

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOTECNOLÓGICAS “DR. R. UGALDE”

**“Participación de Galectina-8 en la inducción
de la respuesta inmune”**

Lic. Julieta Carabelli

Tesis para optar por el título de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología de la
Universidad Nacional de San Martín.

Director: Dr. Oscar Campetella
Co-director: Dra. María Virginia Tribulatti

2016

A mi familia

Agradecimientos

Y ahora la parte más leída de la Tesis...

Gracias, muchas gracias:

A Oscar, por permitirme ser parte de su laboratorio, guiarme y darme la libertad y las herramientas para trabajar.

A Vir, por su compañía constante tanto en lo laboral como en lo personal, su guía, sus consejos y chistes; y por sobre todo su inmensa paciencia.

A mis compañeros/amigos de laboratorio por formar un hermoso grupo día a día. ¡Fue más fácil con sus chistes y ayuda!

A Susana, por sus consejos y cuidados.

A las chicas, las compañeras de becarios, de pasillos, de mates y de charlas.

A Mirna, Ernest, Fabio, Leo, Gaby, Dai y todos los que hacen día a día este instituto.

A ANPCyT y Conicet.

A todos mis amigos que me acompañaron en esta etapa.

A mi familia la de sangre y la que me dio la vida.

A mi mamá por querer siempre lo mejor para mí.

A mi papá por el apoyo, el empuje y la garra, y por todo lo que me enseñó.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
ABREVIATURAS	10
INTRODUCCIÓN.....	12
1- Generalidades	13
2- Glicobiología del sistema inmune	13
3- Galectinas	14
3.1- Clasificación.....	15
3.2- Mecanismos de acción.....	16
3.3- Expresión y localización.....	16
3.4- Galectina-1	17
3.5- Galectina-8	18
3.5.1- Galectina-8 y adhesión celular.....	19
3.5.2- Galectina-8 en la inmunidad innata	20
3.5.3- Galectina-8 en la inmunidad adaptativa.....	21
3.5.4 Galectina-8 en plaquetas y endotelio	22
3- Células dendríticas.....	24
3.1- Células dendríticas y galectinas	25
Antecedentes y objetivos	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
1- Ratones.....	29
1.1- Genotipificación ratones <i>Lgals8^{-/-}</i>	29
2- Expresión de proteínas recombinantes	30
2.1 Inducción y preparación del extracto crudo	30
2.2 Purificación por Cromatografía de afinidad a lactosil-Sepharosa	30
2.3 Purificación por Cromatografía de afinidad a metales	31
2.4 Diálisis	31
2.5 Cuantificación de proteínas.....	32
2.6 Determinación de endotoxinas	32
2.7 Ensayo de hemoaglutinación.....	32
3- Purificación de esplenocitos de ratón	32
4- Purificación de células T CD4⁺	33
5- Diferenciación de células dendríticas a partir de médula ósea	33
6- Purificación de células dendríticas de bazo	33
7- Ensayo de co-estimulación	34
8- Inhibidores.....	35
9- Ensayo de proliferación.....	35
10- Ensayo de inhibición de la proliferación.....	35
11- Ensayo de co-estimulación <i>in vivo</i>	36
12- Virus de Aftosa (VFA).....	36
13- Formulación del antígeno e inmunización de ratones	36
14- Determinación de anticuerpos anti-VFA.....	37
15- Desafío viral	38
16- Marcación de moléculas coestimuladoras en células dendríticas.....	38
17- Microscopía de células dendríticas	39
18- Ensayo funcional de células dendríticas derivadas de médula ósea	39
19- Array de citoquinas.....	39

20- Determinación de citoquinas por ELISA.....	40
21- Obtención de anticuerpos específicos para Gal-8	41
22- Análisis de Gal-8 endógena por <i>Western blot</i>	41
23- Análisis de Gal-8 endógena por citometría de flujo.....	42
24- Análisis estadístico	42
RESULTADOS	43
1- Interacción entre las Galectinas -8 y -1 en la respuesta celular T.....	44
1.1- Caracterización de los efectos inducidos por las Galectinas -8 y -1 sobre la respuesta celular T.....	44
1.2- Participación de Gal-8 y Gal-1 en la inducción de la respuesta inmune.....	52
2- Validación del efecto inmunoestimulador de Galectina-8 usando un modelo experimental de vacuna contra el virus de la fiebre aftosa (VFA)	54
2.1 Galectina-8 (pero no Galectina-1) estimula la respuesta inmune específica contra VFA	55
2.2- La co-administración de Gal-8 y antígeno aumenta la protección contra el desafío viral ...	57
3- Efecto de Gal-8 en células dendríticas derivadas de médula ósea	63
4- Estudio de galectina-8 endógena en células dendríticas.....	75
DISCUSIÓN	81
Perspectivas futuras	93
REFERENCIAS	94

RESUMEN

Al presente se ha acumulado evidencia suficiente como para posicionar las galectinas (Gals) dentro de los principales mediadores de la respuesta inmune innata y adaptativa. Por lo tanto, resulta crucial entender cómo las Gals participan en el control de la homeostasis celular del sistema inmune y los mecanismos subyacentes. En la presente Tesis, describimos por primera vez un efecto activador de Gal-1 sobre células T *naïve*, lo cual queda demostrado por la inducción de co-estimulación y proliferación, esta última inducida en forma de quimera Gal-1-8-1. El bloqueo de las vías de señalización establecidas del TCR inhibió la co-estimulación inducida tanto por Gal-1 como Gal-8, lo cual indica que en realidad estas Gals actúan potenciando las señales débiles de respuestas *bordeline* del TCR. A pesar de que las células T CD4 constituyen las células blanco del efecto co-estimulador, tanto Gal-1 como Gal-8 tienen que unirse a las CPA y a las células T CD4 de manera simultánea en presencia del antígeno en el modelo de co-estimulación. El hecho de que Gal-1 y Gal-8 estimulen las células T en reposo, pero que ejerzan un efecto anti-proliferativo luego de que éstas se activan, propone un rol dual para estas lectinas: por un lado aumentando las respuestas inmunes normales o fisiológicas; y por otro, restringiendo la fase efectora de las respuestas en curso o exacerbadas. Cuando estudiamos la participación de ambas Gals en el inicio de la respuesta inmune *in vivo*, observamos que una única dosis de Gal-1 o Gal-8, administrada junto con una dosis subóptima de antígeno, fue suficiente para aumentar la respuesta celular T. Además, la administración de Gal-8 en conjunto con el virus de aftosa inactivo (VFA), aumentó la respuesta humoral y de neutralizantes, lo cual se tradujo en un aumento en el porcentaje de protección. En el caso de la inmunización usando Gal-1, no se observaron diferencias en el título de anticuerpos específicos. Por otro lado, encontramos que la respuesta humoral específica contra VFAi inducida por Gal-8 se encontraba acompañada por un aumento en la respuesta celular temprana. En conjunto, nuestros hallazgos demuestran que una única dosis de antígeno VFAi formulado con Gal-8 desata una respuesta inmune efectiva que protege contra el desafío con virus homólogo,

lo cual permite postular esta Gal como potencial adyuvante en algunas preparaciones vacunales. En esta Tesis, describimos por primera vez un efecto activador de Gal-8 sobre células dendríticas (CD), evidenciado por un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras, una mayor capacidad de presentación antigénica, el desarrollo de un fenotipo típico de una CD madura, y una fuerte producción de IL-6. Con respecto a las CD, observamos que éstas también expresan mayor cantidad de Gal-8 luego de su activación. Más aún, las CD provenientes de ratones KO Gal-8^{-/-} expresan menores niveles de CD86 luego de la activación, y además, son menos eficientes a la hora de estimular la proliferación de linfocitos T. En conjunto, el aumento en la expresión de Gal-8, puede constituir un mecanismo endógeno para amplificar el inicio de la respuesta inmune en el sitio de inflamación.

Palabras claves: Galectina-8; células dendríticas; respuesta T

ABSTRACT

Nowadays it has been accumulated enough evidence as to position Galectins (Gals) among the major mediators of the innate and adaptive immune responses. Therefore, it is crucial to understand how Gals are involved in the homeostasis of the immune system and the underlying mechanisms. Along this Thesis we describe, for the first time, an activating effect of Gal-1 on T naïve cells, which is demonstrated by the induction of co-stimulation and proliferation effects, being the latter one induced with chimera Gal-1-8-1. Blocking established pathways of TCR signaling inhibited co-stimulation induced by both Gal-1 and Gal-8, indicating that in fact these Gals act by enhancing weak signals of borderline TCR responses. Although the target T of the co-stimulatory effect are CD4 cells, both Gal-1 and Gal-8 have to join APCs and T CD4 simultaneously in the presence of antigen in the co-stimulation model. The fact that Gal-1 and Gal-8 stimulate resting T cells, but exert an anti-proliferative effect after they are activated, proposes a dual role for these lectins: first stimulating the elicitation of immune responses under physiological conditions; and secondly, restricting ongoing or exacerbated effector responses. When we studied the participation of both Gals in eliciting the immune response *in vivo*, we found that a single dose of Gal-1 or Gal-8 administered together with a suboptimal dose of antigen, was sufficient to increase the T cell response. Administration of Gal-8 together with inactive foot and mouth disease virus (FMDV), increased the humoral/neutralizing response, which resulted in the increase of the protection percentage. No difference in the specific antibody titer was observed when Gal-1 was used in the immunization procedure. Furthermore, we found that the specific humoral response against FMDV induced by Gal-8 was accompanied by an increase in the early cellular response. Together, our findings demonstrate that a single dose of antigen formulated with Gal-8 triggers an effective immune response that protects against the challenge with homologous virus, which allows us to propose this Gal as potential adjuvant use in some vaccine preparations. In this Thesis, we describe for the first time an activating effect of Gal-8 on dendritic cells (CD), evidenced by the increased expression of costimulatory molecules, a greater capacity for

antigen presentation, development of a phenotype typical of a mature CD, and a strong IL-6 production. Regarding CD, we note an increased expression of Gal-8 after activation. Furthermore, CD taken from Gal-8 KO mice express lower levels of CD86 after activation, and were also less efficient to stimulate T cell proliferation. Finally, the increased expression of Gal-8, may constitute an endogenous mechanism to amplify the elicitation of the immune response at the inflammation site.

ABREVIATURAS

aa aminoácido

ADN ácido deoxiribonucleico

Ady Adyuvante

ARN ácido ribonucleico

BSA seroálbamina bovina

CD célula dendrítica

CDi Célula dendrítica inmadura

CDm Célula dendrítica madura

Con-A concanavalina A

CPA Células presentadoras de antígeno

cpm cuentas por minuto

DO densidad óptica

DO11.10TCR_{OVA} modelo murino DO11.10 transgénico para el TCR_{OVA}

dpi días post-inmunización

DRC Dominio de reconocimiento a carbohidratos

FITC isotiocianato de fluoresceína

Gal-1 Galectina-1

Gal-8 Galectina-8

Gal-8mut Galectina-8 mutada

Gals Galectinas

HRP *horseradish peroxidase*

i.p. intraperitoneal

IFM índice de fluorescencia media

IgG inmunoglobulina G

IMAC *Immobilized Metal Affinity Chromatography*

IP índice de proliferación

IPTG isopropil- β -tiogalactopiranosido

kD kilodalton

LAC lactosa

LPS lipopolisacárido

LP Luria Broth

LT linfocitos T

on overnight (incubación nocturna)

OVA ovoalbúmina

OVA₃₂₃₋₃₃₉ péptido de OVA

PAGE electroforesis en gel de poliacrilamida

PBMCs Células periféricas humanas

PBS Buffer fosfato salino

PE ficoeritrina

PMSF fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PVDF polivinil difluoruro

rpm revoluciones por minuto

SDS dodecil sulfato de sodio

SFB suero fetal bovino

SI Sistema Inmune

TB Terrific Broth

TBS Buffer Tris salino

TCID₅₀ cantidad de virus requerida necesaria para producir un efecto citopático en el 50% de los cultivos inoculados.

TDG tiodilgalactósido

Treg linfocitos T regulatorios

VFA Virus de la fiebre aftosa

VFAi Virus de la fiebre aftosa inactivo

wt wild type

INTRODUCCIÓN

1- Generalidades

El sistema inmune (SI) de mamíferos es un mecanismo de defensas muy complejo, que se encuentra clasificado en innato y adaptativo. El sistema inmune innato está comprendido por las reacciones tempranas e incluye la primera línea de defensa celular contra los microbios. Consta de mecanismos de defensa celulares y bioquímicos que existen desde antes de la infección y que pueden responder con rapidez a ella. Los principales componentes de la inmunidad innata son: barreras físicas y químicas, como el epitelio y las sustancias químicas antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales; células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas y linfocitos citolíticos naturales (NK); proteínas séricas, incluidos miembros del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; y citoquinas, que regulan y coordinan muchas de las actividades de las células. El sistema inmune adaptativo se denomina así debido a que surge como respuesta específica a una infección dada y se adapta a ella. Este sistema se caracteriza por la especificidad frente a moléculas diferentes, y una capacidad de “recordar” y responder de forma más intensa a exposiciones repetidas al mismo patógeno. Los principales componentes son los linfocitos y los anticuerpos. Existen muchas conexiones entre el sistema inmune innato y el adaptativo.

2- Glicobiología del sistema inmune

Hoy en día se sabe que las modificaciones post-traduccionales de las proteínas pueden afectar fuertemente su estructura, función y localización celular. De estas modificaciones, la glicosilación es la que más complejidad puede aportar, impactando en un amplio rango de funciones. Más del 50% de las proteínas se encuentra glicosiladas, estando esta modificación involucrada en aspectos bioquímicos tales como el plegamiento correcto y la estabilidad (Ohtsubo and Marth 2006). Aproximadamente el 10% de los genes humanos codificantes expresan proteínas relacionadas a la síntesis de glicanos. Dada la gran variedad de posibilidades en las cuales los residuos de hidratos de carbono pueden ser ordenados, la glicosilación provee a las células de una enorme diversidad estructural en sus moléculas. En la superficie celular, las diversas formas de glicosilación

que puede sufrir una misma proteína le otorgan a la célula diferentes cualidades que hacen a su función biológica. Estos glicanos juegan un rol vital en el sistema inmune innato y adaptativo; y son cruciales en el tráfico celular, la interacción célula-célula y la regulación y activación de linfocitos T y B (Haslam et al. 2008). Desde los inicios tempranos de los estudios sobre el desarrollo y función del sistema inmune del mamífero, se pudo comprobar que estos eventos se encuentran asociados con la reestructuración de glicanos de la superficie celular, observándose que es alterado durante los distintos estadios de maduración celular, la diferenciación entre las células *naïve* y activadas, en la extravasación leucocitaria, entre otros (Marth and Grewal 2008). Estas funciones son mayormente ejecutadas por lectinas, que reconocen motivos específicos de glicanos. Las lectinas se clasifican en familias según la homología de sus secuencias: las de Tipo C (dependientes de calcio) como por ejemplo las selectinas; las de Tipo I (de la superfamilia de las inmunoglobulinas) como las siglecs y las de Tipo S (dependientes de sulfidrilo) como las galectinas.

3- Galectinas

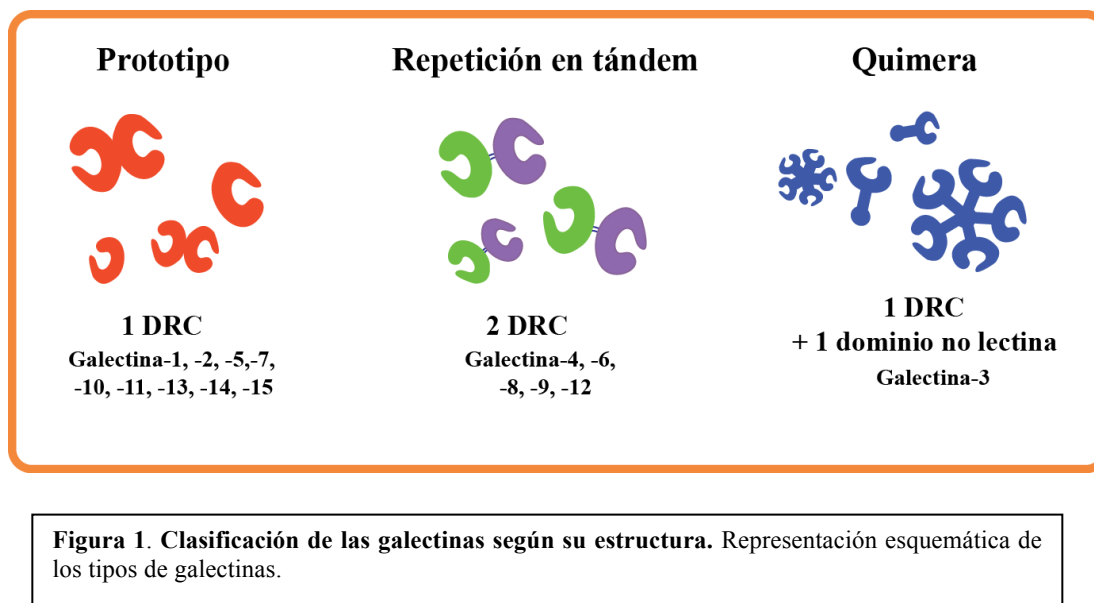
Las lectinas son proteínas con actividad de unión a glicanos originalmente descritas en plantas, pero que posteriormente fueron encontradas en microorganismos y animales incluyendo mamíferos (Marth and Grewal 2008). La glicosilación regulada de sustratos aceptores específicos puede crear o enmascarar ligandos para las lectinas endógenas o exógenas, afectando así las distintas funciones celulares (Rudd et al. 2001). Las lectinas vegetales han sido extensamente utilizadas para estimular la activación de células T, a través del *cross-linking* de varias glicoproteínas de la superficie celular, incluyendo algunas que contribuyen a la sinapsis inmunológica (Dustin and Chan 2000).

Las galectinas (Gals) constituyen una familia de lectinas solubles que se caracterizan por poseer dominios conservados de reconocimiento a carbohidratos (DRC) de alrededor de 130 aminoácidos que reconocen glicanos conteniendo el disacárido *N*-acetil-lactosamina (Galactosa- β (1-4)*N*-acetilglucosamina). En la actualidad, un número creciente de galectinas de mamífero han sido identificadas recibiendo gran atención en su

relación con el sistema inmune (Ilarregui et al. 2005; Bianco et al. 2006; Elola et al. 2007; Toscano et al. 2007b). Las galectinas tienen la capacidad de ligar contra-receptores sobre la superficie celular, lo cual induce modificaciones muy importantes sobre la célula blanco y por extensión sobre el tejido asociado. Entre sus efectos se encuentran la inducción de apoptosis, la activación celular, la secreción de citoquinas, la modulación de la adhesión y migración celular. A pesar de que las galectinas reconocen en principio estructuras glicosídicas similares, distintas galectinas pueden inducir actividades muy diferentes y aún contrapuestas. Es mucho todavía lo que resta para la comprensión de las interacciones entre estas moléculas y sus contra-receptores, muchos de los cuales aún permanecen desconocidos, y de hecho se está re-evaluando la especificidad de la interacción con los azúcares y la relevancia de las interacciones débiles.

3.1- Clasificación

Hasta la fecha se han identificado en mamíferos 15 galectinas, las cuales se clasifican en base a su estructura en tres grupos: **prototipo** (Galectina-1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 y 15), conteniendo un único DRC, **quimera** (siendo su única representante Galectina-3) conteniendo un DRC C-terminal unido a un dominio R N-terminal formado por repeticiones ricas en glicina/prolina y las de **repetición en tándem** (Galectina-4, 6, 8, 9 y 12) que contienen dos DRC homólogos ubicados en tándem en una misma cadena polipeptídica, separados por un péptido “*linker*” (**Figura 1**).



3.2- Mecanismos de acción

Las galectinas monovalentes (un único DRC) pueden formar homodímeros, en tanto que las de repetición en tándem, que son intrínsecamente bivalentes, tienen como particularidad que sus dos DRC pueden reconocer diferentes ligandos sacarídicos. Por último, Galectina-3 tiene la capacidad de formar oligómeros a través de su dominio no lectina cuando se une a carbohidratos multivalentes (**Figura 1**). Dependiendo de su estructura, estas proteínas son capaces de actuar en forma bi- o multivalente, mediando así el entrecruzamiento (*cross-linking*) de glicoconjugados de la superficie celular. Es por esto que las galectinas se encuentran involucradas en los procesos de adhesión celular, transducción de señales y en la formación de redes o *lattices*. Estos *lattices*, consisten en arreglos ordenados termodinámicamente favorables de lectinas endógenas y sacáridos en la superficie celular. Estas estructuras se han relacionado con el control de endocitosis de receptor, interacciones huésped-patógeno y activación y homeostasis de células del SI (Rabinovich et al. 2007).

3.3- Expresión y localización

Algunas galectinas, tales como Galectina-1, 3, 8 y 9, se distribuyen en una amplia variedad de tejidos, mientras que otras tienen una localización más restringida, como es

el caso de Galectina-4 en el intestino, Galectina-7 en la piel y Galectina-12 en adipocitos (Ilarregui et al. 2005). La regulación de la expresión de ciertas galectinas viene dada por el estado de activación/diferenciación de las células, así como también bajo ciertas condiciones patológicas, como es el caso de algunos tumores que las sobre-expresan (Rubinstein et al. 2004). Las galectinas pueden estar presentes fuera o dentro de la célula, y pueden actuar tanto en el espacio extracelular como intracelularmente. Aunque estas lectinas solubles no poseen un péptido señal requerido para la vía de secreción clásica, se ha visto que son efectivamente secretadas al espacio extracelular (Liu et al. 2002; Leffler et al. 2004). Si bien la mayoría de las funciones que han sido comunicadas corresponden a sus efectos a nivel extracelular, existen algunas publicaciones que involucran a las galectinas en varios procesos intracelulares tales como *splicing* de ARN mensajero y regulación y progresión del ciclo celular (Elola et al. 2007); y el rol propuesto para Gal-8 como receptor de peligro que reconoce vesículas dañadas por la infección con *Salmonella* (Thurston et al. 2012).

3.4- Galectina-1

Galectina-1 (Gal-1) pertenece al grupo de galectinas de tipo prototipo, conteniendo un único DRC en su estructura. Es sin duda uno de los miembros más estudiados dentro de la familia de galectinas, al cual se le ha propuesto un rol preponderante en la regulación negativa de la respuesta inmune (Ilarregui et al. 2005; Toscano et al. 2007b).

La distribución de Gal-1 en el sistema inmune indica su función reguladora: es expresada por células epiteliales de timo donde induce la apoptosis de las subpoblaciones tímicas $CD4^-CD8^-$ y $CD4^+CD8^+$ (Baum et al. 1995; Perillo et al. 1997). Además, Gal-1 es secretada por linfocitos T y B activados (Blaser et al. 1998; Zuñiga et al. 2001), macrófagos activados (Rabinovich et al. 1998) y linfocitos Treg $CD4^+CD25^+$ (Garín et al. 2007) sugiriendo un mecanismo de control de la activación celular.

