de inmunohistoquímica frente a CD3, CD45, CD40 Y CD80 del grupo control.

## 5. CONCLUSIONES

En este estudio se han realizado diferentes experimentos cuyo nexo común es el papel de las células dendríticas (DCs) en el cancer. Es tan importante conseguir unas condiciones óptimas de cultivo celular para posibles técnicas de inmunoterapia con DCs autólogas de paciente oncológico, como ver *in vivo* la biodistribución de esas DCs cargadas con nanopartículas magnéticas y su implicación en la lucha contra el tumor y en la angiogénesis tumoral.

Con este propósito se realizaron varios cultivos donde se vio que las DCs presentan mayor expresión de los marcadores característicos de su estado maduro (CD86, HLA-DR) cuando se las estimula con LPS en lugar de con CQ (cóctel de citoquinas).

La diferenciación de DCs a *endotelial-like cells* en presencia de factores tumorales parece afectar no solo a las DCs inmaduras impidiendo su maduración y evitando la presentación antigénica a las células efectoras del sistema inmune como se puede leer en la bibliografía si no que también, una vez que la DC está madura, le hace cambiar hacia un fenotipo mixto manteniendo marcadores de DC madura (HLA-DR y CD86) e incrementando la expresión de marcadores característicos de células endoteliales como CD54, CD31, CD105 y VEGFR-2 (KDR) implicándolas en la angiogénesis.

La diferenciación hacia célula endotelial parece estar más acentuada cuando las células dendríticas están en contacto con el sobrenadante acelular de las células tumorales en comparación con el cocultivo célula dendrítica:célula tumoral. Esto puede significar que las células dendríticas frenen de alguna manera la liberación de factores tumorales por parte de las células cancerosas y que además, no hace falta que estén en estrecho contacto con la célula dendrítica para estimular su diferenciación sino que es suficiente con la presencia de factores solubles secretados por el tumor.

A la vista de estos resultados de la experimentación *in vivo* que han salido negativos cabría proponer varias alternativas al estudio:

- Por un lado utilizar otro tipo de NPM que no posean la cubierta de carbono, sino que puedan estar bloqueadas para evitar agregación y respuesta frente al

sistema inmune con otro tipo de proteínas como podrían ser diversos azúcares o polietilenglicoles (PEG). De este modo conseguiríamos evadir la acción del sistema inmune en el modelo de experimentación *in vivo*.

- Realizar una determinación de hierro en las muestras de tejido tras una disgregación del mismo hasta obtener una suspensión celular limpia en la que se pueda realizar una medida magnética en MINISPEC.

- Por otro lado podríamos ampliar el estudio inmunohistoquímico a la detección de determinados receptores de quimiocinas típicos de mDC migratorias como son CCR7 and CXCR5.

## BIBLIOGRAFÍA

- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2: 675- 680.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767- 811. Review.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54(5): 631-651.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407 (6801): 249- 257.
- Choi J, Enis DR, Koh KP, Shiao SL, Pober JS. T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 683- 709.
- Conejero-García, Benencia F, Courreges MC, Kang E, Mohamed-Hadley A, Buckanovich RJ et al. Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of VEGF A. *Nat Med* 2004; 10: 950-958.
- Conejo-García JR, Buckanovich RJ, Benencia F, Courreges MC, Rubien SC, Carrol RG et al. Vascular leukocytes contribute to tumor vascularization. *Blood* 2005; 105: 679- 681.
- Coukos G, Benencia F, Buckanovich RJ, Conejo-García JR. The role of dendritic cells precursors in tumor vasculogenesis. *Br J Cancer*. 2005; 92: 1182-1187. (2)
- Cuellar A, Cifuentes C, Gómez A, Gonzalez JM. Biología de las células dendríticas humanas. *Universitas Scientarum* 2004; 9(1): 5-12.
- Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 193(2): 233-238.
- Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM, Lindermann K, Weidner N, Zuzarte ML et al. Endothelial like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation* 2000; 65: 287-300.



Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9, 669- 676.

Folkman J. *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston*. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995b; 333: 1757- 1763.

Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadal S et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 1096-1103.

Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000; 100(5). 587- 597.

Geissman F, Dieu- Nosjean MC, Dezutter C, Valladeau J, Kayal S, Leborgne M, Brousse N, Saeland S, Davoust J. Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *J Exp Med* 2002; 196 (4): 417-430.

Goya GF, Marcos-Campos I, Fernández-Pacheco R, Sáez B, Godino J, Asín L, Lambea J, Tabuenca P, Mayordomo JI, Larrad L, Ibarra MR, Tres A. Dendritic cell uptake of iron-based magnetic nanoparticles. *Cell Biol Int* 2008; 32(8): 1001-1005.

Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley R, Schatteman GC. CD34-blood-derived human endothelial cells progenitors. *Stem Cells* 2001; 19: 304-312.

Hauss P, Selz F, Cavazzana-Calvo M, Fisher A. Characteristics of antigen- independent and antigen-dependent interaction of dendritic cells with CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2285-2294.

Huarte E, Cubillos-Ruiz JR, Nesbeth YC, Scarlett UK, Martinez DG, Buckanovich RJ et al. Depletion of dendritic cells delays ovarian cancer progression by boosting antitumor immunity. *Cancer Res.* 2008; 68: 7684-7691.

Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 1993; 178: 479- 488.

Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyana S, Reis e Sousa C, Germain RN, Mellman I, Steinman RM. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* 2000; 191: 927- 936.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197- 216.

Kepsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003; 3 (12): 984-993.

Kularatne BY, Lorigan P, Browne S, Suvarna SK, Smith MO, Lawry J. Monitoring tumour cells in the peripheral blood of small cell lung cancer patients. *Cytometry* 2002; 50(3): 160-167.

Kumar V, Abbas A K, Fausto N, Robbins SL, Cotran. Robbins and Cotran pathologic basis of disease, 7th ed. / [edited by] Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Nelson Fausto; with illustrations by James A. Perkins. Edition. 2005 Elsevier Saunders, Philadelphia, Pa; [London], xv, 1525 p. pp.

Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. *J immunol* 1995; 154(10). 5071- 5079.

Manz MG, Traver D, Akashi K, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL. Dendritic cell development from common myeloid progenitors. *Ann NY Acad Sci* 2001; 938: 167-173; discussion 173-174.

O'Garra. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cells subsets. *Immunity* 1998; 8: 275-283.

Poole CP. Introduction to Nanotechnology ed. 2003. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.

Reis e Sousa C. Activation of Dendritic cells: translate innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2004; 16 (1): 21-25.

Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283 (5405): 1183- 1186.

Rumpold H, Wolf D, Koeck R, Gunsilius E. Endothelial progenitor cells: A source for therapeutic vasculogenesis? *J Cell Mol Med*. 2004; 8: 509-518. (1)

Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 1999; 162 (5): 2472- 2475.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming and chronic inflammation. *J Exp Med* 1999; 189(4): 611- 614.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expresión. *Immunol Rev* 2000; 177: 134-140.

Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtype. *Nat Rev Immunol* 2002; 2 (3): 151-161.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel type in Peripherals lymphoid organs mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137: 1142-1162.

Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 271- 296.