Existen numerosos reportes indicando que Gal-1 induce la inhibición del crecimiento celular y promueve la apoptosis de células T activadas, tanto murinas como humanas (Perillo et al. 1995; Rabinovich et al. 1997; Blaser et al. 1998; Pace et al. 2000;

Rabinovich et al. 2002). Mas aún, suprime la secreción de IL-2, una citoquina pro-inflamatoria (Rabinovich et al. 1999) y favorece la secreción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, lo que contribuye a la expansión de linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺ (van der Leij et al. 2004). Por otro lado, estudios realizados *in vivo* en modelos experimentales de inflamación crónica y autoinmunidad, demostraron la habilidad que tiene Gal-1 para desplazar el balance hacia una respuesta TH2, con niveles reducidos de INF- γ y secreción aumentada de IL-5 e IL-10 (Rabinovich et al. 1999; Santucci et al. 2000; Baum et al. 2003; Santucci et al. 2003).

Gal-1 se une a un conjunto restringido de glicoproteínas de la superficie de células T, incluyendo a CD7, CD43 y CD45. Se ha demostrado que tanto CD7 como CD43 son requeridos para la muerte celular inducida por Gal-1 (Pace et al. 1999; Walzel et al. 1999; Pace et al. 2000; Nguyen et al. 2001; Hernandez et al. 2006). Por otro lado, se ha demostrado que la participación de CD45 en los efectos mediados por Gal-1 sobre las células T es dependiente de su estado de glicosilación diferencial. La enzima core2- β (1,6)*N*-acetilglucosaminiltransferasa (C2GnT), que agrega oligosacáridos a *O*-glicanos de CD45, sensibiliza a las células a la muerte inducida por Gal-1 (Galvan et al. 2000; Nguyen et al. 2001). Sin embargo, existen otras glicosiltransferasas que regulan negativamente la muerte inducida por Gal-1 mediante el agregado de residuos de ácido siálico en las posiciones α (2,6) de *N*-glicanos del CD45 (Amano et al. 2003). Mas aún, se ha observado que esta glicosilación diferencial regula la sobrevivencia de células T efectoras TH1, TH2 y TH17. Por este mecanismo, Gal-1 induce la muerte de las células T efectoras TH1 y TH17, que presentan core2 *O*-glicanos, pero no de las células TH2, las cuales poseen sus *N*-glicanos sialidados en las posiciones α (2,6) impidiendo la unión de Gal-1 (Toscano et al. 2007a).

3.5- Galectina-8

Galectina-8 (Gal-8) pertenece al grupo de galectinas del tipo de repetición en tándem, las cuales contienen dos DRC distintos de aproximadamente 140 aa, ubicados en tándem en una misma cadena polipeptídica y unidos por un péptido *linker*. Esta región

linker posee una longitud variable (24-74 aa), lo que define las diferentes isoformas en ratón, rata y humano (Bidon et al. 2001a; Bidon et al. 2001b; Tribulatti et al. 2007). A diferencia de otras galectinas con expresión más restringida, Gal-8 se encuentra ampliamente distribuida en diversos tejidos normales (hígado, corazón, pulmón, músculo, timo, bazo y sistema nervioso), tumorales y líquido sinovial inflamado (Eshkar Sebban et al. 2007; Tribulatti et al. 2007; Satelli et al. 2008; Tribulatti et al. 2009; Elola et al. 2014). Además, se comunicó su expresión en endotelio y su liberación al medio en casos de daño tisular (Thijssen et al. 2008; Cattaneo et al. 2014), lo cual expande su rango de acción a todo el organismo. En humanos, está codificada por el gen *LGALS8*, y pueden generarse hasta 7 mensajeros diferentes por *splicing* alternativo. Tres de ellos presentan estructura en tándem, el resto codifican para polipéptidos con un único DRC, aunque estos últimos no fueron detectados a nivel proteico (Bidon et al. 2001b; Bidon-Wagner and Le Pennec 2004; Ahmed et al. 2007). Las tres isoformas difieren en la longitud del péptido *linker* (resultado del *splicing* alternativo del exón VIII), y se las denomina: *small* (S), *medium* (M) o *long* (L). En ratón, se han identificado hasta el momento dos isoformas: Gal-8S y Gal-8L. Esta última presenta 9 aa adicionales en el péptido *linker*, como resultado del *splicing* alternativo del exón IV (Tribulatti et al. 2007).

3.5.1- Galectina-8 y adhesión celular

Gal-8 regula positiva o negativamente la adhesión celular dependiendo del contexto extracelular (Zick et al. 2004). Cuando Gal-8 se encuentra inmovilizada a la matriz, actúa como una proteína de la matriz extracelular (igual de potente que fibronectina) en promover la adhesión, extensión y migración celular (Levy et al. 2001). Por el contrario, Gal-8 soluble y en altas concentraciones interactúa con integrinas de la superficie y otras proteínas solubles de la matriz extracelular (como fibronectina) e inhibe la adhesión celular (Zick et al. 2004). Nishi et al., describieron a Gal-8 como un inductor de adhesión en neutrófilos vía la integrina αM . Este efecto lo observan tanto para Gal-8 soluble como inmovilizada, aunque esta última induce la adhesión de neutrófilos en menor medida (Nishi et al. 2003). También se ha descrito que Gal-8 induce la adhesión de células T

Jurkat, principalmente vía la integrina $\alpha 5$. Además, los autores reportan que Gal-8 induce la adhesión de leucocitos de sangre humana periférica a las células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical (HUVEC), y describen la fosforilación de vías de señalización de integrinas. Finalmente concluyen que Gal-8 permite la adhesión celular, uniéndose a receptores de la superficie e induciendo rearrreglos de actina en el citoesqueleto (Yamamoto et al. 2008).

3.5.2- Galectina-8 en la inmunidad innata

Stowell et al., observaron que tanto Gal-8 como Gal-4, que se expresan en el tracto intestinal, reconocen antígenos del grupo B sanguíneo humano expresados en la superficie de bacterias *E. coli*; inhibiendo su motilidad, alterando la morfología de la membrana y provocando la muerte. Estos resultados sugieren un rol crucial para las galectinas en la inmunidad innata, confiriendo protección contra patógenos que presentan epitopes similares a auto-antígenos que el sistema inmune adaptativo no puede reconocer (Stowell et al. 2010).

Por otro lado, Thruston et al., concluyen que Gal-8 es un factor de restricción antibacteriano, ya que observan que esta lectina es reclutada a vesículas que contienen bacterias y actúa como una señal inductora de autofagia. Estos autores describen la capacidad de Gal-8 para detectar vesículas dañadas uniéndose a glicanos expuestos del huésped, lo cual sugiere una habilidad para sensar la invasión de un amplio rango de patógenos (Thurstun et al. 2012).

Como se describió anteriormente, también se ha reportado un efecto activador de Gal-8 en la inflamación, al inducir adhesión de neutrófilos (Nishi et al. 2003). Por otro lado, se ha reportado que Gal-8 se encuentra fuertemente expresada en células del líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea, lo cual sugiere su participación en procesos inflamatorios (Eshkar Sebban et al. 2007).

3.5.3- Galectina-8 en la inmunidad adaptativa

En nuestro laboratorio se ha determinado anteriormente la expresión de dos isoformas (*Long* y *Short*) en timocitos y esplenocitos de ratón, que difieren únicamente en la presencia de una inserción de nueve aminoácidos en la región del péptido *linker* que conecta los dos DRC. Se observó que el agregado de Gal-8 recombinante a cultivos primarios de timocitos resulta en la inducción de apoptosis de la subpoblación CD4^{high}CD8^{high}, efecto mediado por la activación de la vía de las caspasas (Tribulatti et al. 2007). Sin embargo, en linfocitos T periféricos, Gal-8 es capaz de inducir dos actividades biológicas diferentes dependiendo de su concentración: a alta concentración (1-2 μ M) induce una robusta proliferación de células T CD4⁺ *naïve* en ausencia de antígeno, mientras que a baja concentración (0,1- 0,2 μ M) induce una señal co-estimuladora capaz de sinergizar la respuesta al péptido específico de OVA (OVA₃₂₃₋₃₃₉) en ratones DO11.10 transgénicos para un TCR_{OVA} (DO11.10TCR_{OVA}). La proliferación independiente de antígeno inducida por Gal-8 se asoció con un incremento en la expresión de citoquinas tanto pro- como anti-inflamatorias, sugiriendo así una expansión policlonal de los linajes TH1 y TH2. Se identificó a la glicoproteína CD45 como un contra-receptor específico de Gal-8 mediante cromatografía de afinidad y análisis de espectrometría de masa. Y se demostró también que la actividad de fosfatasa asociada al CD45 está directamente involucrada en los efectos proliferativos y co-estimuladores de Gal-8. Otras intermediarios de vías de señalización intracelular activados en presencia de Gal-8 incluyen a ZAP-70 y la MAPquinasa ERK1/2 (Tribulatti et al. 2009).

En el laboratorio también se ha estudiado la base molecular de las funciones de Gal-8. Se demostró que los dominios aislados *N*- y *C*-terminal de Gal-8, ambos conteniendo un único DRC, no son capaces de inducir proliferación de esplenocitos independiente de antígeno. Mas aún, las proteínas quimeras formadas por dos dominios *N*-terminal (N-N) o dos dominios *C*-terminal (C-C) unidos por la región *linker*, son capaces de inducir proliferación de esplenocitos (Cattaneo et al. 2011). Estos resultados confirman que la estructura bivalente de Gal-8 es esencial para disparar la proliferación de células T independiente de antígeno, sugiriendo la formación de un *lattice*. La quimera

C-C fue más eficiente que la Gal-8 nativa y que la quimera N-N en inducir este efecto, sugiriendo que el dominio C-terminal es el responsable mayor de la actividad proliferativa de Gal-8. Por otro lado, se demostró que tanto los dominios aislados de Gal-8 como las proteínas quimeras, son capaces de inducir co-estimulación de la respuesta T antígeno-específica, siendo la quimera C-C la proteína más eficiente de todas en ejercer este efecto. Estos resultados indican que el efecto co-estimulador no es dependiente de la estructura bivalente de Gal-8, lo cual sugiere una interacción agonista y de mayor afinidad, debido a que se evidencia a bajas concentraciones.

A partir de estos resultados, se extendió el estudio de los efectos de Gal-8 a células periféricas humanas (PBMCs). Se observó que Gal-8 humana posee una actividad dual: por un lado induce proliferación de células T CD4⁺ *naïve*, mientras que por otro lado induce muerte de células T pre-activadas con PHA o anti-CD3/anti-CD28. Además, mediante la utilización de proteínas de Gal-8 con sólo uno de sus dominios mutados, *N*- o *C*-DRC, se observó que al igual a lo que ocurre con células de ratón, el *C*-DRC es el dominio efector (Cattaneo et al. 2011).

3.5.4 Galectina-8 en plaquetas y endotelio

Hemos demostrado que las plaquetas humanas expresan Gal-8 y que la exponen en la superficie luego de la activación con trombina (Romaniuk et al. 2010). Gal-8 se une a la integrina GPIb-IX-V para activar varias respuestas plaquetarias tales como agregación, exposición de P-selectina y liberación del contenido de sus gránulos, entre otras. Notablemente, estos efectos fueron logrados por el dominio aislado *N*-terminal de Gal-8, indicando que la estructura bivalente no es necesaria en este caso. Además, se ha demostrado un rol preponderante de las plaquetas en procesos inflamatorios (Boilard et al. 2010). Por ello, estos resultados sugieren que la exposición de Gal-8 podría incentivar la reactividad en el foco inflamatorio.

Recientemente, reportamos que la activación con LPS de las células endoteliales humanas HMEC, induce la secreción de la isoforma Gal-8M. También se observó un aumento en la exposición de Gal-8 en la superficie celular luego de la activación, evento

que probablemente antecede a su secreción al medio extracelular. Cuando pre-tratamos las células HMEC con Gal-8, observamos una mayor adhesión plaquetaria sobre estas células, indicando que Gal-8 las activa. También se observó un incremento en la fosforilación de la subunidad p65 de NFκB y un aumento en la exposición del factor de von Willebrand. Este último es característico de la activación celular, y en parte, puede ser responsable de la adhesión plaquetaria observada. Además, Gal-8 induce la liberación de varias quemoquinas y citoquinas pro-inflamatorias (CCL2, CXCL3, CXCL8, CXCL1, GM-CSF, IL-6 y CCL5) siendo CCL5 la detectada en mayor magnitud. Esta quemoquina se encuentra involucrada en la inflamación crónica vía el reclutamiento de células inflamatorias. En conjunto, estos resultados no sólo confirman el papel pro-inflamatorio que ya hemos propuesto para Gal-8 en otros sistemas celulares, sino también sugieren que esta lectina está orquestando la interacción entre los leucocitos, plaquetas y células endoteliales (Cattaneo et al. 2014).

Por último, generamos una proteína Gal-8 en la cual se sustituyó un residuo canónico de arginina en cada DRC para anular la capacidad de unión a azúcares (Gal-8mut) y así estudiar la relevancia de las interacciones lectina-glicanos. Como era de esperar, Gal-8mut fue incapaz de unirse a lactosil-Sepharosa confirmando que el reconocimiento a la lactosa se encontraba excluido. Sin embargo, esta proteína mutada conservaba la actividad de lectina, evidenciado por su efecto hemoaglutinante y la capacidad de unirse a la superficie celular. En cuanto a la actividad biológica, Gal-8mut fue incapaz de inducir la proliferación de células T, pero co-estimuló de manera eficiente la respuesta T específica de antígeno, tanto *in vitro* como *in vivo* (Schroeder et al. 2016).

En forma conjunta, estos resultados apoyan un rol modulador de Gal-8 en el sistema inmune, ya sea estimulando respuestas a antígeno que están por debajo del límite o *borderline*, incentivando respuestas inflamatorias o bien limitando respuestas ya desencadenadas.

3- Células dendríticas

Las células presentadoras de antígenos (CPA) son poblaciones celulares especializadas en la captura de antígenos microbianos y de otros tipos, que los presentan a los linfocitos y producen señales que estimulan la proliferación y diferenciación de los mismos. Las CPA unen las respuestas del sistema inmune innato con las respuestas del adaptativo. El principal tipo de CPA que participa en la iniciación de las respuestas de linfocitos T es la célula dendrítica (CD). Las CD se encuentran en los órganos linfáticos, en el epitelio de la piel y los sistemas digestivo y respiratorio, y en el intersticio de la mayoría de los órganos parenquimatosos. Estas células se identifican morfológicamente por sus proyecciones membranosas o espiculares. Las CD juegan un papel importante en el inicio y control de la magnitud y calidad de la respuesta inmune adaptativa. Las CD inmaduras (CDi) actúan como sensores inmunológicos que alertan de potenciales riesgos microbianos, ya sea por reconocimiento directo de componentes microbianos o por detección de señales enviadas por el sistema inmune innato. Las CDi decodifican e integran estas señales y transportan la información a células del sistema inmune adaptativo. Así, el tipo de respuesta adaptativa que se monta, depende de la naturaleza del estímulo que recibe la CD. En el estado de reposo, las CD residen tanto en tejidos periféricos como en órganos linfáticos. Además, las CD circulan por la sangre. Para responder a las señales anti-microbianas, las CD atraviesan el proceso de maduración, y sufren una “metamorfosis” desde células que capturan antígenos a células que presentan antígenos (Banchereau et al. 2000; Ueno et al. 2007). Este proceso incluye cambios en la morfología como:

- i- pérdida de estructuras de adhesión, reorganización citoesquelética y adquisición de gran movilidad celular.
- ii- pérdida de la capacidad endocítica/fagocítica.
- iii- secreción de distintas quemoquinas según el tipo de células del sistema inmune con las que van a interactuar.
- iv- incremento de la expresión de moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD86.

- v- translocación a la superficie celular de moléculas MHC-II.
- vi- secreción de citoquinas que polarizan y diferencian a las células efectoras.

3.1- Células dendríticas y galectinas

Existe una extensa bibliografía sobre las distintas Gals y su interacción con las células dendríticas, tanto humanas como murinas. En particular se ha reportado que Gal-1 regula la diferenciación, señalización y migración de las CD. Fulcher et al., observaron que Gal-1 induce maduración en CD humanas derivadas de monocitos, evidenciado por un aumento de moléculas coestimuladoras, secreción de IL-6 y TNF- α , aumento en la respuesta T, capacidad endocítica reducida y aumento en la migración (Fulcher et al. 2006). Luego, los mismos autores, identificaron a CD43 y CD45 como los receptores en CD de Gal-1 (Fulcher et al. 2009). En concordancia con estos resultados, Perone et al., reportaron que la sobre-expresión de Gal-1 en CD conduce a su activación, evidenciado por un fenotipo maduro, aumento en la expresión de mensajeros de citoquinas pro-inflamatorias y capacidad potenciada de estimular células T *naïve* (Perone et al. 2006). Además, estas CD transgénicas promovieron la apoptosis de células T activadas. Por otro lado, Ilarregui et al., observaron que las CD expuestas a Gal-1 durante su diferenciación adquieren una función regulatoria dependiente de IL-27 e IL-10 (Ilarregui et al. 2009). Recientemente, Thiemann et al., reportaron que Gal-1 está expresada en la superficie de células endoteliales linfáticas, y que esto regula la migración diferencial de las CD. La exposición de Gal-1 en la superficie inhibe la migración de CD inmunogénicas pero no de las tolerogénicas (Thiemann et al. 2015).

En cuanto a Gal-9 y su efecto en las CD, Dai et al., reportaron que esta Gal induce la maduración de CD derivadas de monocitos humanos (Dai et al. 2005). Además, Leskela et al., encontraron que la expresión de Gal-9 se encontraba disminuida en CD de sangre periférica de pacientes con la enfermedad de Graves (enfermedad autoinmune de la tiroides), y que su expresión se correlacionaba con el grado de enfermedad (Leskela et al. 2015). Además, Hsu et al., reportaron que Gal-9 se encuentra aumentada en CD

humanas luego de la infección con el virus del Dengue; y que el aumento de esta Gal induce una mayor migración de las CD (Hsu et al. 2015).

En lo que respecta a Gal-8 y CD, lo único que se conoce hasta el momento es que se encuentra expresada en CD humanas de manera constitutiva, pero no hay información acerca de una posible función (Mobergslien and Sioud 2011).

Antecedentes y objetivos

Durante los últimos años se ha acumulado suficiente evidencia para proponer a las Gals como moléculas inmunoregulatoras claves. En nuestro laboratorio nos hemos enfocado en el estudio de la expresión y efectos que ejerce Gal-8 en distintos tipos celulares. Nuestros hallazgos sugieren un papel netamente pro-inflamatorio para esta glectina, destacándose su efecto estimulador sobre la células T *naïve*. De alguna manera, estos efectos se contraponen al efecto anti-inflamatorio que ha sido ampliamente descrito para Gal-1. De hecho, varios trabajos se han centrado en el efecto apoptótico que ejerce Gal-1 en las células T. Dado que estas lectinas pueden converger en un mismo microambiente, ya sea en condiciones normales como patológicas, sumado a que ambas son capaces de reconocer glicorreceptores similares, resulta de suma relevancia contrastar sus efectos, principalmente en el contexto de la respuesta T.

En base a estos antecedentes, nos hemos propuesto como objetivo de la presente Tesis, analizar la existencia de funciones redundantes y/o antagónicas entre Gal-1 y Gal-8 sobre la respuesta celular T; principalmente en ensayos de co-estimulación antígeno-específica, y proliferación independiente de antígeno. También profundizaremos en el estudio de los mecanismos mediante los cuales Gal-1 y Gal-8 inducen dichos efectos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Ratones

Las colonias de ratones C57BL/6J, BALB/cJ, DO11.10 (C.Cg-Tg(DO11.10)10Dlo/J) y OTII (B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J) fueron establecidas a partir de parejas fundadoras obtenidas de The Jackson Labs (Bar Harbor, ME) y criados en nuestras instalaciones. Los ratones *knock out* para el gen codificante de Galectina-8 (B6;129S5-*Lgals8*^{Gt(OST314218)Lex}/Mmucd) fueron obtenidos de Mutant Mouse Resource Research Centers (MMRRC) como heterocigotas. Los mismos fueron retro-cruzados más de 8 veces con ratones C57BL/6J (*Wild Type*) y genotipificados en nuestro laboratorio, según se describe más adelante. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de San Martín.

1.1- Genotipificación ratones *Lgals8*^{-/-}

La genotipificación de las filiales, y la selección de los homocigotas *knock out* se realizó por la técnica de PCR a partir de ADN genómico de muestras de cola de ratón. Se utilizaron los siguientes *primers* (5' a 3'):

- i- ATAAACCCTCTTGCAGTTGCATC (diseñado sobre el *cassette* de interrupción).
- ii- TTTCTCTGGCTTTGGGAATCGTCC (diseñado sobre la región 5' del gen).
- iii- CAAGGAATTGCCATCACCACATCC (diseñado sobre la región 3' del gen).

Para la detectar el alelo mutado se utilizó el par de secuencia i-ii y para detectar el alelo salvaje se utilizó el par de secuencias ii-iii. Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 2%.

Para verificar la presencia remanente de genoma de la cepa 129/SvEvBrd, se enviaron muestras de cola de los ratones a The Jackson Labs, donde se ensayó un panel de SNP (JAX 150 SNP Panel). Este panel cubre 19 cromosomas autosómicos y el X con una densidad de ~20 MB. El resultado indicó que se había alcanzado un 95% de genoma de C57BL/6J.

2- Expresión de proteínas recombinantes

En el laboratorio contábamos con las secuencias codificantes para Gal-1 y Gal-8 de origen murino, clonadas en el vector de expresión pTrcHis-B (Invitrogen) (Tribulatti et al. 2007). En el caso de la quimera Gal-1-8-1, diseñamos un gen sintético (Genscript), uniendo dos secuencias completas de Gal-1 con el péptido *linker* de 9 aminoácidos de longitud de la isoforma de ratón Gal-8L. Este gen se sub-clonó en el vector pTrcHis-B para su posterior expresión.

2.1 Inducción y preparación del extracto crudo

Se transformaron bacterias *Escherichia coli* BL-21 competentes con las distintas construcciones. Se inocularon 5 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación (250 rpm). Estos cultivos se diluyeron 1/100 en 500 ml de medio TB con ampicilina y se incubaron a 37°C en agitación hasta alcanzar $DO_{600nm}=1$. Luego, se indujo con 0,25 mM de IPTG durante 18 h a 18°C en agitación. Los cultivos fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 min a 4°C y el *pellet* fue resuspendido en 30 ml de buffer de lisis: PBS 1X, Tritón 0,5X y PMSF 1X. Se sonicó en presencia de 0,2 mg/ml de DNAsa (Sigma). Los restos celulares fueron removidos por medio de una ultracentrifugación a 40.000 rpm, durante 1 h a 4°C. El extracto soluble obtenido fue filtrado a través de una membrana de 0,45 µm de poro (Millipore).

2.2 Purificación por Cromatografía de afinidad a lactosil-Sepharosa

El extracto filtrado se sembró en una columna de Lactosil-Sepharosa (Sigma), de 1 ml de volumen de lecho previamente equilibrada con buffer PBS 1X-PMSF. Luego de lavar con 20 ml de PBS, se eluyó con 200 mM de D-lactosa (Sigma) en PBS 1X-PMSF. Se recolectaron 5 fracciones de 1 ml, las cuales fueron analizadas por SDS-PAGE 10%. En el caso particular de Gal-1, luego de este primer paso de purificación, se procedió a la alquilación de esta lectina incubándola *on* en presencia de 0,1 M de iodoacetamida

(Sigma) a 4°C. El objetivo de este paso es impedir la inactivación de Gal-1 por oxidación de los grupos sulfhidrilo presentes en los residuos de cisteína. La oxidación de estos grupos lleva a la formación de puentes disulfuro intramoleculares que impiden la correcta homo-dimerización de Gal-1, necesaria para su función (Hirabayashi and Kasai 1994; Inagaki et al. 2000; Miura et al. 2004; Stowell et al. 2009a). Cabe destacar que la alquilación se lleva a cabo entre los dos pasos de purificación, con el objetivo de asegurarnos la completa eliminación de los restos de iodoacetamida. En el caso de la quimera, no es necesario este paso de alquilación, dado que esta proteína ya se encuentra dimerizada covalentemente.

2.3 Purificación por Cromatografía de afinidad a metales

A fin de purificar las lectinas a homogeneidad, se seleccionaron fracciones obtenidas en la elución anterior, se diluyeron 1/10 con buffer IMAC pH: 8,8 (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 30 mM imidazol) y se sembraron en una columna His-Trap de 1 ml cargadas con níquel (GE-HealthCare), previamente equilibrada con el mismo buffer. Luego se realizó un lavado con 20 ml de buffer IMAC pH: 8,8 y se eluyó con buffer IMAC pH: 6,8 (20mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol). Se recolectaron fracciones de 1 ml, las cuales fueron resueltas por SDS-PAGE 10% a fin de constatar su pureza. Cabe destacar que para la preparación de los buffers en este paso de purificación se empleó agua apirógena (Roux Ocefa).

2.4 Diálisis

Las fracciones conteniendo la proteína pura fueron sujetas a diálisis (relación 1:1000) contra una solución preparada con agua apirógena de 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH: 7,6; *on* a 4°C. Se utilizó una membrana de diálisis de 3500 Da de punto de corte (Thomas).

En general, siguiendo el protocolo de inducción y purificación de las proteínas recombinantes descriptos en esta Tesis, se obtuvieron alrededor de 5-10 mg de proteína

pura. Las proteínas fueron guardadas a 4°C y usadas dentro de los 2 meses posteriores a su preparación.

2.5 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína total fue determinada mediante el uso del reactivo de Bradford (BIO-RAD), siguiendo la instrucciones del fabricante. Como referencia se utilizó una curva de calibrado realizada con un patrón de BSA (Sigma).

2.6 Determinación de endotoxinas

Las muestras fueron analizadas por la técnica LAL Gel-Clot para medir endotoxinas. Las mediciones fueron siempre menores a 0,5 IU/mg de proteína (Pyrotell).

2.7 Ensayo de hemoaglutinación

Este ensayo de hemoaglutinación se llevó a cabo con el objetivo de caracterizar la actividad de lectina de cada lote de proteína purificada. Para ello se mezclaron 50 µl de una suspensión al 4% v/v de glóbulos rojos de ratón lavados con PBS- 1% BSA, con 50 µl de diluciones seriadas de la galectina recombinante en PBS- 1% BSA. La reacción fue llevada a cabo en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo en U, incubando durante 1 h a temperatura ambiente.

3- Purificación de esplenocitos de ratón

Se extrajeron bazos de ratones macho de 6 a 8 semanas, y se disgregaron usando una malla de acero inoxidable en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB (Invitrogen), 2 mM de glutamina y 5 µg/ml de gentamicina (medio completo). La suspensión celular se lavó con RPMI, luego se incubó con buffer de lisis de glóbulos rojos (Sigma) durante 5 min a temperatura ambiente, y se lavó nuevamente con medio RPMI.

4- Purificación de células T CD4⁺

Para la purificación de linfocitos T CD4⁺ se trataron esplenocitos de ratón obtenidos en el paso anterior con partículas magnéticas cubiertas con anti-CD4 (MACS, Miltenyi), siguiendo el protocolo del fabricante para selección positiva. La pureza fue confirmada por citometría de flujo mediante la marcación con anti-CD4 conjugado a un fluorocromo. Se utilizó un citómetro de flujo con Sorter modelo PASIII (Partec).

5- Diferenciación de células dendríticas a partir de médula ósea

Las células dendríticas se generaron como se describe anteriormente (Labeur et al. 1999), con algunas modificaciones. Se extrajo la médula de fémures y tibias de ratones macho de 6 a 8 semanas, se disgregó y se filtró (30 µm) para remover restos de hueso y músculo. Luego se lisaron los glóbulos rojos con buffer de lisis Tris-Glicina (Sigma) y finalmente se resuspendieron las células en medio completo, y se distribuyeron en placas de 100 mm de diámetro. Luego de 4 a 5 horas de incubación a 37°C y 5 % de CO₂, se seleccionaron las células no adherentes y se cultivaron en las mismas condiciones, en presencia de 20 ng/ml de GM-CSF y 10 ng/ml de IL-4 (ambas de Biolegend). Al día 6, las células no adherentes fueron transferidas a nuevas placas de 100 mm de diámetro. Se renovó el medio completo con las citoquinas cada 48 o 72 h. Al día 12 de cultivo la mayoría de las células tenían el fenotipo típico de una célula dendrítica. El porcentaje de células dendríticas de cada purificación fue evaluado por citometría de flujo, marcando la molécula de superficie CD11c con un anticuerpo específico conjugado a fluorocromo (Biolegend).

6- Purificación de células dendríticas de bazo

Para la purificación de células dendríticas de bazo (CD11c⁺), el órgano se fragmentó en pequeñas fracciones y luego se trató enzimáticamente con 2,5 mg/ml de Colagensa D (Roche) y 10 µg/ml de DNAsa (Sigma) en medio completo, durante 30 min en agitación suave a 37°C. Este protocolo está diseñado para evitar romper las células dendríticas con

la disgregación mecánica. Luego se filtró la suspensión con un filtro de 30 μm , y se incubó con partículas magnéticas cubiertas con anti-CD11c (MACS, Miltenyi), siguiendo el protocolo de selección positiva sugerido por el fabricante. La pureza de la población CD11c fue confirmada por marcación con anticuerpo anti-CD11c conjugado a fluorocromo (Biolegend) y analizado por citometría de flujo.

7- Ensayo de co-estimulación

Se purificaron esplenocitos de ratones macho transgénicos DO11.10TCR_{OVA} de 6 a 8 semanas de vida, tal como se describió en la sección anterior. Se sembraron 3×10^5 células en placas de 96 pocillos en un volumen final de 0,2 ml de medio completo, en presencia de las dosis indicadas de péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ (Genscript). Luego de 24 h de cultivo, se agregó 50 μl de medio completo conteniendo 1 μCi de [^3H]-metil-timidina (New England Nuclear) y se cultivó por otras 18 h. Finalmente, se cosecharon las células utilizando un Cosechador celular semi-automático (Inotech) y se midió la radiactividad incorporada en cada pocillo registrando las cuentas por minuto (cpm). Todos los tratamientos fueron realizados por cuadruplicados, y los datos expresados como la media $\pm$ SD. Las cpm basales correspondientes a las células sin ningún tratamiento (control) estuvieron siempre en el rango de 300 a 1000 cpm. Los inhibidores (descritos en la siguiente sección), fueron agregados a los cultivos 30 min antes que las galectinas (excepto el inhibidor U0126 que fue agregado 1 h antes), en las concentraciones indicadas. En los ensayos de co-estimulación donde se neutraliza IL-6, se agregó en simultáneo con la Gal-8 y el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del anticuerpo neutralizante o igual cantidad de su control de isotipo (ambos de Biolegend). Cuando se usaron esplenocitos de BALB/cJ como CPA, éstas fueron tratadas previamente con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Mitomicina C (Sigma) en medio completo durante 1h en hielo, para bloquear la división celular. Este tratamiento se realizó en tubos siliconados para evitar el pegado y la consiguiente pérdida de las poblaciones de células adherentes. El bloqueo total de la división celular fue chequeado mediante la inhibición de proliferación activada por Con-A. El tratamiento con las galectinas fue llevado a cabo incubando las CPA o las cél. T CD4 purificadas con las cantidades

indicadas de Gal-1 o Gal-8 en medio completo, durante 30 min en hielo. Luego, las células fueron lavadas para eliminar la lectina libre.

8- Inhibidores

Se utilizaron los siguientes inhibidores y concentraciones: 10 μ M del inhibidor de ERK [1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadiene] (U0126) (Cell Signaling Technology); 5 μ M del inhibidor selectivo de la familia de Src (Lck) 1-(1,1-dimethylethyl)-1-(4-methylphenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine; 5 μ M del inhibidor de PI3K [2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one] (LY 294002); 1 μ M del inhibidor de la proteína kinasa C (PKC) 3-[1-[3-(dimethylamino)propyl]-5-methoxy-1H-indol-3-yl]-4-(1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione (Go-6983); y 5 μ M del inhibidor de MAPK p38 [4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole] (SB-203580) (Enzo Life Sciences). Del inhibidor de la fosfatasa de CD45 (PTPase) N-(9,10-dioxo-9,10-dihydrophenanthren-2-yl)-2,2-dimethyl-propionamide se utilizó 1 μ M (Calbiochem). El Tiodigalactosido (TDG) se utilizó 30 mM (Carbosynth).

9- Ensayo de proliferación

Se purificaron esplenocitos de ratones macho C57BL/6J de 6 a 8 semanas de vida. Se sembraron 5×10^5 células en placas de 96 pocillos en un volumen final de 0,2 ml de medio completo, se agregaron las galectinas en las concentraciones indicadas. Se determinó la proliferación por incorporación de [3 H]-metil-timidina, tal como se describe en el punto anterior. Todos los tratamientos fueron realizados por cuadruplicados, y los datos expresados como la media $\pm$ SD. En los ensayos con inhibidores, los mismos fueron incubados 30 min antes de colocar las galectinas. Como control positivo, se agregó 5 μ g/ml de Concanavalina A (Con-A, Sigma) en los cultivos.

10- Ensayo de inhibición de la proliferación

Se purificaron esplenocitos de ratones macho C57BL/6J de 6 a 8 semanas de vida. Las células (5×10^5) fueron cultivadas en placas de 96 pocillos en medio completo, en

presencia de Con-A 2,5 µg/ml, durante 24 h para su activación. Luego, las células pre-activadas fueron cultivadas durante 24 h adicionales en presencia de las galectinas, en las concentraciones indicadas. La proliferación se midió por incorporación de [³H]-metil-timidina.

11- Ensayo de co-estimulación *in vivo*

Para determinar la dosis subóptima de antígeno, se inmunizaron ratones hembra DO11.10TCR_{OVA} de 6-8 semanas de edad vía i.p. con concentraciones decrecientes (5 a 0,05 µg) de la proteína ovoalbúmina (OVA, Sigma) en PBS. Al día 5 post-inmunización se extrajeron los bazo y purificaron los esplenocitos. Se realizó la re-estimulación *in vitro* siguiendo el protocolo de co-estimulación descrito anteriormente, usando dos dosis del péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ (0,1 y 0,25 µg/ml). Para la co-estimulación *in vivo*, se inmunizaron ratones vía i.p. con 0,5 µg de OVA en combinación con 25 µg de Gal-8 (OVA + Gal-8) o 25 µg de Gal-1 (OVA + Gal-1). Los grupos control recibieron: sólo antígeno (OVA), vehículo (PBS), o sólo las Gals (Gal-1 o Gal-8). Todas las inmunizaciones se realizaron en un volumen final de 0,2 ml de PBS. La re-estimulación *in vitro* se realizó en presencia de 0,25 µg/ml del péptido de OVA₃₂₃₋₃₃₉. La proliferación celular se midió por incorporación de [³H]-metil-timidina.

12- Virus de Aftosa (VFA)

Tanto para la formulación del antígeno, como para los ensayos de ELISA, se utilizó el serotipo VFA O1 Campos inactivado químicamente con etilenimina binaria (VFAi). El virus infeccioso (del mismo serotipo) utilizado para el desafío viral fue proporcionado por el Servicio Nacional de Salud Animal, Argentina (SENASA). Todos los experimentos con virus infeccioso se realizaron en las instalaciones de INTA-Castelar, Nivel de Bioseguridad 3A.

13- Formulación del antígeno e inmunización de ratones

Los ratones BALB/cJ fueron inmunizados mediante una única inyección i.p. con el

antígeno VFai formulado en PBS en un volumen final de 0,2 ml por ratón. La dosis de VFai por ratón utilizada fue de 0,1 a 0,2 µg. Dicha dosis de antígeno fue siempre seleccionada a partir de curvas dosis-respuesta para cada lote distinto de VFai, en función de obtener una protección moderada del 30 al 40%. El grupo control positivo (VFai/Ady), recibió una emulsión de VFai y el adyuvante oleoso Montanide ISA 50 V2 (Seppic). El grupo experimental (VFai/Gal-8 o VFai/Gal-1) recibió una dosis de VFai junto con 100 µg de Gal-8 o Gal-1. Los grupos controles recibieron sólo 100 µg de Gal-8 o Gal-1 (Gal-8 o Gal-1) o PBS (vehículo). Para evaluar la respuesta humoral, los animales fueron sangrados los días 0, 7, 14 y 21 post-inmunización (dpi), y los sueros fueron almacenados a -20°C para su posterior análisis.

14- Determinación de anticuerpos anti-VFA

Se evaluaron los anticuerpos totales contra VFA mediante un ELISA de captura. Brevemente, se sensibilizaron las placas de ELISA (Maxisorp, Nunc) con suero de conejo anti-VFA en 0,05 M de buffer carbonato-bicarbonato, pH: 9,6; on a 4°C. Luego, se añadió el VFai purificado. Después de varios lavados, se añadieron las muestras de suero diluidas, seguido de una incubación con anti-IgG de ratón conjugado a HRP (Jackson ImmunoResearch). La actividad enzimática se desarrolló con la adición de la mezcla de sustrato/cromóforo H₂O₂/ABTS (Sigma). La reacción de color se inhibió después de 30 min de incubación mediante el agregado de 0,2 % NaFl. Se midió la densidad óptica (DO) utilizando un lector de microplacas automático (Bio-Rad) a una longitud de onda de 405 nm. Se utilizaron volúmenes de 50 µl durante todo el ensayo. Las placas fueron lavadas con PBS 5 veces entre cada paso. Excepto por el anticuerpo de captura, todos los reactivos se diluyeron con PBS 2% de NaCl, 1% de Tween 20, pH 7,6 (buffer de dilución de ELISA). Con el fin de eliminar la señal no específica de cada muestra de suero, se incluyeron pocillos de control sensibilizados con anticuerpos de captura, pero en ausencia de antígeno.

Los anticuerpos neutralizantes se midieron como se ha descrito previamente (Quattrocchi et al. 2011). Brevemente, se incubaron diluciones seriadas de los sueros con

100 TCID₅₀ de VFA, por pocillo. Estas mezclas de VFA-suero fueron transferidas a monocapas de células BHK-21 y se incubaron a 37°C. Se registró la aparición de efectos citopáticos (lisis) después de 48 h de incubación.

15- Desafío viral

En el modelo murino, la protección contra VFA se define por la ausencia de viremia a las 24 h post-infección. El desafío viral se llevó a cabo como se describió anteriormente (Quattrocchi et al. 2013). Brevemente, se inocularon ratones vía i.p. a los 21 post-inmunización con 10⁴ TCID₅₀ de VFA infeccioso. Luego de 24 h, los animales se anestesiaron y se sangraron a través del plexo retro-ocular. Las muestras de sangre heparinizada se extendieron sobre las monocapas de células BHK-21, y se incubaron durante 40 min a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Luego, las monocapas celulares fueron lavadas tres veces con PBS estéril. Las células se suplementaron con DMEM fresco con 2% de SFB y se incubaron durante 72 h a 37°C. Los animales fueron considerados como protegidos si la monocapa de células no presentaba efecto citopático. Los porcentajes de protección se calcularon como: 100 x (ratones protegidos/ratones desafiados). Los títulos de viremia se calcularon por el método de Reed y Muench (Reed and Muench 1938).

16- Marcación de moléculas coestimuladoras en células dendríticas

Se resuspendieron 1x10⁶ células dendríticas derivadas de médula ósea en 100 µl de PBS frío. Las células se bloquearon en presencia del anticuerpo monoclonal anti-receptor de Fcγ CD16/32 (Biolegend) durante 30 min, en hielo. Luego se agregaron los anticuerpos monoclonales: anti-CD80-FITC, anti-CD86-PE, o anti-MHCII-FITC, en combinación con anti-CD11c-FITC o -PE (todos de Biolegend), según corresponda para hacer las dobles marcaciones y analizar el porcentaje de expresión en los eventos CD11c positivos. Luego las células se lavaron, y fijaron con 1 % de *p*-formaldehído en PBS para su posterior análisis por citometría de flujo. En los ensayos donde se analizan las moléculas coestimuladoras de células dendríticas endógenas de bazo, se purificaron los esplenocitos

mediante tratamiento enzimático como se describió anteriormente (para la obtención de las CD). Se marcaron 3×10^6 de esplenocitos totales, con las mismas combinaciones de anticuerpos, para su análisis por citometría de flujo. En este caso en particular, se analizaron al menos 1×10^6 eventos, ya que las células dendríticas representan sólo el 2 % de la población total de esplenocitos.

17- Microscopía de células dendríticas

Se cultivaron 1×10^4 células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón BALB/cJ en placas de 8 pocillos especiales para microscopía (Lab-tek, Nunc), en presencia de $2 \mu\text{M}$ de Gal-8 en un volumen final de 0,2 ml de medio completo, durante 18 h. Previo al tratamiento se agregó $10 \mu\text{g/ml}$ de Polimixina B (USB). Luego, se permeabilizaron las células con 0,1X de Tritón X100-PBS y se las incubó con faloidina-alexa 488 1/1000 (Molecular Probes, ThermoFisher) durante 1 h. Para una mejor visualización se marcaron los núcleos con DAPI (Sigma). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Nikon Eclipse 80i.

18- Ensayo funcional de células dendríticas derivadas de médula ósea

Se incubaron 1×10^4 células dendríticas diferenciadas de médula ósea en placas de 96 pocillos, y se incubaron *on* con Gal-8 o LPS en las concentraciones indicadas en 0,2 ml de volumen final de medio completo (Pre-activación). Luego se realizaron lavados suaves con PBS 1X, y se agregaron 1×10^5 de células T CD4 purificadas de ratones DO11.10TCR_{OVA} u OTII TCR_{OVA} a los cultivos de células dendríticas, según corresponda, en presencia de $0,1 \mu\text{g/ml}$ de péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ (Genscript). La proliferación se midió por incorporación de [³H]-metil-timidina, tal como se describió para los ensayos de co-estimulación y proliferación.

19- Array de citoquinas

Para evaluar el perfil de citoquinas secretadas por las células dendríticas, se utilizaron membranas comerciales (Raybiotech), las cuales cuentan con anticuerpos de captura

inmovilizados a una membrana específicos para las siguientes citoquinas: G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p40p70, IL-12p70, IL-13, IL-17, IFN γ , MCP-1, MCP-5, RANTES, SCF, sTNFRI, TNF- α , Trombopoyetina y VEGF. Para el ensayo se siguió el protocolo recomendado por la empresa. Brevemente, las membranas se incubaron *on* con sobrenadantes provenientes de cultivos de células dendríticas pre-tratadas con 0,5 μ M de Gal-8 o PBS como control. Luego se realizaron múltiples lavados con un buffer de lavado proporcionado en el kit; para luego incubar durante 2 h con un cóctel de anticuerpos de detección biotinilados. Por último, luego de varios lavados, se incubó con estreptavidina conjugada a HRP durante 1 h. Se reveló por quimioluminiscencia, y se cuantificó la señal por densitometría utilizando el programa ImageJ (NIH). Para su análisis, cada membrana fue normalizada a su control de carga interno (propio de cada membrana), para luego calcular para cada citoquina la relación entre la señal correspondiente al sobrenadante condicionado (Gal-8) y al sobrenadante control (sin tratar); y así graficar esta relación como incremento o *fold increase*.

20- Determinación de citoquinas por ELISA

Se detectó la concentración de citoquinas (IL-12(p70), IL-6 e IFN-g) en sobrenadantes de cultivos mediante la técnica de ELISA, utilizando los pares de anticuerpos de captura y detección específicos para cada citoquina (Biolegend). Para la correcta cuantificación, se realizaron curvas de calibración utilizando los estándares de citoquinas (Biolegend). Brevemente, se sensibilizaron placas ELISA de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) con las concentraciones recomendadas por el proveedor de los anticuerpos de captura, *on* a 4°C. Luego de múltiples lavados con TBS-0,05% Tween 20, se bloqueó la placa con TBS-0,05% Tween 20- 5%BSA durante 1 h a 37°C. Nuevamente se realizaron múltiples lavados, para luego incubar distintas diluciones de las muestras de sobrenadantes de cultivo, durante 2 h. Luego se realizaron más lavados, y se incubó con los anticuerpos de detección correspondientes. Por último, se lavó e incubó 1 h con una dilución 1/5000 de estreptavidina-HRP (Biolegend), para luego revelar con el sustrato TMB (Sigma) en Buffer Citrato con H₂O₂. La reacción fue frenada con 0,2 M de ácido sulfúrico, luego de

la detección de color de la curva o a un tiempo máximo de 20 min. La placa fue leída a 405 nm en un lector de placas FILTERMAX F5 (Molecular Devices).

21- Obtención de anticuerpos específicos para Gal-8

Se inmunizaron conejos con Gal-8 recombinante de ratón siguiendo el siguiente esquema: se administraron subcutáneamente 100 µg de Gal-8 emulsionada en adyuvante de Freund completo (Sigma), seguida por tres refuerzos cada 14 días de 20 µg de proteína recombinante emulsionada en adyuvante de Freund incompleto (Sigma). Luego de 21 días del último refuerzo, se sangraron los animales por punción cardíaca y se separó el suero. Para la purificación de IgGs a partir del suero, se partió de 15 ml de suero, que fueron diluidos con TBS (30 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH: 7,6) y sembrados en una columna de afinidad a proteína A-Sepharose *Fast Flow* (GEHealthCare). Luego de lavar exhaustivamente con solución fisiológica, los anticuerpos fueron eluidos con una solución de 0,1 M de Glicina, 0,15 M NaCl, pH: 3,5, en fracciones de 1 ml. Inmediatamente luego de la elución, las fracciones fueron neutralizadas con 50 µl de 1 M de Tris Base. El pico de elución se determinó por el método de Bradford (BIO-RAD), y las fracciones que contenían IgGs purificadas fueron dializadas *on* contra TBS. Por último, se obtuvieron anticuerpos específicos anti-Gal-8 por cromatografía de afinidad a Gal-8, utilizando una columna *Hi-Trap* activada con *N*-hidroxisuccinimida (GE HealthCare) previamente cargada con Gal-8 recombinante. En la columna se sembraron las IgGs purificadas anteriormente, se lavó con solución fisiológica y eluyó con 0,1 M de glicina, 0,15 M NaCl, pH: 2,5. Las fracciones fueron colectadas en 50 µl de 1 M Tris Base. Se determinó el pico de elución y se cuantificaron las IgGs específicas por el método de Bradford. Posteriormente, se guardaron a 4°C con el agregado de azida sódica.

22- Análisis de Gal-8 endógena por *Western blot*

Se cultivaron 1×10^6 células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón BALB/cJ, y se trataron *on* con 500 ng/ml de LPS o PBS como control. Las células se lisaron en buffer de lisis (TBS-0,5X Tritón, PMSF 1X, cóctel de inhibidores de proteasas 1/1000 (Sigma)),

y luego se clarificaron mediante una centrifugación a 13.000 rpm durante 15 min, a 4°C. Las muestras fueron resueltas por SDS-PAGE 10% y electro-transferidas a filtros PVDF (GE HealthCare) durante 1 h a 0,8 mA por cm² de membrana en una cuba de transferencia semi seca (Hoeffer, GE). Los filtros fueron bloqueados con TBS-5% leche descremada durante una hora e incubados con un anticuerpo policlonal de conejo anti-Gal-8 purificado (obtenido como se describió en el paso anterior), diluido 1/100 en TBS-5% leche descremada durante 1 h. Luego de tres lavados con TBS-Tween 20 0,05%, los filtros fueron incubados con una dilución 1/5000 de anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a HRP (Pierce) en TBS-5% leche descremada durante 1 h. Luego de 3 lavados, los filtros fueron revelados usando un kit comercial de quimioluminiscencia (Pierce).

23- Análisis de Gal-8 endógena por citometría de flujo

Se cultivaron 1×10^6 células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón BALB/cJ, y se trataron *on* con 500 ng/ml de LPS o PBS como control. Las células se bloquearon en presencia del anticuerpo monoclonal anti-receptor de Fcγ CD16/32 (Biolegend) durante 30 min, en hielo. Luego se incubaron con anti-CD11c-PE (Biolegend) durante 1 h. Luego se lavaron, y permeabilizaron en presencia de 0,1X de Triton X100-PBS. Por último, se incubaron las células durante 2 h con anti-Gal-8 1/20 purificado (obtenido como se describió en el paso anterior), se lavaron y se incubaron con anti-IgG de conejo-Alexa488 1/1000 (Invitrogen) durante 1 h. Luego del último lavado, las células fueron fijadas con 1% de *p*-formaldehído en PBS para su posterior análisis por citometría de flujo. Los controles de isotipo se realizaron con el mismo protocolo reemplazando el anti-Gal-8 por IgG de conejo purificada.

24- Análisis estadístico

Se utilizó el *test t* de Student para comparaciones entre dos grupos; y ANOVA para comparaciones múltiples. Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1- Interacción entre las Galectinas -8 y -1 en la respuesta celular T

1.1- Caracterización de los efectos inducidos por las Galectinas -8 y -1 sobre la respuesta celular T

(Los resultados contenidos en esta sección se publicaron en parte en J Immunol. 2012 Apr 1;188(7):2991-9).

Como se ha detallado anteriormente, en el laboratorio hemos descripto dos actividades para Gal-8 en el inicio de la respuesta inmune: a baja concentración (0,2 μ M) es capaz de co-estimular a los linfocitos T (LT) en presencia de antígeno; y a mayor concentración (2 μ M) induce proliferación policlonal de LT de manera antígeno independiente (Tribulatti et al. 2009). Estas actividades se contraponen al efecto apoptótico de otras Gals, tales como Gal-1 sobre las poblaciones T y su consiguiente efecto anti-inflamatorio (Perillo et al. 1995; Perillo et al. 1997). Por consiguiente, nos propusimos estudiar la presencia de efectos redundantes y/o antagónicos entre Gal-8 y Gal-1, y contrastar sus efectos en el modelo de co-estimulación de LT en la respuesta frente a antígeno, y la proliferación de LT independiente de antígeno.

En el laboratorio contábamos con estudios preliminares donde observamos que Gal-1 comparte el efecto co-estimulador de Gal-8 en el modelo murino DO11.10 transgénico para el TCR_{OVA} (DO11.10TCR_{OVA}) en presencia del péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉. Para confirmar este resultado cultivamos esplenocitos del ratón DO11.10 en presencia de 1 μ g/ml del péptido de OVA₃₂₃₋₃₃₉; y concentraciones crecientes de Gal-8 y Gal-1. Confirmamos así que Gal-1 tiene la capacidad de co-estimular la respuesta al antígeno de OVA₃₂₃₋₃₃₉, cuando es usada a una concentración 100 veces mayor que Gal-8 (20 vs. 0,2 μ M) (**Figura 2 A**). También observamos que el efecto co-estimulador de Gal-1 fue parcialmente inhibido en presencia de tiodigalactósido (TDG, un azúcar semejante a la lactosa pero no metabolizable por las células), indicando entonces que el efecto es

dependiente de la actividad de lectina (**Figura 2 B**). El agregado de Gal-1 y Gal-8 en forma simultánea o por separado, no generó ningún efecto distinto al agregado de Gal-8 sola, descartando así la presencia de efectos sinérgicos o aditivos entre estas Gals. Más aún, cuando agregamos estas lectinas separadas por un intervalo de una hora, observamos un efecto aditivo menor (**Figura 2 C**). Estos hallazgos sugieren que estas Gals probablemente reconozcan receptores similares de la superficie del LT. Por otro lado, observamos que el agregado de Gal-1 o Gal-8 sobre LT previamente activados en presencia de la lectina vegetal concanavalina A (Con-A) resulta en una inhibición de la proliferación, lo cual sugiere que estas Gals presentarían un efecto dual dado que por un lado empujan el inicio de la respuesta T, mientras que por otro lado la limitan una vez que ésta se encuentra exacerbada (**Figura 2 D**). En este caso, el efecto también es dependiente de la actividad de lectina, ya que en presencia de TDG, no se observa el efecto antiproliferativo.

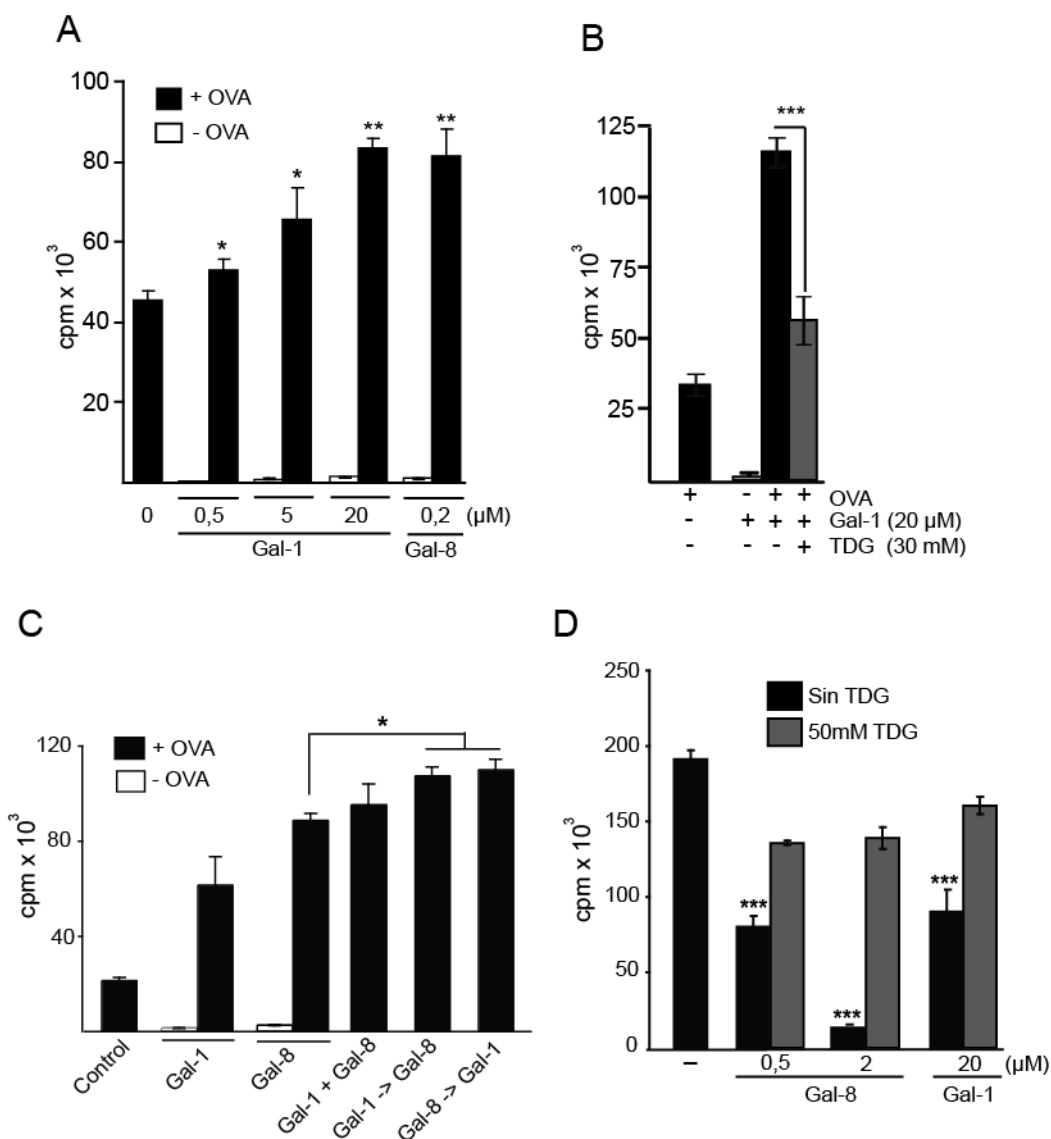
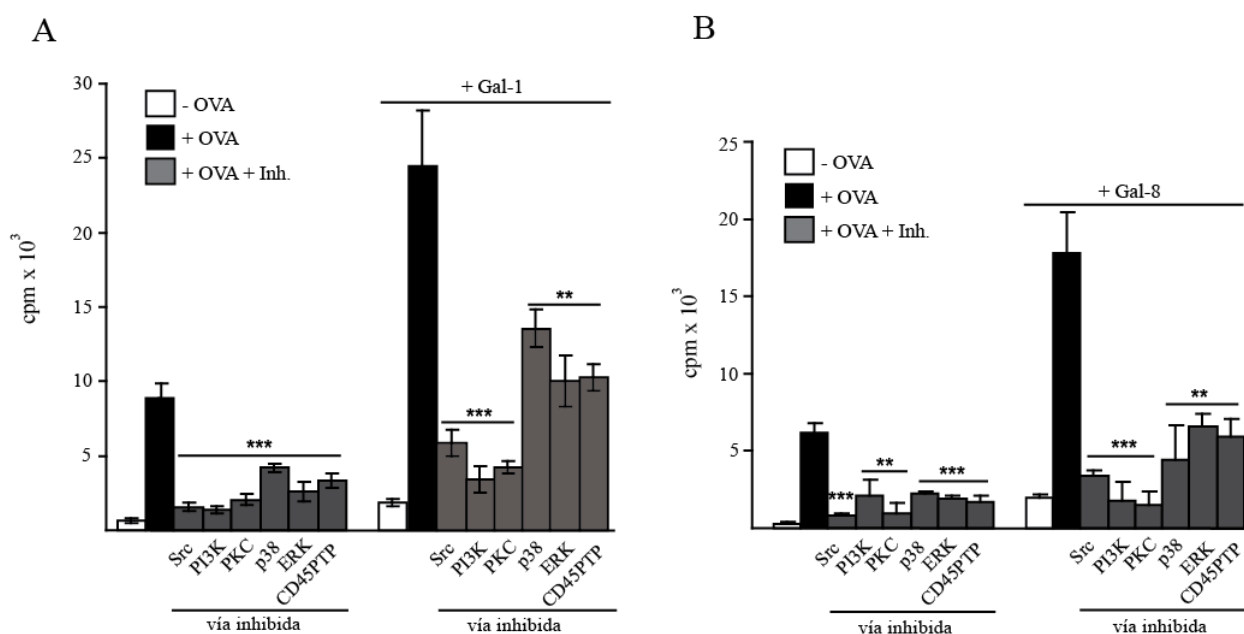


Figura 2. (A) Se cultivaron esplenocitos de ratones DO11.10TCR_{OVA} en presencia del 1 μg/ml de péptido OVA junto con Gal-8 o cantidades crecientes de Gal-1. (B) Inhibición de la co-estimulación inducida por Gal-1 (20 μM) en presencia de 30 mM de TDG. (C) Se adicionó Gal-1 (20 μM) ó Gal-8 (0,2 μM) en ensayos de co-estimulación en simultáneo (a partir de una mezcla conteniendo ambas Gals, +) o por separado (1 h de incubación entre Gals, ->). (D) Se estimularon esplenocitos de ratones C57BL/6J con Con A por 24 h, y luego se agregaron Gal-1 y Gal-8 en las concentraciones indicadas. Luego de 18 h se determinó la proliferación por incorporación de timidina-tritiada. El resultado graficado en la figura A es representativo de 5 ensayos independientes; los de las figuras B, C y D son representativos de al menos 3 ensayos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

Para caracterizar mejor las actividades co-estimulatorias de Gal-8 y Gal-1, decidimos estudiar la participación de las vías de transducción de señales involucradas en la activación del TCR. El hecho de que Gal-8 potencie respuestas T *borderline*, quizás involucre una disminución del umbral de activación del TCR. Para ello repetimos los

experimentos de co-estimulación con esplenocitos del ratón DO11.10TCR_{OVA} en presencia de inhibidores específicos de las siguientes vías: Ick (Src), PI3K, PKC, p38MAPK y ERK. Además, quisimos probar el inhibidor de la fosfatasa de CD45 ya que en el laboratorio se había determinado previamente que Gal-8 interactúa con el CD45; y que la actividad de fosfatasa de éste está involucrada en la co-estimulación y proliferación inducidas por Gal-8 (Tribulatti et al. 2009). Como era de esperar, dichos inhibidores afectaron la respuesta al péptido de OVA₃₂₃₋₃₃₉ (**Figura 3 A y B**). Asimismo, el efecto co-estimulador inducido tanto por Gal-1 como Gal-8 disminuyó significativamente en presencia de estos inhibidores (**Figura 3 A y 3 B, respectivamente**). Estos resultados sugieren que ambas Gals refuerzan la activación de las mismas vías intracelulares involucradas durante la presentación antigénica en el LT.



Otro de los efectos que induce Gal-8 sobre LT CD4⁺ es la proliferación policlonal (en ausencia de antígeno). Decidimos entonces estudiar si Gal-1 compartía este efecto proliferativo. Para ello, incubamos esplenocitos purificados de ratones C57BL/6J en presencia de concentraciones crecientes de Gal-1 (2 a 20 μ M) y luego de 48 h de incubación medimos la proliferación celular. A diferencia de Gal-8, encontramos que Gal-1 no ejerce este efecto proliferativo, aún cuando es utilizada en altas concentraciones (20 μ M) (**Figura 4 A**). Esto estaría de acuerdo con resultados previos del laboratorio, donde se observa que la estructura en tándem de Gal-8 con dos DRC fusionados por un péptido *linker* es esencial para ejercer el efecto proliferativo, aunque no lo es para la co-estimulación (Cattaneo et al. 2011). Cabe destacar que Gal-1 pertenece al grupo de las galectinas “prototipo” constituida por un único DRC, pudiendo formar monómeros u homodímeros (a altas concentraciones); siendo estos últimos inestables. Por lo tanto, para estudiar si la estructura en tándem proporcionaba la capacidad proliferativa a Gal-1, generamos una proteína quimérica donde fusionamos genéticamente dos dominios DRC de Gal-1 con el péptido *linker* de Gal-8 y la llamamos Gal-1-8-1 (ver **Figura 4 B**). Efectivamente la quimera Gal-1-8-1 indujo proliferación de linfocitos a partir de 10 μ M, siendo este efecto prevenido en presencia del inhibidor TDG. Aquí también se necesitó mayor concentración de Gal-1-8-1 para igualar el efecto proliferativo de Gal-8 (20 vs. 2 μ M) (**Figura 4 C**). En cuanto al efecto co-estimulador, la quimera Gal-1-8-1 presentó una actividad similar a Gal-1 (**Figura 4 D**).

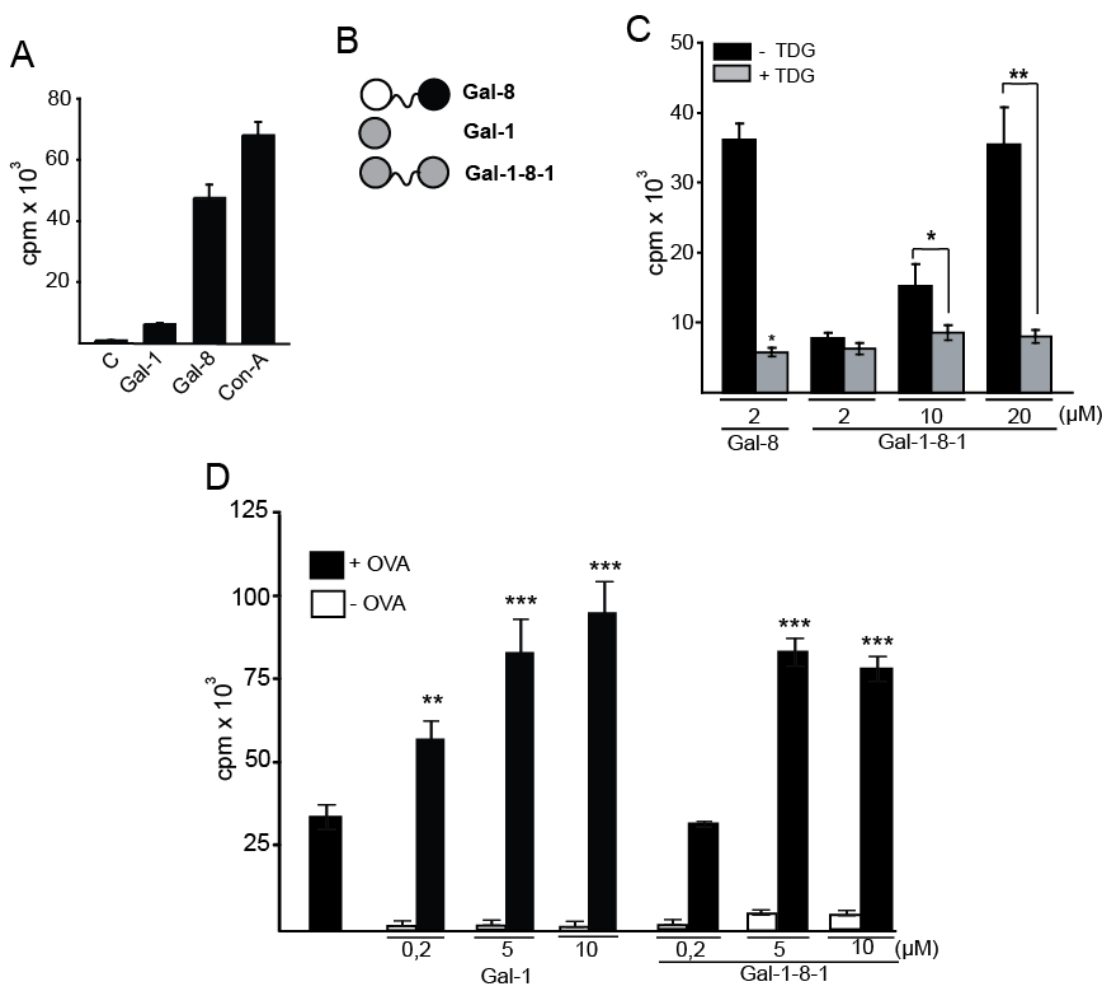


Figura 4. (A) Se incubaron esplenocitos de ratones C57BL/6J durante 48 h en presencia de 20 μM de Gal-1 ó 2 μM de Gal-8. (B) Representación esquemática de la quimera recombinante Gal-1-8-1. (C) Se llevaron a cabo ensayos de proliferación con las cantidades indicadas de Gal-1-8-1 y Gal-8. (D) Se cultivaron esplenocitos de ratones DO11.10 por 48 h en presencia de 1 μg/ml del péptido OVA junto con cantidades crecientes de Gal-1 ó Gal-1-8-1. Se midió la proliferación por incorporación de timidina-tritiada. Con A (2,5 μg/ml) fue usada como control positivo. TDG se usó a 30 mM. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$). Los resultados son representativos de 3 ensayos independientes.

En conjunto estos resultados indican que la unión estable de los dominios de Gal-1 le confiere actividad proliferativa (antígeno independiente), aunque no necesariamente implican un aumento de su actividad co-estimuladora (antígeno dependiente). Por otra parte, las diferencias de potencia entre Gal-1 y Gal-8 podrían explicarse por una diferencia en la especificidad por azúcares ligandos de los DRC, más que por una diferencia entre los requisitos moleculares de dichas Gals. En este sentido, el fenotipo celular inducido en los esplenocitos cultivados en presencia de Gal-1 o Gal-8 fue completamente diferente: Gal-8 induce un fenotipo de adhesión y extensión celular,

mientras que Gal-1 y su quimera Gal-1-8-1 promovieron una fuerte aglutinación celular, sin mostrar un fenotipo de adhesión (**Figura 5**).

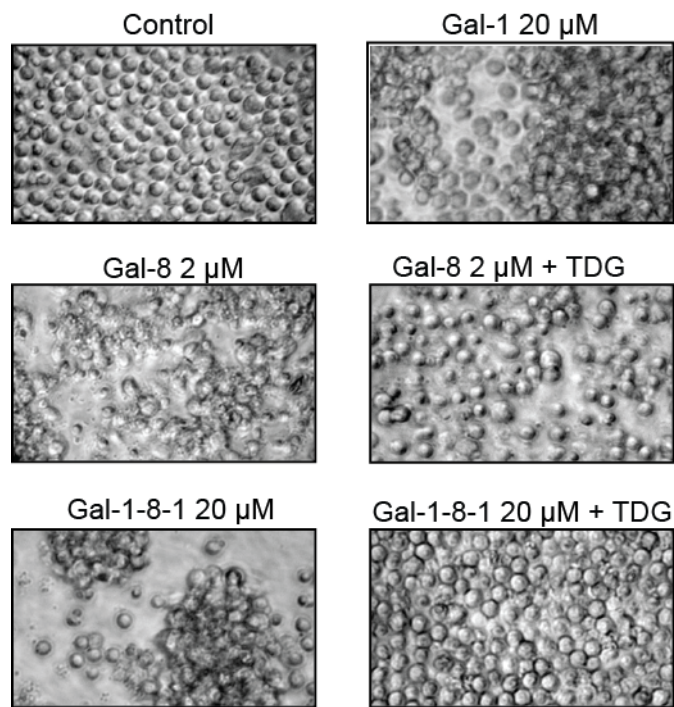


Figura 5. Imágenes de contraste de fase de cultivos de esplenocitos de C57BL/6J, incubados en presencia de Gal-8, -1 y -1-8-1. (Aumento 200X).

A fin de profundizar en el mecanismo por el cual Gal-1 y Gal-8 median su actividad co-estimuladora, llevamos a cabo experimentos con el objetivo de determinar si estas lectinas actúan sobre las células presentadoras de antígeno (CPA), células T o ambas poblaciones. Para ello realizamos ensayos de co-estimulación utilizando como CPA esplenocitos de ratones BALB/cJ tratados con Mitomicina C y células T CD4 de ratones DO11.10TCR_{OVA} purificadas por afinidad usando anti-CD4 inmovilizado a esferas magnéticas. De esta manera, podremos establecer fehacientemente si las células T CD4 son el blanco del efecto co-estimulador de estas Gals en presencia de bajas concentraciones de péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉. Seguidamente pre-tratamos las CPA y los T CD4 por separado con 20 μM de Gal-1 ó 0,2 μM de Gal-8 en frío durante 30 min, a fin de permitir la unión de estas lectinas a la superficie celular. Luego, se realizaron lavados

para eliminar las Gals que no se habían unido a la superficie celular. Por último, se co-cultivaron las CPA y las T CD4 durante 48 h en presencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ del péptido de OVA₃₂₃₋₃₃₉, y luego de este tiempo se midió la proliferación celular. Un aspecto interesante fue encontrar que cuando pre-tratamos sólo una de estas poblaciones (CPA o TCD4) con Gal-1 ó Gal-8, no se dispara el efecto co-estimulador. Tampoco observamos este efecto cuando enfrentamos ambas poblaciones pre-tratadas por separado (**Figura 6 A**).

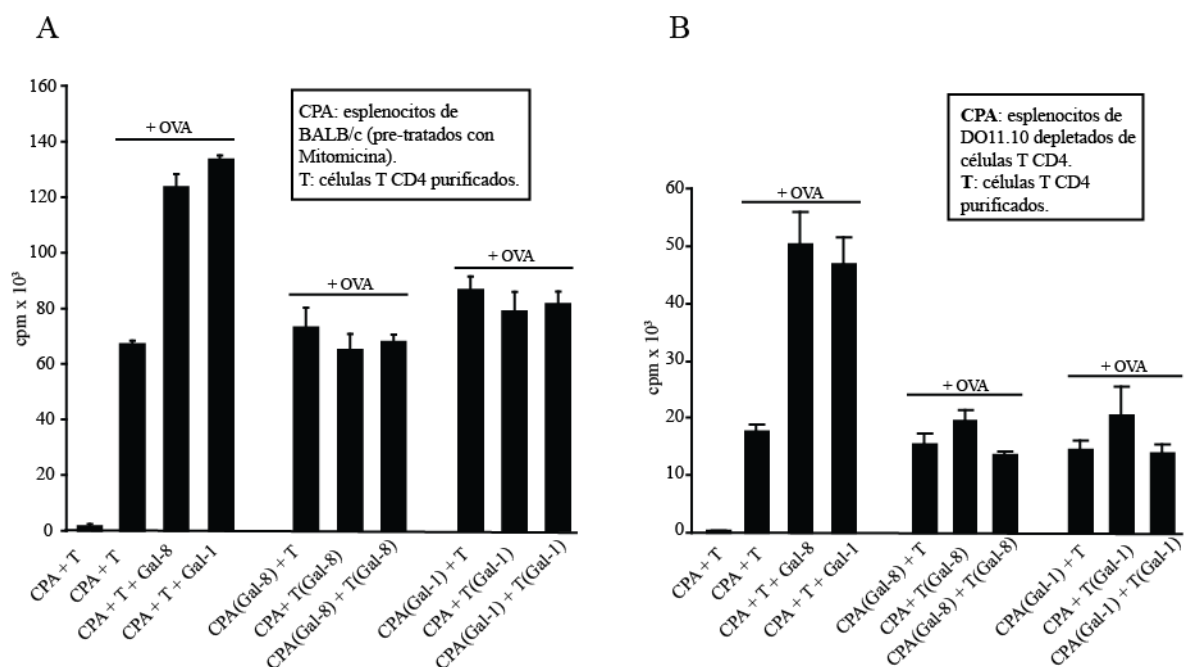


Figura 6. 2×10^5 esplenocitos de ratones BALB/cJ tratados con Mitomicina-C (**A**) ó esplenocitos depletados en cél. TCD4 de ratones DO11.10 (**B**) fueron cocultivados con 10^5 cél. T CD4 altamente purificadas por 48 h en presencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ del péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ junto con Gal-1 (20 μM) ó Gal-8 (0,2 μM). Donde se indica, CPA ó cél. TCD4 fueron tratadas previo a los cocultivos durante 30 min en hielo con 20 μM de Gal-1 [CPA(Gal-1) ó T(Gal-1)] ó 0,2 μM de Gal-8 [CPA(Gal-8) ó T(Gal-8)]. El exceso de Gal sin reaccionar fue removido por lavado. La proliferación se midió por incorporación de timidina tritiada. Los resultados son representativos de 2 ensayos independientes.

Estos resultados indican que para lograr el efecto co-estimulador completo es necesario que cada una de éstas Gals unan de manera simultánea tanto a las CPA como a las células T CD4 durante la presentación antigénica. Para confirmar estas observaciones, repetimos estos ensayos usando como CPA esplenocitos provenientes de ratones

DO11.10TCR_{OVA} depletados en T CD4, para descartar cualquier efecto secundario del tratamiento con Mitomicina C (**Figura 6 B**). No se observaron diferencias usando los distintos tipos de CPA, reforzando así nuestras observaciones. Estos hallazgos sugieren que posiblemente Gal-8 y Gal-1 se encuentran estabilizando la sinapsis inmunológica durante la presentación.

1.2- Participación de Gal-8 y Gal-1 en la inducción de la respuesta inmune

Un aspecto de interés consiste en determinar si efectivamente Gal-1 y Gal-8 están de algún modo involucradas en el inicio de respuesta T específica *in vivo*, especialmente cuando las concentraciones de antígeno son *borderline*. En primer lugar, realizamos una curva de concentración de antígeno inmunizando ratones DO11.10TCR_{OVA} vía i.p. con diferentes cantidades de la proteína ovoalbúmina, con el fin establecer una dosis de antígeno *borderline*. Luego de cinco días, se extrajeron los bazo de los ratones, se reestimularon los esplenocitos *in vitro* con distintas dosis de péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉, y se midió la proliferación celular. A partir de los resultados obtenidos, elegimos como dosis de proteína ovoalbúmina para inyectar la de 0,5 µg por ratón como dosis subóptima, y para reestimular los esplenocitos *in vitro* elegimos la dosis de 0,25 µg/ul de péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ (**Figura 7 A**). Con dichas dosis, obtuvimos la respuesta *borderline* deseada, donde la respuesta proliferativa apenas se despegaba de la basal. Luego inmunizamos ratones DO11.10TCR_{OVA} con una única dosis subóptima de la proteína ovoalbúmina, sola o en combinación con 25 µg de Gal-1 o Gal-8. Luego de cinco días, se extrajo el bazo de los ratones y los esplenocitos fueron reestimulados *in vitro* con el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉. Notablemente, los esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con el antígeno en presencia de Gal-1 o Gal-8 (OVA + Gal-1 u OVA + Gal-8), presentaron una mayor respuesta al ser reestimulados que el grupo inmunizado únicamente con el antígeno (OVA) (**Figura 7 B**). Los grupos controles inmunizados sólo con Gal-1 o Gal-8 (o sea sin antígeno) respondieron igual que el grupo de PBS (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que tanto Gal-1 como Gal-8 pueden co-estimular la respuesta celular tanto *in vivo*, como *in vitro* (ver **Figura 2 A**).

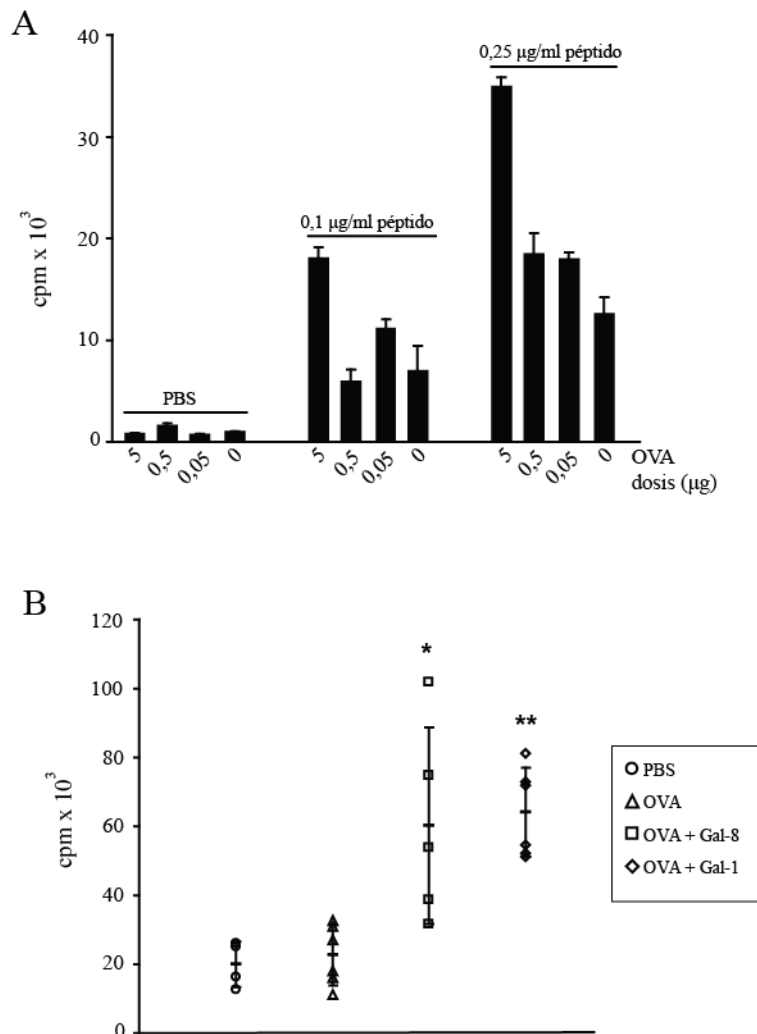


Figura 7. (A) Se inmunizaron ratones DO11.10 i.p. con la cantidad indicada de la proteína ovoalbúmina. Luego de 5 días, los bazo fueron removidos y los esplenocitos fueron reestimulados *in vitro* con dos concentraciones del péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ (0,1 y 0,25 μg/ml) por 48 h. La estimulación fue medida por incorporación de timidina tritiada. Se seleccionó la dosis 0,5 μg de ovoalbúmina y 0,25 μg/ml de péptido para inmunizar y reestimar, repectivamente. **(B)** Los ratones fueron inmunizados como en A. **p*<0,02, vs OVA, ***p*<0,001 vs OVA. Los resultados en B, son representativos de 3 ensayos independientes.

2- Validación del efecto inmunoestimulador de Galectina-8 usando un modelo experimental de vacuna contra el virus de la fiebre aftosa (VFA)

El hecho de que una única dosis de Gal-8 ó Gal-1 recombinantes incrementen la respuesta antígeno específica cuando son co-administradas junto con una dosis subóptima de antígeno (ver **Figura 7 B**), nos permitió postular estas lectinas como posibles adyuvantes fisiológicos para la respuesta inmune. Sumado a esto, se ha descripto que Gal-8 y Gal-1 promueven la diferenciación de células plasmáticas y la secreción de anticuerpos (Tsai et al. 2011). Teniendo en cuenta estas características, decidimos estudiar el efecto de Gal-8 y de Gal-1 en la estimulación de la respuesta inmune usando un modelo de antígeno complejo que induzca preferentemente una respuesta humoral. Considerando que hasta el momento nuestras observaciones estaban basadas en un modelo transgénico (DO11.10TCR_{OVA}), en el cual entre el 20 y 30% de las células T CD4 están forzadas a responder a un antígeno específico, nos pareció de gran relevancia la utilización de un modelo con un antígeno complejo y de interés. Para ello establecimos una colaboración con el laboratorio de la Dra. Patricia Zamorano del Instituto de virología de INTA, Castelar; quienes cuentan con un modelo experimental en ratones BALB/cJ de Fiebre Aftosa. Este modelo murino se utiliza para estudiar la inmunidad contra el virus de la fiebre aftosa (VFA), dado que existe una correlación con la respuesta inmune humoral y protectora contra VFA en el ganado (Fernandez et al. 1986; Dus Santos et al. 2000; Zamorano et al. 2010). Los ratones adultos BALB/cJ pueden ser infectados experimentalmente por inoculación intraperitoneal (i.p.), el virus entonces se replica en las células pancreáticas, y la viremia dura 72 h después de la inoculación y sin síntomas clínicos, hasta que los títulos de anticuerpos neutralizantes aumentan. Las vacunas actuales contra VFA consisten en preparaciones de virus completo inactivado formulado con adyuvantes oleosos. Estas vacunas han tenido un gran éxito en la reducción del número de brotes en muchas partes del mundo donde la enfermedad es enzoótica. Teniendo en cuenta que nuestro objetivo es validar la capacidad inmunoestimuladora de Gal-1 y Gal-8, consideramos que el uso de un antígeno complejo capaz de inducir una respuesta humoral protectora tal como VFA inactivado (VFai) es muy

conveniente para analizar críticamente su potencial como adyuvante. En esta Tesis, reemplazamos el adyuvante oleoso por una dosis única de Gal recombinante durante la inmunización.

2.1 Galectina-8 (pero no Galectina-1) estimula la respuesta inmune específica contra VFA

Para comenzar a estudiar la capacidad inmuno-estimuladora de Gal-8 y Gal-1, inmunizamos ratones BALB/cJ i.p. con una única dosis de: VFAi solo (VFAi), VFAi formulado con adyuvante oleoso (VFAi/adyuvante), VFAi formulado con Gal-8 recombinante (VFAi/Gal-8) o VFAi con Gal-1 recombinante (VFAi/Gal-1). Se realizaron extracciones de sangre a los 0, 7, 14 y 21 días post inmunización (dpi). En primer lugar se midió la presencia de anticuerpos específicos contra VFA en los animales inmunizados, ya que el control de la infección del VFA se debe principalmente a la respuesta humoral generada luego de la vacunación. Como se esperaba, la formulación VFAi/adyuvante provocó una respuesta humoral significativa contra el antígeno (**Figura 8**). Notablemente, los animales inmunizados con VFAi/Gal-8 mostraron un incremento significativo de la respuesta humoral específica, en comparación con los animales vacunados con VFAi solo, esto fue observable desde los 14 dpi y persistieron hasta los 21 dpi. Este incremento fue aún más evidente a los 35 dpi, después de la administración de un refuerzo a los 21 dpi (datos no mostrados). Por el contrario, los ratones inmunizados con VFAi más Gal-1 recombinante no provocaron un aumento de la respuesta anti-VFA en comparación con VFAi solo, incluso después de la administración del refuerzo (datos no mostrados), por lo tanto decidimos continuar ensayando solamente Gal-8. En paralelo, se inmunizaron animales control sin VFAi: PBS, Adyuvante, Gal-8 y Gal-1 solos. Como era de esperar, ninguno de estos grupos provocó respuesta humoral anti-VFA alguna (datos no mostrados).

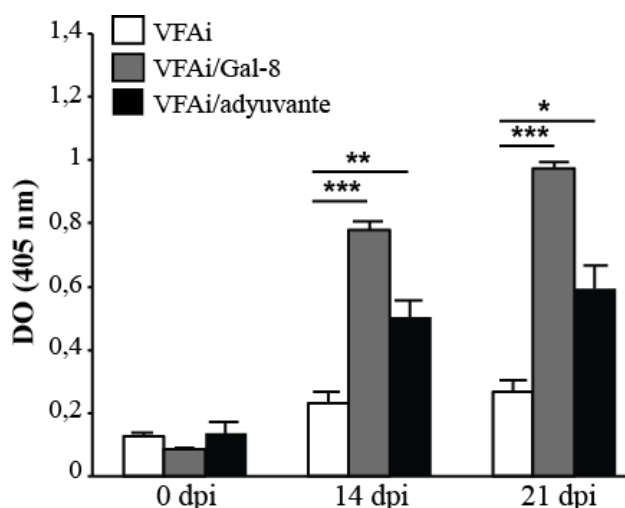


Figura 8. Galectina-8 estimula la respuesta inmune específica contra VFA. Se determinó IgG total anti-VFA mediante ELISA en muestras de suero de ratones vacunados. El protocolo de inmunización y ELISA están detallados en Materiales y Métodos. Los sueros se ensayaron a una dilución 1:20. Los grupos control administrados con Gal-8 o adyuvante oleoso (en ausencia de VFAi) dan valores de DO comparables a los del grupo control (vehículo), y no se incluyeron en el gráfico. Cada barra representa la media de los valores de DO individuales $\pm$ SEM. *** $p < 2 \times 10^{-7}$, ** $p < 0,0005$, * $p < 0,001$ vs. VFAi. Se utilizaron 6 animales por grupo. Estos resultados son representativos de al menos cuatro ensayos independientes.

A continuación, se investigó si los anticuerpos de los animales inmunizados también eran capaces de neutralizar el virus, ya que como se mencionó anteriormente, el control de la viremia está dado por la respuesta inmune humoral neutralizante. Para ello se pre-incubó el virus de aftosa activo en presencia de los sueros de los animales de los diferentes grupos obtenidos a los 21 dpi. Luego estas mezclas fueron utilizadas para infectar una monocapa de células BHK-21, y a las 48 h se midieron los efectos citopáticos (lisis). Cabe destacar que la ausencia de efectos citopáticos en las células BHK-21, denota la presencia de anticuerpos neutralizantes en los sueros de los animales inmunizados. Como se muestra en la **Figura 9**, los sueros obtenidos a partir de 21 dpi del grupo VFAi/Gal-8 muestran los títulos de anticuerpos neutralizantes más altos, en comparación con los del grupo VFAi y, en particular, muy similar a lo observado previamente por el grupo colaborador con el antígeno formulado con el adyuvante comercial (Gnazzo et al. 2013). Nuevamente, como era de esperar, en los sueros de los grupos controles de animales inmunizados sin VFAi: PBS (vehículo) y Gal-8; no se detectaron anticuerpos neutralizantes (**Figura 9**). Hasta aquí, nuestros resultados

demuestran que la sustitución del adyuvante oleoso tradicional por una dosis definida de Gal-8 recombinante es suficiente para provocar una respuesta humoral específica contra el antígeno VFA, caracterizado por un aumento en el título de anticuerpos neutralizantes.

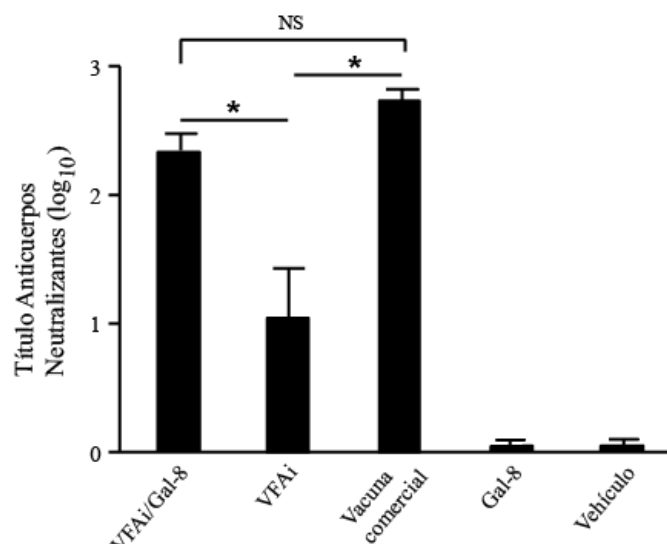


Figura 9. Galectina-8 estimula una respuesta inmune específica contra VFA. El título de anticuerpos neutralizantes se determinó en muestras de suero obtenidas a los 21 dpi. Cada barra representa la media de los valores de DO individuales $\pm$ SEM. (* $p < 0,01$; NS: no significativo). Se utilizaron seis animales por grupo.

2.2- La co-administración de Gal-8 y antígeno aumenta la protección contra el desafío viral

Habiendo demostrado que la formulación que contiene Gal-8 aumenta la respuesta humoral específica anti-VFA, lo próximo que quisimos investigar fue si esta respuesta protege eficazmente *in vivo* contra el desafío con el virus. Para este propósito, los ratones se inmunizaron como antes y luego fueron desafiados a los 21 dpi con el virus i.p. A las 24 h se extrajo sangre que se inoculó sobre una monocapa de células BHK-21. Como se muestra en la **Figura 10 A**, aquellos animales que recibieron VFAi/Gal-8 muestran una reducción significativa en los títulos de viremia respecto a los que recibieron solamente antígeno. Considerando que los animales estaban protegidos (con viremia indetectable) cuando la monocapa de células no presentó efecto citopático, observamos que el nivel de

protección del grupo VFAi/Gal-8 duplicó el del grupo control VFAi (82 vs. 37% de protección, respectivamente) (**Figura 10 B**). Notablemente, este resultado es muy cercano al nivel de protección del 90% conseguido con el antígeno formulado con el adyuvante comercial (Gnazzo et al. 2013). Los ratones inoculados sólo con Gal-8 (sin VFAi) muestran los títulos de viremia similares a los de los animales control con vehículo, indicando que la respuesta inducida por Gal-8 es antígeno específico. En conjunto, nuestros resultados demuestran que el uso de una dosis única de Gal-8 con el antígeno VFAi generó una respuesta inmune eficaz que protege contra el desafío viral.

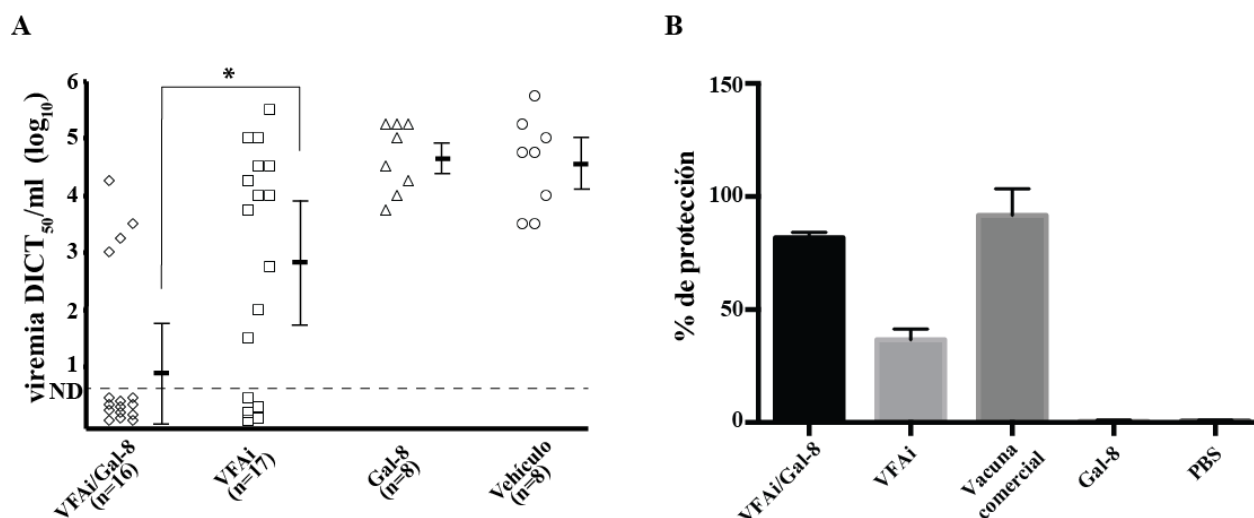


Figura 10. (A) Los animales inmunizados con VFAi/Gal-8 presentan mayor nivel de protección ante la infección viral. Los ratones fueron inmunizados como se describió anteriormente y desafiados a los 21 dpi. Después de 24 h se recogieron muestras de sangre y se calculó la viremia para cada animal como se describe en Materiales y Métodos. Los títulos de viremia corresponden a tres ensayos independientes que fueron agrupados y entre paréntesis se indica el número total de animales por grupo. Las barras representan la media $\pm$ SEM del título de viremia para cada grupo experimental. (* $p < 0,01$; ND: No detectado). **(B)** Los porcentajes de protección se calcularon como: $100 \times (\text{ratones protegidos} / \text{ratones desafiados})$.

En paralelo, quisimos determinar si la respuesta humoral inducida en presencia de Gal-8 estaba también acompañada por la activación de la respuesta celular. Con este objetivo, decidimos evaluar el nivel de citoquinas pro-inflamatorias previamente descritas en la respuesta temprana con la vacuna contra VFA en el modelo experimental murino (Quattrocchi et al. 2013). Para ello, cultivamos esplenocitos provenientes de animales sacrificados a distintos tiempos post-inmunización: 24 h, 48 h, 5 y 21 días.

Luego de 48 h de cultivo cosechamos los sobrenadantes para medir IL-6 e IFN-g por la técnica de ELISA. En primer lugar evaluamos los tiempos tempranos ya que postulamos para Gal-8 un efecto estimulador en el inicio de la respuesta inmune. A las 24 h post-inmunización no se detectaron cambios en el nivel de secreción de dichas citoquinas (datos no mostrados). Sin embargo, a las 48 h post-inmunización se detectó un aumento significativo de ambas citoquinas en el grupo inmunizado con Gal-8 y virus (VFAi + Gal-8) (Ver **Figura 11**). El grupo control inmunizado sólo con Gal-8 muestra un aumento significativo de secreción de IL-6, aunque de menor magnitud. Al día 5 post-inmunización, los niveles de citoquinas vuelven a los valores basales, los cuales se mantienen inclusive hasta el día 21 post-inmunización (datos no mostrados). Cabe destacar que en el caso de los esplenocitos provenientes de ratones sacrificados a los 21 días post-inmunización, los mismos fueron reestimulados *in vitro* con distintas dosis del VFAi purificado (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que Gal-8 activaría el inicio temprano de la respuesta inmune adaptativa contra VFA, estimulado a tiempos cortos (48 h post-inmunización) la secreción temprana de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e INF-g. Esto a su vez llevaría a un eficaz desarrollo de la respuesta de anticuerpos neutralizantes, y por consiguiente, un incremento en el nivel de protección contra la infección viral.

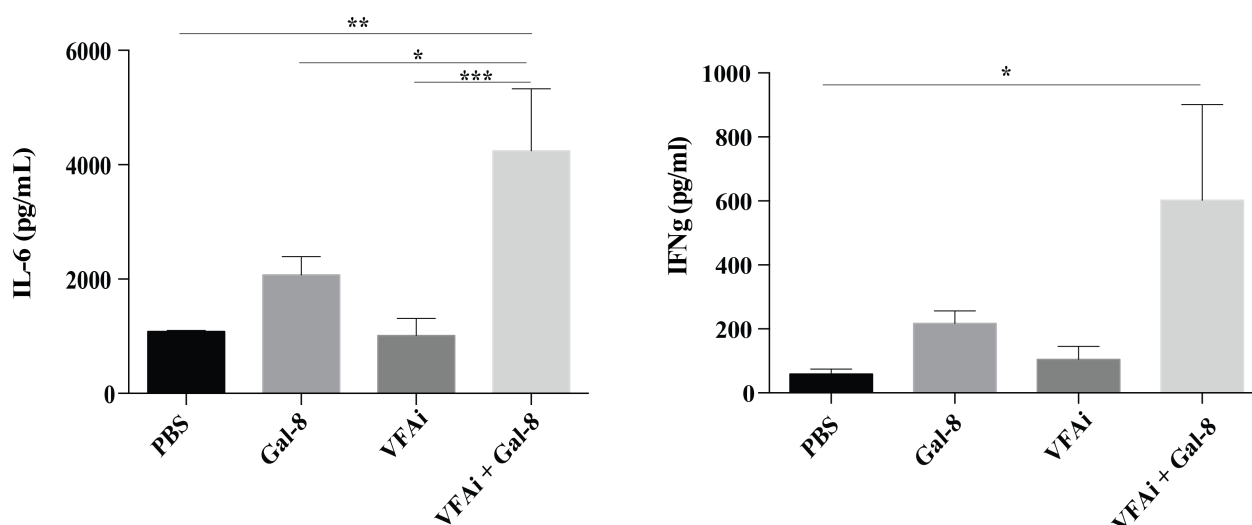


Figura 11. Secreción de IL-6 e IFN-g en cultivos primarios de esplenocitos de ratones inmunizados. Cuantificación de los niveles de secreción de IL-6 e INF-g por ELISA en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos de animales sacrificados 48 h post-inmunización con VFAi (n=4), VFAi/Gal-8 (n=4), y los controles Gal-8 (n=2) y PBS (n=2) (controles sin VFAi). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Estos resultados son representativos de dos ensayos independientes.

Analizamos también si este aumento en la secreción de IL-6 e IFN-g se encontraba acompañado de una activación de la respuesta celular T. Para ello, cultivamos esplenocitos provenientes de ratones de 24, 48 h, 5 y 21 días post-inmunización para analizar la proliferación por incorporación de timidina tritiada. Cabe destacar que en el caso de los esplenocitos provenientes de ratones sacrificados a los 5 y 21 dpi, los mismos fueron re-estimulados *in vitro* con distintas dosis del VFAi purificado (datos no mostrados). Cuando analizamos la proliferación basal (sin re-estimar) de esplenocitos provenientes de tiempos cortos post-inmunización (pi), observamos que a las 24 h pi no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (**Figura 12 A**). A las 48 h pi, observamos que el grupo VFAi no muestra un aumento estadísticamente significativo en la respuesta T contra el grupo control (PBS). Sin embargo, cuando los animales son inmunizados con VFAi + Gal-8, éstos sí aumentan significativamente la proliferación respecto del grupo control (PBS) (**Figura 12 B**). Estos resultados se correlacionan con el incremento en la secreción de citoquinas a las 48 h pi observado en la **Figura 11**. Por último, cuando se re-estimularon los esplenocitos provenientes de ratones sacrificados a

los 5 y 21 dpi, no se encontraron diferencias significativas en los índices de proliferación (datos no mostrados).

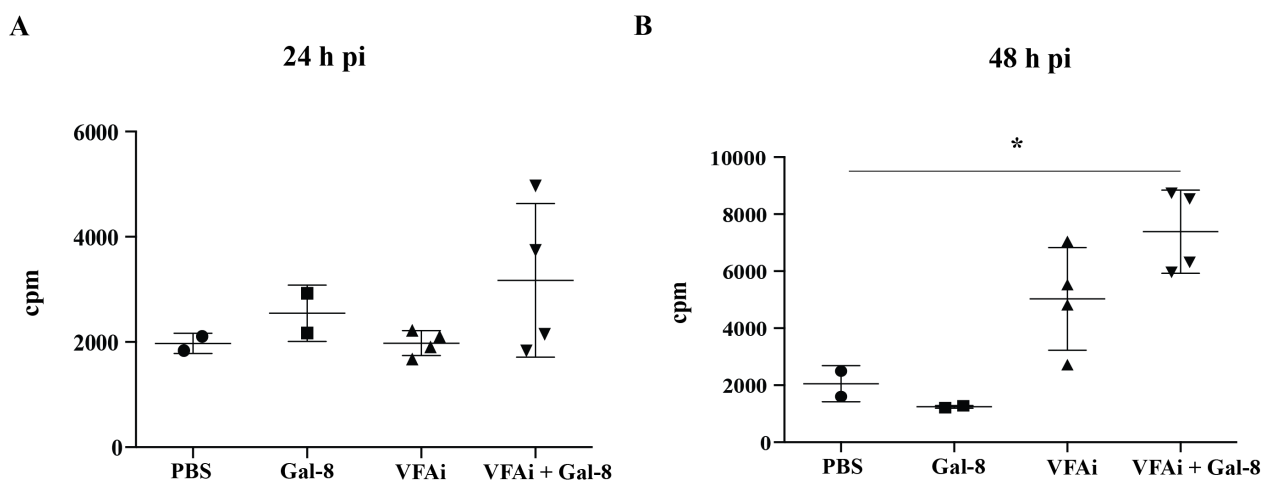


Figura 12. Proliferación basal de esplenocitos con 24 y 48 horas post-inmunización. Cultivamos 5×10^5 esplenocitos durante 24 h, provenientes de animales sacrificados 24 (A) y 48 h (B) post-inmunización con VFAi (n=4), VFAi + Gal-8 (n=4), y los controles Gal-8 (n=2) y PBS (n=2) (controles sin VFAi). La proliferación se midió por incorporación de timidina tritiada, que fue agregada al inicio del cultivo. (* $p < 0.05$).

A partir del aumento de interleuquinas (IL-6 e IFN- γ) descripto a las 48 h post-inmunización, decidimos investigar si esto se encontraba precedido por un incremento en la activación de las células dendríticas, reflejado en la expresión de moléculas coestimuladoras de dichas células en los animales inmunizados. Dado que la inmunización se realiza vía intraperitoneal, consideramos adecuado analizar las células dendríticas residentes del bazo; y como el incremento de dichas citoquinas se observa a las 48 h decidimos estudiar la expresión de las moléculas CD80, CD86 y MHCII en esta población, a las 24 h pi. Luego de sacrificar los animales, realizamos la extracción del bazo y obtuvimos la suspensión de células tratando con colagenasa D. Luego, marcamos con los anticuerpos comerciales correspondientes y analizamos por citometría de flujo la expresión de las moléculas coestimuladoras en las células CD11c⁺ para determinar su estado de madurez. Como se puede observar en la **Figura 13**, no se encontraron

diferencias significativas en la expresión de las moléculas coestimuladoras de las células dendríticas de bazo entre los distintos grupos.

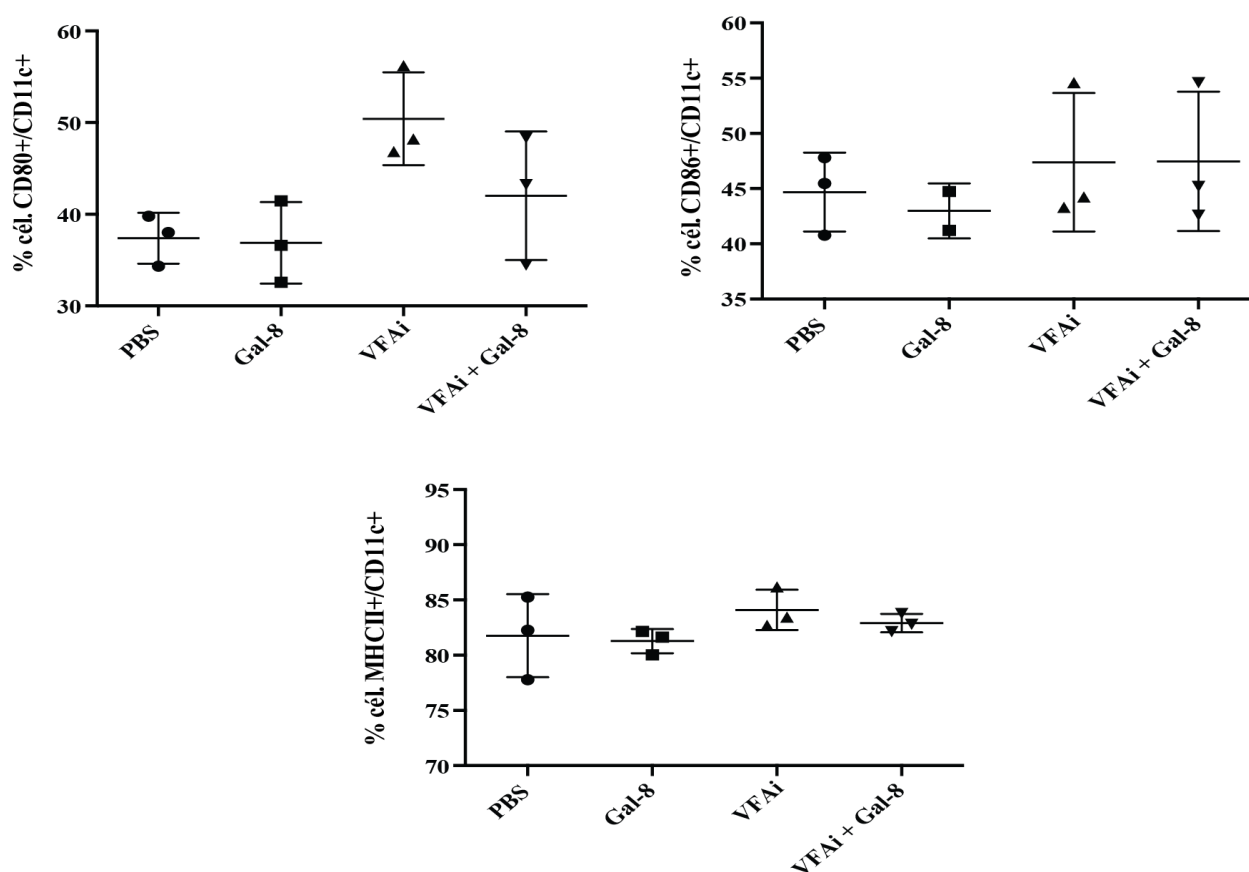


Figura 13. Expresión de moléculas coestimuladoras de células dendríticas de bazo. Se analizaron por citometría de flujo la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y MHCII) de las células dendríticas (CD11c+) de bazo de ratones de los siguientes grupos: VFAi (n=3), VFAi/Gal-8 (n=3), y los controles Gal-8 (n=3) y PBS (n=3) (controles sin VFAi). Los animales fueron sacrificados 24 h pi. Los resultados son representativos de 2 ensayos independientes.

3- Efecto de Gal-8 en células dendríticas derivadas de médula ósea

El efecto de Gal-8 de adyuvan la respuesta inmune antígeno específica tanto en el modelo transgénico DO11.10TCR_{OVA} como en el modelo experimental murino del virus aftoso; nos llevó a investigar si Gal-8 tenía algún efecto activador sobre las células presentadoras de antígeno (CPA). Una posibilidad es que Gal-8 estimule las CPA para sostener la activación T, luego del *priming*. De hecho, existen varios trabajos que reportan un efecto activador de Gal-1 en células dendríticas (CD) (Fulcher et al. 2006; Perone et al. 2006; Fulcher et al. 2009). En base a estos antecedentes y dado que no existen evidencias en cuanto al rol de Gal-8 sobre la biología de las CD, hemos iniciado el estudio de las funciones de Gal-8 sobre estas células presentadoras. Luego de llevar a cabo en nuestro laboratorio la puesta a punto de la diferenciación de CD a partir de médula ósea de ratón, en presencia de GM-CSF e IL-4, obteniendo entre un 50 y 70% de células CD11c⁺ (chequeado por citometría de flujo); comenzamos a evaluar el efecto del agregado de Gal-8 recombinante en estos cultivos primarios. Lo primero que quisimos evaluar fue la expresión de las moléculas coestimuladoras en las células CD11c⁺ por citometría de flujo, para analizar el nivel de madurez (activación) de las CD. De esta manera observamos que las células incubadas *on* en presencia de 5 μ M de Gal-8 expresan mayores niveles de expresión de CD80, CD86 y MHC II; evidenciado por un aumento del índice medio de fluorescencia graficado en los histogramas de la **Figura 14**. Estos ensayos fueron realizados en presencia de polimixina B para descartar cualquier efecto relacionado con contaminación de LPS en la producción de la galectina recombinante. Como control se muestra la expresión de moléculas coestimuladoras de CD tratadas con LPS en ausencia de Polimixina B. Estos resultados demuestran que el efecto activador de CD es específico de Gal-8. Este efecto se observó a partir de una concentración de 0,5 μ M de Gal-8; y a partir de 2 h de incubación (datos no mostrados). Estos hallazgos sugieren que Gal-8 tendría un efecto activador sobre las CD, dado que el aumento de expresión de moléculas coestimuladoras es típico de un fenotipo de célula dendrítica madura o activa.

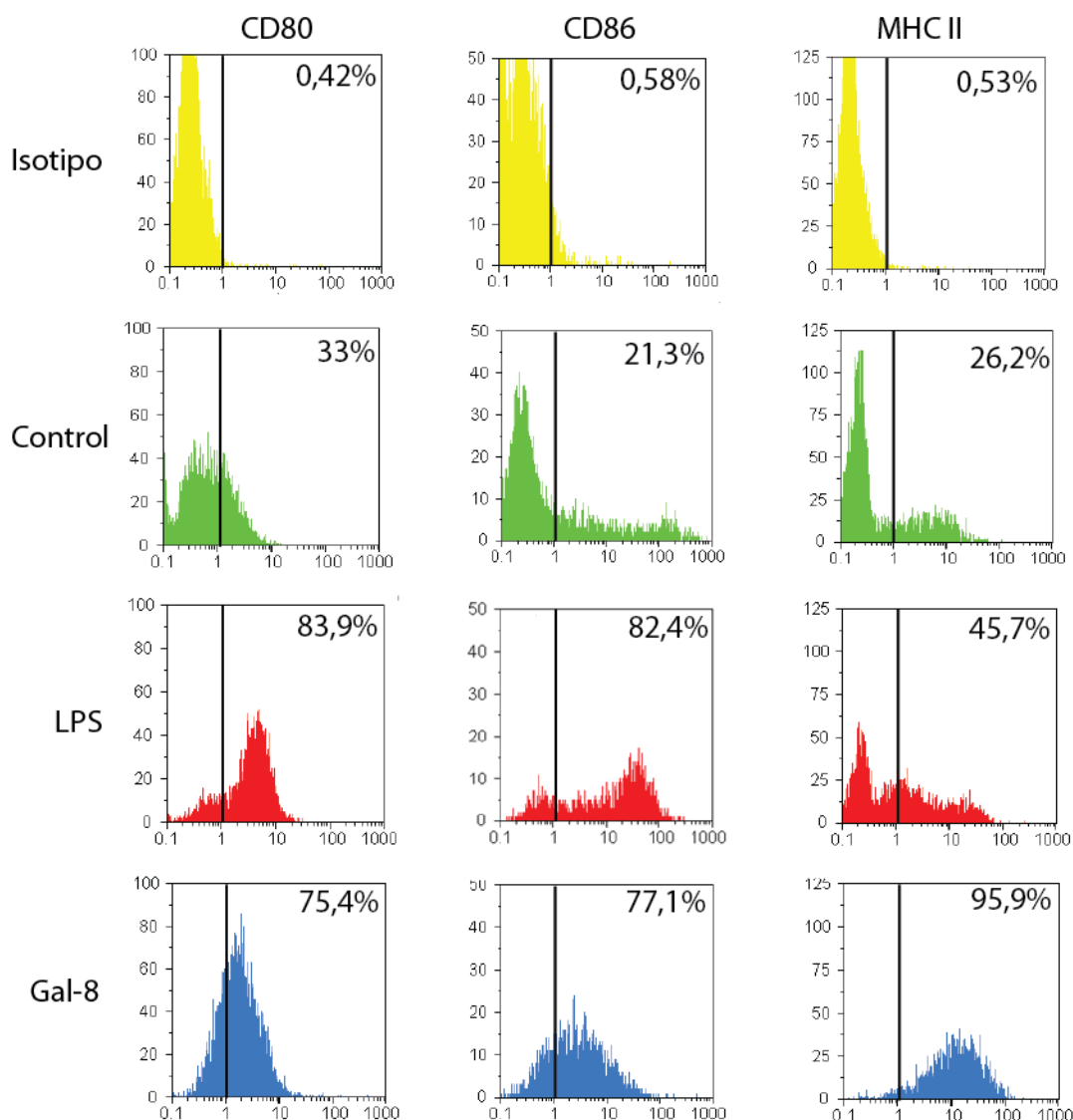


Figura 14. Expresión de moléculas coestimuladoras. Las CD inmaduras fueron activadas *on* en presencia de LPS (500 ng/ml), 5 μ M de Gal-8 o PBS (control). Las CD fueron pre-incubadas con 15 μ g/ml de Polymixina B 1 h previo a la estimulación. Luego las CD fueron cosechadas y marcadas para diferentes moléculas de superficie con anticuerpos monoclonales específicos. Para el análisis por citometría de flujo se seleccionaron las células CD11c⁺. Se grafica el IFM (índice de fluorescencia media), y se indica el % de células dobles positivas.

Para evaluar la especificidad del efecto ejercido por Gal-8 sobre las CD, se repitió el ensayo pre-incubando las células con lactosa. Encontramos que la lactosa inhibe solo parcialmente el aumento de expresión de las moléculas coestimuladoras inducido por Gal-8 (datos no mostrados), sugiriendo que este efecto podría depender también de la interacción con otros glicanos.

Sorprendentemente observamos también un aumento en el porcentaje de células CD11c⁺ luego del tratamiento *on* en presencia de Gal-8. Para confirmar que este efecto era dependiente de la actividad de lectina de Gal-8, realizamos controles pre-incubando con lactosa. Observamos que el efecto era inhibido por la presencia de este azúcar (**Figura 15**). Estos resultados sugieren que Gal-8 favorecería la diferenciación a células dendríticas.

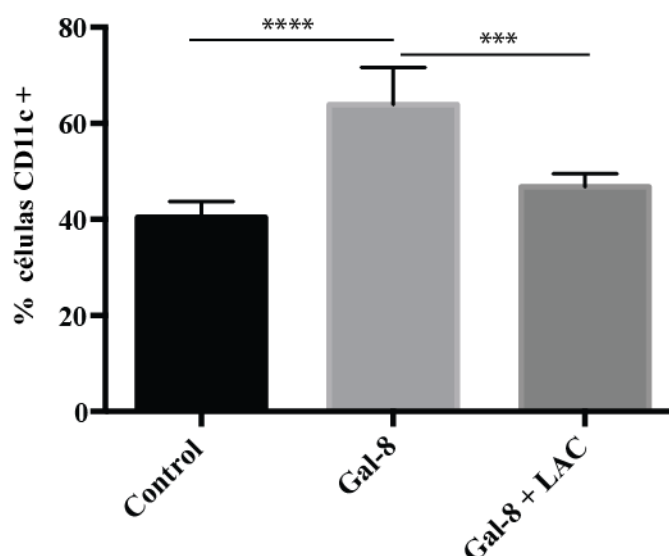


Figura 15. Galectina-8 favorece la diferenciación a células dendríticas. Las CD inmaduras fueron activadas *on* en presencia de 2 μ M de Gal-8, PBS (control) o pre-incubadas con 30 mM de lactosa previo al agregado de 2 μ M de Gal-8 (Gal-8 + LAC). Luego las CD fueron cosechadas y marcadas con un anticuerpo monoclonal específico para CD11c y se analizó su expresión por citometría de flujo. Se graficó el % de células positivas para dicha molécula. En este gráfico se agruparon datos de más de 3 ensayos independientes. (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.

En cuanto a su morfología, observamos que estas células también muestran un fenotipo de células activadas/maduras, con una gran formación y prolongación de dendritas. Este fenotipo se observó por microscopía de epifluorescencia, marcando actina con faloidina-Alexa488 y los núcelos con DAPI, para mejorar su visualización (**Figura 16**).

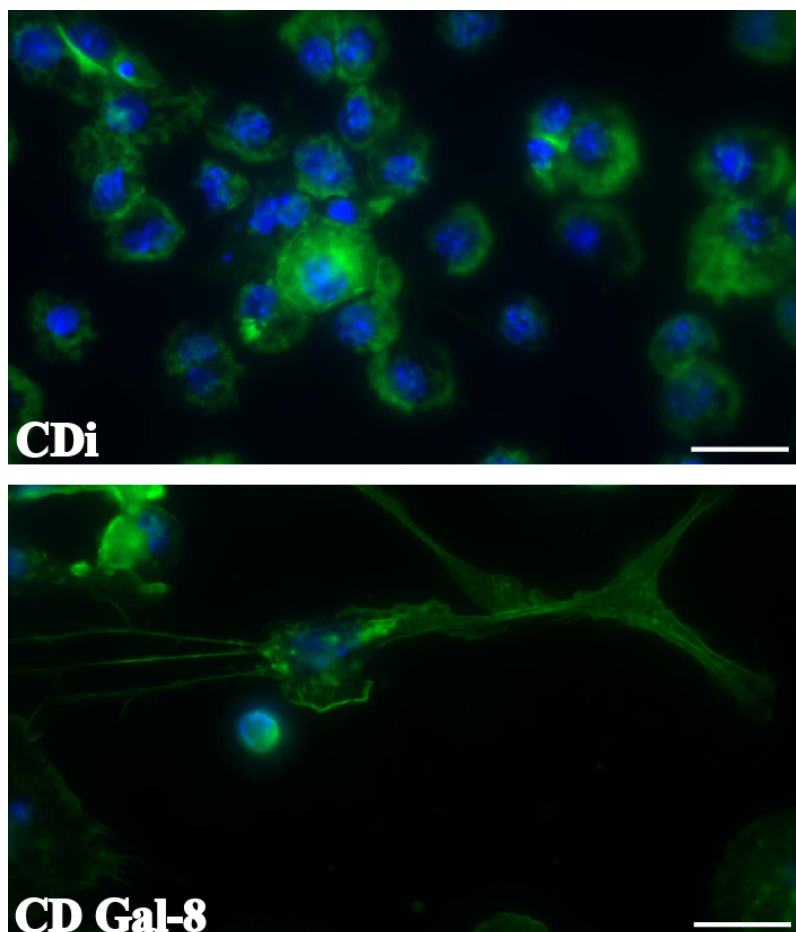


Figura 16. Morfología de células dendríticas activadas en presencia de Gal-8. Se analizó la morfología de CD inmaduras y CD pre-tratadas *on* con Gal-8 de 2 μ M por epifluorescencia, marcando los filamentos de actina con faloidina-Alexa488 y los núcleos con DAPI. Se incubaron las CD con 10 μ g/ml de Polimixina B previo a los tratamientos. La escala representa 10 μ m.

Se continuó el estudio del efecto activador de Gal-8 sobre las CD realizando ensayos funcionales. Con este objetivo, llevamos a cabo experimentos tendientes a dilucidar si las CD activadas en presencia de Gal-8 eran capaces de estimular la respuesta T antígeno-específica. Para tal fin, se enfrentaron CD pre-tratadas con Gal-8 durante 18 h (CD Gal-8) con linfocitos T CD4 antígeno-específicos (provenientes de ratones transgénicos DO11.10TCR_{OVA}), junto con dosis bajas del péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉. Como control positivo se utilizaron CD pre-tratadas con LPS (CDm) y como control negativo CD sin tratar (CDi). Según se observa en la **Figura 17**, las CD presentan el antígeno a las células T específicas de manera eficiente, indicando en primer lugar que

son funcionalmente activas. Más aún, cuando estas CD fueron pre-incubadas con diferentes dosis de Gal-8 recombinante (0,5 y 1 μ M), se vio un incremento significativo en la proliferación de las células T con respecto a las CD sin tratar, lo cual significa que el tratamiento con Gal-8 lleva a una presentación antigénica más eficiente. Este incremento en la capacidad de presentación antigénica inducido por Gal-8 es similar al obtenido con CD activadas en presencia de LPS (control positivo). En todos los tratamientos, los controles de CD + T en ausencia de antígeno prácticamente no proliferaron más allá del nivel basal, permitiendo así descartar cualquier efecto inespecífico de las CD sobre la activación de las células T.

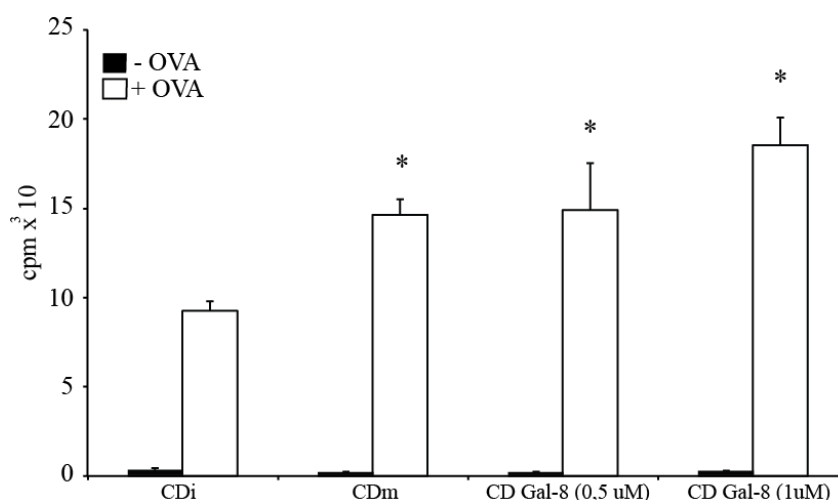


Figura 17. Ensayo de presentación antigénica de CD tratadas con Gal-8. Se cultivaron CD pre-tratadas con Gal-8 durante 18 h (CD Gal-8) con linfocitos T CD4 antígeno específicos purificados de esplenocitos de ratones transgénicos DO11.10TCR_{OVA}, junto con 0,1 μ g/ml del péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ (Relación CD:T 1:10). Como control positivo se utilizaron CD pre-tratadas con 500 ng/ml de LPS (CDm) y como control negativo CD sin tratar (CDi). Se midió la proliferación por incorporación de Timidina-tritiada. (* $p < 0,05$ vs CDi). Estos resultados son representativos de tres ensayos independientes.

Con el objetivo de seguir caracterizando las CD activadas en presencia de Gal-8, decidimos estudiar el perfil de citoquinas que secreta dicha población. La primera citoquina que analizamos fue IL-12, ya que es una de las principales citoquinas que producen las CD maduras, y que participa en la inducción de la polarización a una respuesta Th1. Por lo tanto, cuantificamos la producción de IL-12p70 por ELISA en sobrenadantes de CD pre-tratadas *on* con Gal-8. Sorprendentemente, al igual que las CD

control (inmaduras) no se detectaron niveles de IL-12 en los sobrenadantes CD tratadas con Gal-8. Cabe destacar, que en el control positivo de sobrenadante de CD activadas con LPS, sí se observó un fuerte incremento de IL-12 (**Figura 18**).

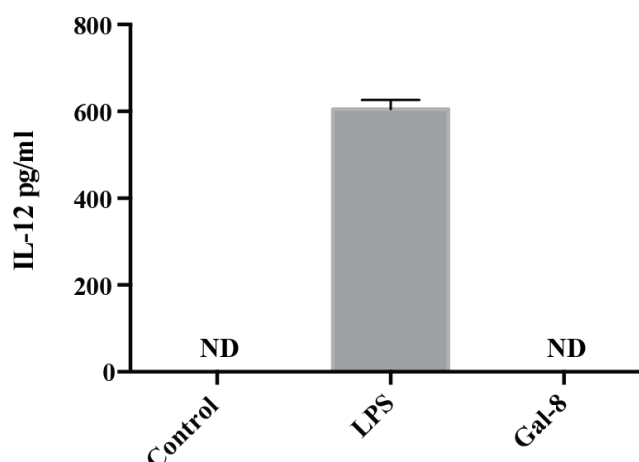


Figura 18. Secreción de IL-12. Se cultivaron 1×10^6 células dendríticas diferenciadas de médula ósea de un ratón BALB/cJ en presencia de PBS (Control), 0,5 μ M de Gal-8 *on* (Gal-8) o 500 ng/ml de LPS *on* (LPS). Luego se midió IL-12(p70) en los sobrenadantes por ELISA (Biolegend). (ND: No detectable).

Con el fin de conocer en mayor detalle qué tipo de moléculas son secretadas por las CD cuando son activadas en presencia de Gal-8, realizamos un “screening” utilizando un *array* de citoquinas (Mouse Cytokine Array, RayBiotech). Brevemente, el ensayo consiste en incubar membranas comerciales que tienen inmovilizados distintos anticuerpos de captura específicos para varias citoquinas (ver **Figura 19 A**) en presencia de sobrenadantes de CD cultivadas en diferentes condiciones, que luego de ser incubadas con los anticuerpos de detección correspondientes, son revelados por quimioluminiscencia. En la **Figuras 19 B y C** se muestra la cuantificación de las citoquinas secretadas en base a la señal obtenida en los *arrays*, medido por densitometría. El nivel de producción de cada citoquina se cuantificó como la relación entre la señal obtenida en el *array* de CD tratadas con Gal-8 y la señal obtenida en el *array* de CD sin tratar (control) (*fold increase* o incremento). Asimismo, cada uno de los *arrays* fue normalizado usando las señales de sus propios controles internos antes de calcular dicha relación. Se puede apreciar que el

tratamiento con Gal-8 induce la secreción de varias citoquinas proinflamatorias tales como IL-3, IL-2, IL-6, TNF- α , MCP-1 y MCP-5 así como factores de crecimiento (G-CSF). De todas ellas, la IL-6 es la molécula que más se destaca por su importante incremento. Además, en concordancia con el resultado de la **Figura 18**, en el *array* tampoco se observa un aumento en la secreción de IL-12 por parte de las CD Gal-8.

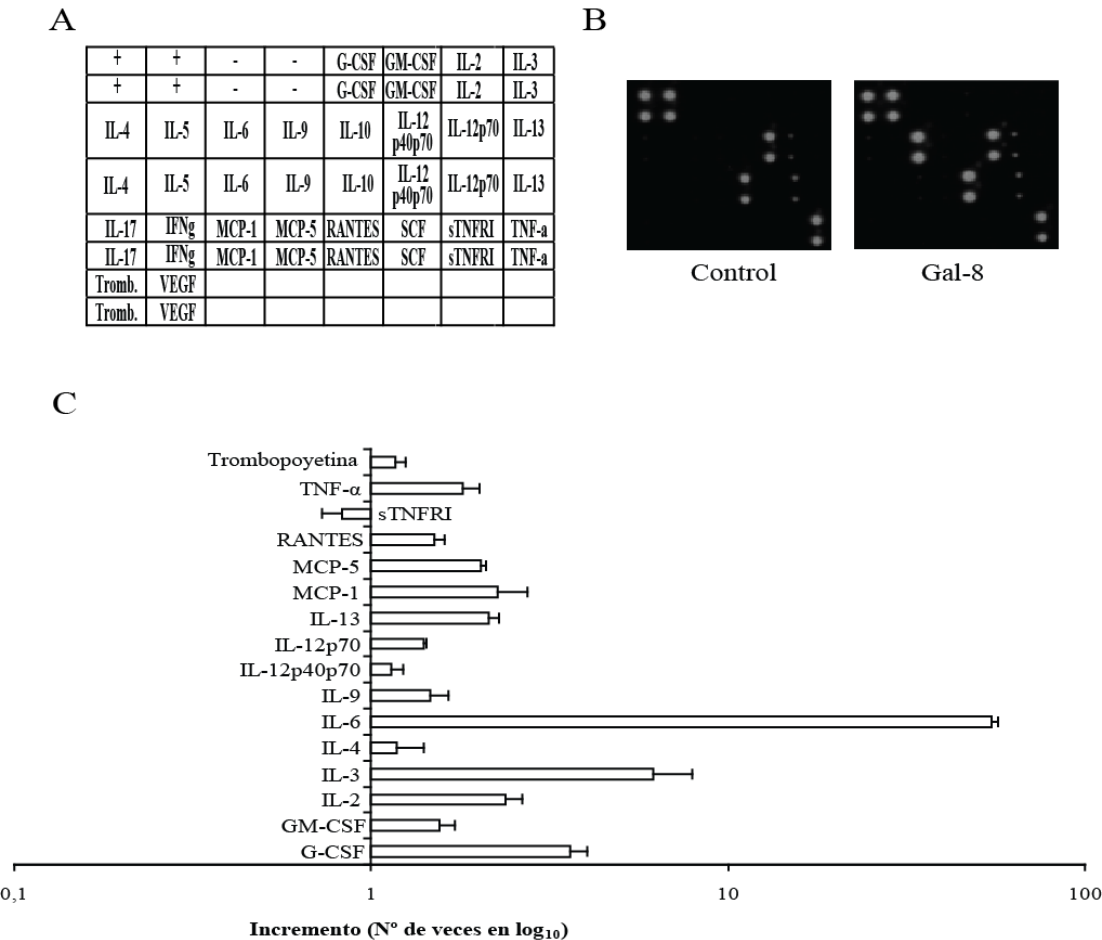


Figura 19. Perfil de citoquinas secretadas por las células dendríticas activadas con Gal-8. Se cultivaron 1×10^6 células dendríticas diferenciadas de médula ósea de un ratón BALB/cJ en presencia de $0,5 \mu\text{M}$ de Gal-8 on (Gal-8) o de PBS (Control). Luego se incubaron las membranas (Mouse Cytokine Array, RayBiotech) con los sobrenadantes de dichos cultivos. Y se revelaron tal como se describe en Mat. y Mét. Las citoquinas presentes en el array se muestran en la tabla (A). La cuantificación de las citoquinas secretadas es en base a la señal obtenida en los *arrays* medida por densitometría (B). El nivel de producción de cada citoquina se cuantificó como la relación entre la señal obtenida en el *array* de CD tratadas con Gal-8 y la señal obtenida en el *array* de CD control (*fold increase* o incremento) (C).

Con el objetivo de confirmar los resultados del *array* de citoquinas seleccionamos la IL-6, en primer lugar por su marcado aumento, y en segundo lugar, por ser una citoquina con un rol pro-inflamatorio bien definido. Para ello, repetimos los ensayos de estimulación de CD en presencia de Gal-8 y medimos los niveles de IL-6 en sobrenadante de cultivo por ELISA. De esta manera, pudimos confirmar que el tratamiento con Gal-8 induce un fuerte incremento en la secreción de IL-6, confirmando los resultados previos; y que este aumento es inhibido por lactosa (**Figura 20**). El experimento que se muestra en la **Figura 20**, es representativo de múltiples mediciones de IL-6 en sobrenadante de CD. Cabe destacar que se seleccionó dicho experimento ya que las CD fueron diferenciadas a partir de médula de ratones C3H/HeJ. Estos ratones son portadores de una mutación en el gen del receptor tipo Toll 4, y son no respondedores a endotoxinas bacterianas (LPS), sirviendo como un control más para adjudicar el efecto de activación a la galectina, y no a una contaminación bacteriana durante su preparación.

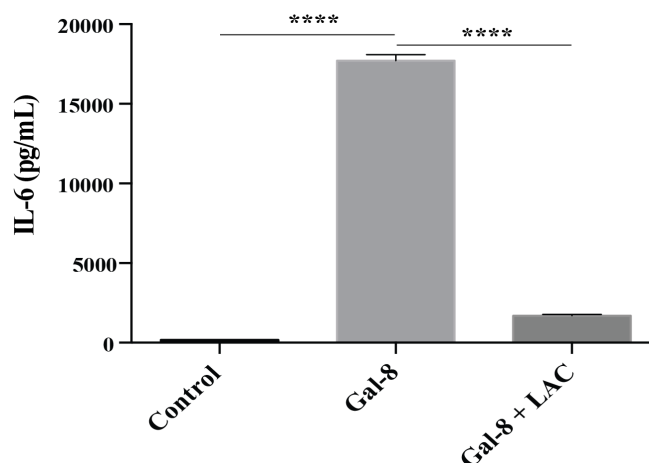


Figura 20. Secreción de IL-6 por parte de las CD activadas con Gal-8. Se diferenciaron células dendríticas de médula de ratón C3H/HeJ en presencia de GM-CSF e IL-4 como se describe en materiales y métodos. Luego se trataron con 2 μ M de Gal-8, PBS (Control) o se pre-incubaron con lactosa 30 mM previo al agregado de 2 μ M de Gal-8 (Gal-8 + LAC). A las 18 h se cosecharon los sobrenadantes para medir la citoquina por ELISA. (**** p <0,0001).

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica que juega un papel importante en la inducción de la respuesta antígeno específica (Rochman et al. 2005); y además está

involucrada en la producción de inmunoglobulinas, ya que promueve la diferenciación a células plasmáticas (Hirano et al. 1986). Teniendo en cuenta nuestros resultados donde, por un lado, observamos un incremento en la secreción de IL-6 en los animales inmunizados con VF_{AI} + Gal-8 (**Figura 11**), y por otro, un incremento en la secreción de esta misma citoquina por parte de las CD tratadas con Gal-8 (**Figura 20**), nos planteamos la posibilidad de que el efecto co-estimulador de la respuesta inmune antígeno-específica ya descrito en nuestro laboratorio (Tribulatti et al. 2009), se encuentre mediado por IL-6. En primer lugar, para estudiar si Gal-8 efectivamente se encuentra involucrada en el efecto co-estimulador inducido por Gal-8, repetimos los ensayos de co-estimulación con esplenocitos de ratón DO11.10TCR_{OVA} (tal como se describió para la **Figura 2**), para luego medir la producción de IL-6 en sobrenadante de dichos cultivos. Tal como se muestra en la **Figura 21 A**, existe un aumento en la producción de IL-6 en presencia de Gal-8 independiente de la presencia del antígeno. De hecho, el solo agregado de péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ no produce cambios significativo con respecto al control de células sin estimular. En paralelo, se muestra la proliferación celular (medida por incorporación de timidina tritiada) para ese mismo ensayo, donde se confirma el efecto co-estimulador de Gal-8, y donde además se evidencia que la secreción de IL-6 no es consecuencia directa de un aumento en la proliferación celular (**Figura 21 B**).

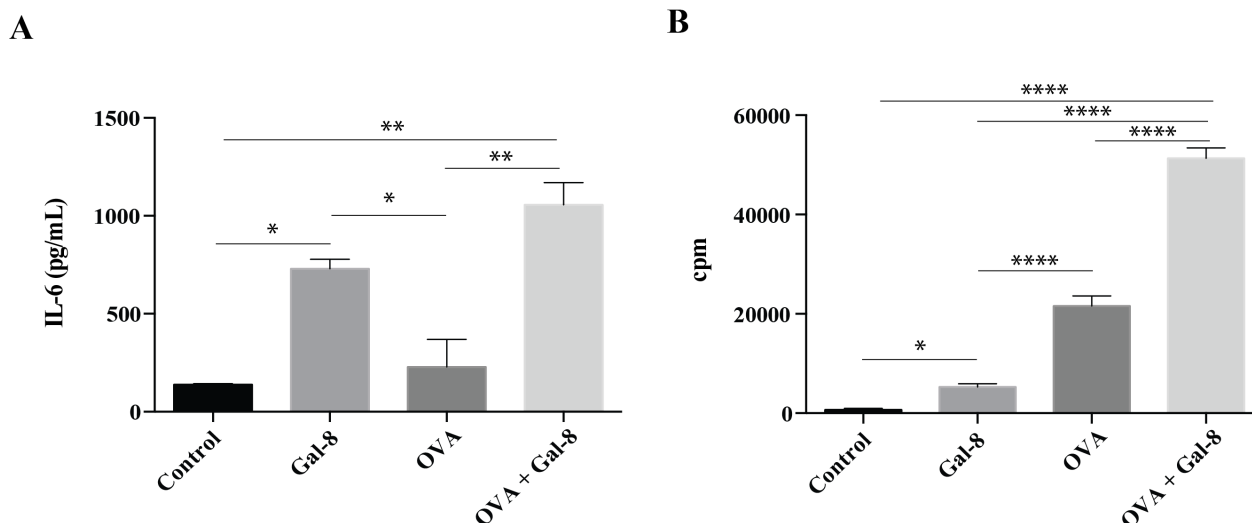


Figura 21. Aumento de IL-6 durante la co-estimulación inducida por Gal-8. Se cultivaron 3×10^5 esplenocitos de ratones DO11.10TCR_{OVA} en presencia de 0,2 μ M de Gal-8 (Gal-8), 0,1 μ g/ml del péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ (OVA), 0,1 μ g/ml del péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ junto con Gal-8 0,2 μ M (OVA + Gal-8), y sin tratar (control). A las 24 h, se cosecharon los sobrenadantes para medir IL-6 por ELISA (A). En un ensayo paralelo, se midió la proliferación a las 48 h por incorporación de timida tritiada (B). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$). Estos resultados son representativos de dos ensayos independientes.

Lo siguiente que quisimos dilucidar fue si el aumento de IL-6 generado por Gal-8 juega un rol en la inducción del efecto co-estimulador. Para ello repetimos los ensayos de co-estimulación con esplenocitos de ratón DO11.10TCR_{OVA} en presencia de un anticuerpo monoclonal neutralizante de IL-6 o su control de isotipo (Biolegend). Notablemente, tal como se muestra en la **Figura 22**, la neutralización de IL-6 inhibe el efecto co-estimulador inducido por Gal-8 (OVA + Gal-8 + aIL-6), mostrando una proliferación de igual magnitud que cuando se incubaba solo con el antígeno (OVA₃₂₃₋₃₃₉); esta disminución es específica del bloqueo de IL-6, ya que el control con el isotipo (OVA + Gal-8 + Iso) no muestra diferencias con respecto al efecto co-estimulador inducido por Gal-8 en presencia de antígeno (OVA + Gal-8). Cabe destacar que la respuesta específica al péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ no es dependiente de IL-6, ya que no hay cambios en la proliferación en presencia del anticuerpo neutralizante (OVA + aIL-6), así como tampoco en presencia del control de isotipo (OVA + Iso).

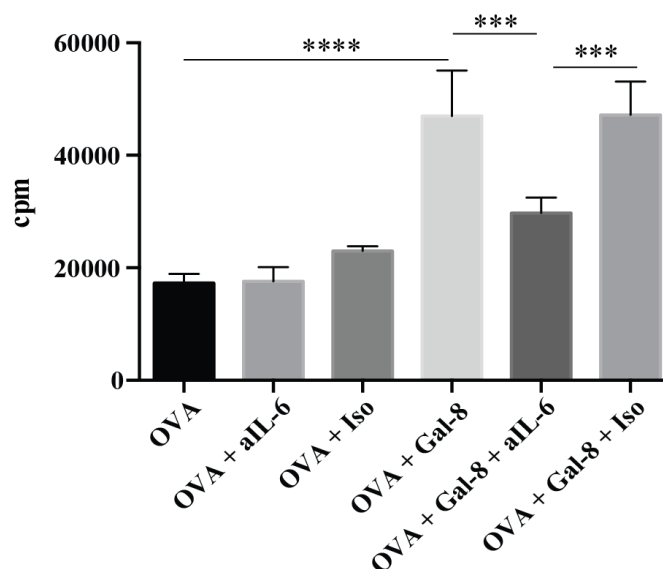


Figura 22. La neutralización de IL-6 bloquea el efecto co-estimulador inducido por Gal-8. Se cultivaron 3×10^5 esplenocitos de ratones DO11.10 en presencia de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ del péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ (OVA); 0,1 $\mu\text{g/ml}$ del péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ junto con Gal-8 0,2 μM (OVA + Gal-8). Para bloquear la IL-6 se utilizó un anticuerpo monoclonal neutralizante de IL-6 1 $\mu\text{g/ml}$ (aIL-6) o su control de isotipo (Iso) (Biolegend). La proliferación se midió por incorporación de timida tritiada. Estos resultados son representativos de tres ensayos independientes. (***) $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Anteriormente hemos descripto que en el modelo de co-estimulación inducida por Gal-8, las células blanco que proliferan son los linfocitos T CD4 y que es necesaria la presencia en simultáneo de las células presentadoras de antígeno (CPA) y los T CD4 para que Gal-8 induzca el efector co-estimulador en presencia de antígeno (ver **Figura 6**). Por otro lado, Gal-8 estimula a las CD a secretar IL-6 (**Figura 20**), la cual a su vez se encuentra involucrada en la inducción del efecto co-estimulador (**Figura 22**). En un intento de avanzar en el estudio de la participación de las CD, decidimos iniciar ensayos de co-estimulación usando CD aisladas como CPA. Para ello cultivamos CD purificadas de bazo o derivadas de médula ósea, con linfocitos T CD4 purificados de ratón DO11.10TCR_{OVA} en presencia del péptido de OVA₃₂₃₋₃₃₉ y Gal-8. Probablemente debido a distintas variables a ajustar (concentración de antígeno, relación CD/T CD4, etc.) y la baja cantidad de células que rinde el procedimiento, no hemos logrado recapitular aún la co-estimulación en este modelo que involucra sólo dos tipos celulares (datos no mostrados). Actualmente nos encontramos poniendo a punto las distintas condiciones de este ensayo para confirmar la participación de las CD en el efecto co-estimulador.

inducido por Gal-8, y al mismo tiempo analizar si se requiere también la eventual participación de otra CPA, tales como las linfocitos B. En relación a esto último, se ha descrito que Gal-8 está involucrada en promover la secreción de IL-6 en linfocitos B y su diferenciación a células plasmáticas (Tsai et al. 2011).

4- Estudio de galectina-8 endógena en células dendríticas

Hasta aquí hemos estudiado los efectos del agregado de Gal-8 exógena en cultivos de CD derivados de médula ósea de ratón. Teniendo en cuenta que la expresión de dicha galectina ha sido reportada previamente en células dendríticas humanas derivadas de monocitos de sangre periférica (Mobergslien and Sioud 2011), quisimos determinar en primer lugar la expresión endógena de Gal-8 en células dendríticas de ratón. Para ello diferenciamos células dendríticas a partir de médula ósea de ratón BALB/cJ (CD) en presencia de GM-CSF e IL-4. Al día 14 cosechamos CD inmaduras y CD maduras (estas últimas activadas *on* con LPS), preparamos los extractos celulares, y los resolvimos por SDS-PAGE, para luego revelar por *Western Blot* la expresión de Gal-8. Para ello utilizamos un anticuerpo policlonal de conejo anti-Gal-8 producido en el laboratorio, purificado primero por cromatografía de afinidad a proteína A y luego por afinidad a Gal-8 como se describe en Materiales y Métodos. Como control de carga, se midió la expresión de tubulina. Como se observa en la **Figura 23 A**, se confirmó la expresión de Gal-8 en las CD derivadas de médula ósea de ratón (CDi y CDm). Notablemente, la expresión de Gal-8 se vio aumentada en las CD activadas con LPS (CDm). Por otro lado, no se encontraron diferencias en la expresión de tubulina, confirmando que el aumento observado de Gal-8 es específico de la activación de las células, y no de una diferencia de carga proteica en los lisados. También estudiamos la expresión de Gal-8 por citometría de flujo en CDi y CDm, tanto permeabilizadas como sin permeabilizar. Tal como se observa en los histogramas de la **Figura 23 B**, las CDm permeabilizadas presentan mayor expresión de Gal-8 que las CDi. En el gráfico de barras se evidencia el aumento significativo de Gal-8 cuando las CD son activadas con LPS, medido como índice de fluorescencia media (IFM). En cuanto a las CD sin permeabilizar no se encontraron diferencias en la expresión de Gal-8 (datos no mostrados). Cabe destacar que las Gals son exportadas al medio extracelular por un mecanismo no-clásico, ya que carecen de péptido señal, y su mecanismo aún no se ha podido esclarecer (Varki et al. 1999). Si bien una fracción es secretada, una parte actúa a nivel parácrino o autócrino uniéndose a la superficie celular mediante la interacción con glicoconjugados. Quizás el aumento de

Gal-8 inducido en la activación de las CD, detectado cuando se permeabilizan dichas células, esté siendo secretado al medio extracelular, y por ello no se pueda medir en la superficie.

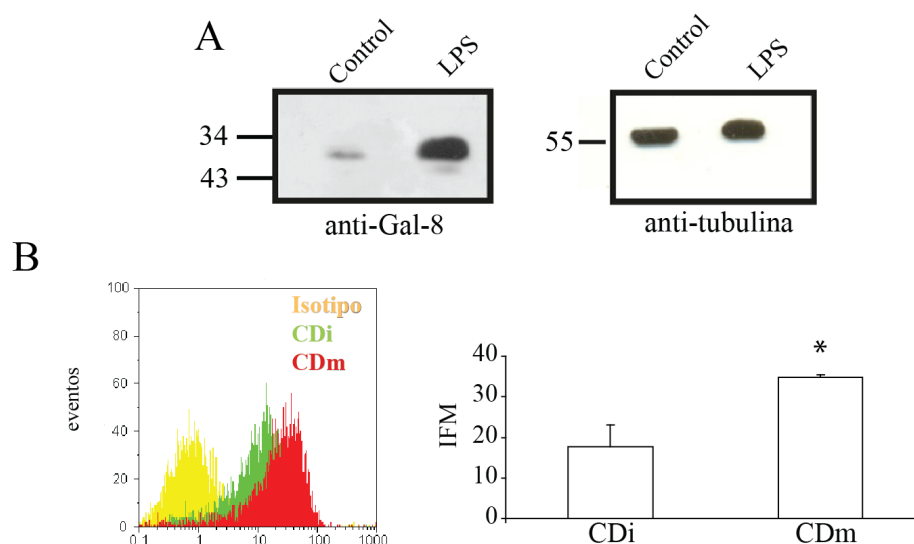


Figura 23. Expresión de Gal-8 en células dendríticas. Se cultivaron células dendríticas diferenciadas de médula ósea de ratones BLAB/cJ. Al día 13 se estimularon *on* con 500 ng/mL de LPS (LPS o CDm) o PBS (Control o CDi). **(A)** Expresión de Gal-8 en CD por *Western Blot*. **(B)** Expresión de Gal-8 por citometría de flujo en CD (CD11c+) permeabilizadas. El control de isotipo son CD permeabilizadas incubadas con IgG de conejo normal como control del anti-Gal-8. Se grafica el índice de fluorescencia medio (IFM). (* $p < 0,05$).

El hecho de que Gal-8 se encuentre aumentada en las CD luego de ser activadas con LPS, sumado a el efecto activador de esta lectina sobre esta población celular, nos llevó a plantear si la ausencia de Gal-8 afecta de alguna manera su funcionalidad. En el laboratorio contamos con el ratón *knock out* para Gal-8 (*Lgals8^{-/-}*) como una herramienta esencial para llevar a cabo nuestro estudio. En primer lugar, nos dispusimos a la obtención del ratón *Lgals8^{-/-}* en el *background* genético C57BL/6J mediante sucesivas retrocruzas y genotipificaciones, tal como se detalla en la sección de Materiales y Métodos, logrando un 95% de *background* genómico C57BL/6J. Luego, diferenciamos células dendríticas de ratones *Lgals8^{-/-}* y su control *wt* (C57BL/6J) en presencia de GM-

CSF e IL-4 como se describió anteriormente. Lo primero que analizamos fue la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y MHC-II, tanto en CD inmaduras como maduras, activadas en presencia de una concentración baja de LPS (50 ng/ml). Cuando analizamos por citometría de flujo la expresión de dichas moléculas, observamos que la expresión de CD86 se encuentra disminuida significativamente en las CD *Lgals8*^{-/-}, tanto inmaduras como maduras, con respecto a su contraparte *wt* (**Figura 24**). Esta disminución se evidencia aún cuando las CD se tratan con dosis mayores de LPS, hasta 500 ng/ml (datos no mostrados). Con respecto a la expresión de CD80 y MHCII, no se observaron diferencias entre las CD de ratones *Lgals8*^{-/-} y su control *wt*, tanto en CD inmaduras como maduras (datos no mostrados).

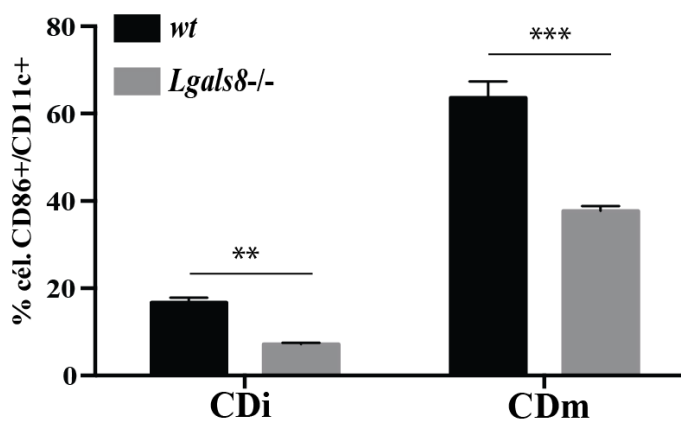


Figura 24. Expresión de CD86 en células dendríticas *Lgals8*^{-/-}. Se cultivaron células dendríticas diferenciadas de médula ósea de ratones *Lgals8*^{-/-} y su control *wt* (C57BL/6J). Al día 13 se estimularon *on* con 50 ng/mL de LPS (CDm) o PBS (CDi). Se marcaron las CD con anticuerpos monoclonales para CD86 y CD11c. Se analizó por citometría de flujo el porcentaje de células CD11c⁺ que expresan CD86, y se graficó el porcentaje de células dobles positivas. Los umbrales de marca positiva se establecieron con los respectivos controles de isotipo (***p*<0,01; ****p*<0,001). Este ensayo es representativo de al menos de cuatro experimentos independientes.

Hemos descripto previamente que el agregado de Gal-8 en CD induce un perfil netamente activado, caracterizado por un incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras junto con una marcada secreción de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-6 (**Figura 20**). A partir de la menor expresión de CD86 en las CDm *Lgals8*^{-/-},

decidimos evaluar si la secreción de IL-6 se encontraba también afectada en estas células *knock out*. Para ello diferenciamos CDLgals8^{-/-} y *wt*, las activamos *on* con LPS 50 ng/ml, y medimos por ELISA la cantidad de IL-6 en sobrenadantes de cultivos. En la **Figura 25**, se observa una disminución significativa en los niveles de IL-6 secretada por las CDi Lgals8^{-/-}, con respecto a su control *wt*. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la producción de esta citoquina entre las CDLgals8^{-/-} y *wt*, luego de la activación en presencia de LPS; aunque se observa cierta tendencia a la disminución en las CDLgals8^{-/-}.

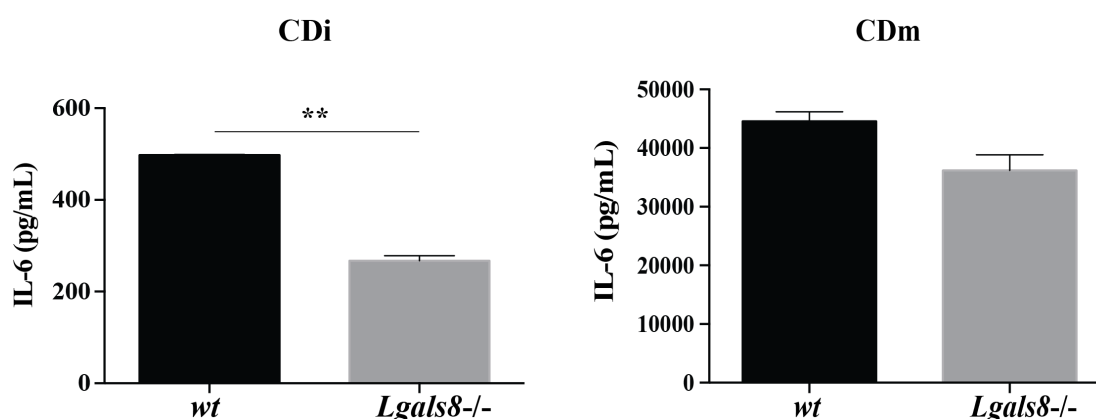
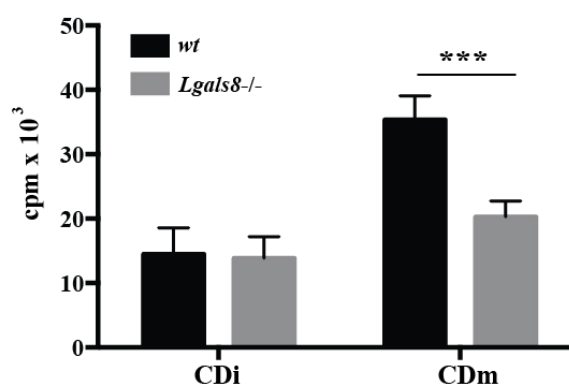


Figura 25. Producción de IL-6 en CDi y CDm de ratón Lgals8^{-/-}. Se diferenciaron células dendríticas de médula de ratón Lgals8^{-/-} y su control *wt* en presencia de GM-CSF e IL-4 como se describió anteriormente. Luego se activaron las CD con 50 ng/ml de LPS (CDm) o PBS (CDi). A las 24 h se cosecharon los sobrenadantes para medir IL-6 por ELISA. (***p*<0,01).

Por último, nos preguntamos si las CDLgals8^{-/-} tenían alguna diferencia en su capacidad de estimular las células T en la respuesta antígeno-específica. Para ello, enfrentamos CDi y CDm de ratones Lgals8^{-/-} y su control *wt* con células T CD4 purificadas de un ratón OTII-TCR_{OVA} (*background* genético C57BL6/J) en presencia del péptido de OVA₃₂₃₋₃₃₉. Luego de 48 h de cultivo, medimos la proliferación celular por incorporación de timidina tritiada. Como se observa en la **Figura 26 A**, no se encontraron diferencias en la capacidad de presentación antigénica de las CDi entre ambos grupos. Sin embargo, cuando las CD fueron activadas *on* en presencia de 50 ng/ml de LPS,

observamos que las CDm *Lgals8*^{-/-} presentan una menor capacidad para estimular la respuesta T, con respecto a las CDm *wt*. En la **Figura 26 B**, se graficó el índice de proliferación (IP) para cada grupo, calculado como la relación entre la proliferación inducida por las CDm sobre CDi. De esta manera se evidencia como el IP en las CD*Lgals8*^{-/-} es significativamente menor que su control *wt*, indicando así que la ausencia de Gal-8 en las CD resulta en una capacidad alterada para inducir la respuesta T antígeno-específica.

A



B

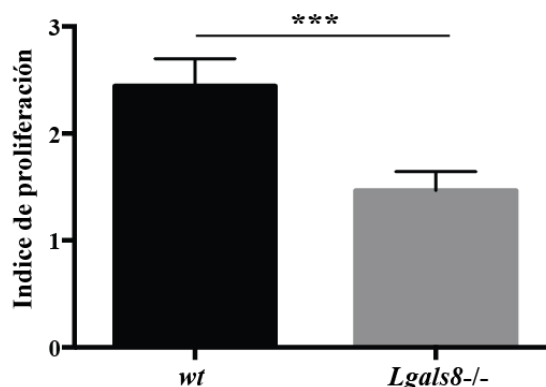


Figura 26. Ensayo de presentación antigénica de CD *Lgals8*^{-/-}. Se cultivaron células dendríticas diferenciadas de médula ósea de ratones *Lgals8*^{-/-} y su control *wt* (C57BL/6J). Al día 13 se estimularon *on* con 50 ng/mL de LPS (CDm) o PBS (CDi). Luego se co-cultivaron con células T CD4 de un ratón OTIITCR_{OVA} durante 48 h en presencia de 0,1 µg/ml del péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉, y se midió proliferación celular por incorporación de timidina tritiada (A) Se calculó el índice de proliferación para cada grupo como: cpmCDm/cpmCDi (B). (***) $p < 0,001$. Estos resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Nuestros resultados muestran que las *CDLgals8^{-/-}* presentan un perfil más inmaduro y menos activo que su contraparte *wt*, con menores niveles de expresión de CD86 (**Figura 24**), menor producción de IL-6 (**Figura 25**) y una capacidad disminuida para estimular la respuesta T antígeno-específica (**Figura 26**). Teniendo en cuenta que estas diferencias son más evidentes luego de activar las CD con LPS, junto con el hecho de que esta activación induce la expresión de Gal-8 (**Figura 23**), postulamos un rol para la Gal-8 endógena en el desarrollo de CD maduras y funcionales.

DISCUSIÓN

Al presente se ha acumulado un cuerpo de evidencia suficiente como para posicionar las Gals dentro de los principales mediadores de la respuesta inmune innata y adaptativa. Estas proteínas han surgido como uno de los principales mediadores que participan en varios procesos, tales como la interacción huésped-patógeno, trastornos inflamatorios y autoinmunidad, inducción de tolerancia materno-fetal, y mantenimiento de la tolerancia propia (Liu and Rabinovich 2010). Por lo tanto, resulta crucial entender cómo las Gals participan en el control de la homeostasis celular del sistema inmune y los mecanismos subyacentes. Dado que algunas Gals pueden estar presentes simultáneamente en el mismo microambiente, la interacción entre estas lectinas es uno de los aspectos clave que están emergiendo, y que abordamos durante el desarrollo de esta Tesis.

En la presente Tesis, describimos por primera vez un efecto activador de Gal-1 sobre células T *naïve*, lo cual queda demostrado por la inducción de co-estimulación y proliferación, esta última inducida en forma de quimera Gal-1-8-1. Esto constituye un nuevo rol para dicha Gal, dado que la mayoría de los artículos previos se centran en su papel pro-apoptótico en células T inmaduras o activadas, pero no en células T *naïve*. Hemos demostrado que Gal-1 puede co-estimular respuestas *borderline* de células T antígeno-específicas, tal como habíamos descrito anteriormente para Gal-8 (Tribulatti et al. 2009). Sin embargo, se necesitan 100 veces más Gal-1 que Gal-8 (20 μM vs. 0,2 μM , respectivamente) para lograr un efecto de igual magnitud (**Figura 2 A**). Esto podría explicarse por el hecho de que las Gals con estructura en tándem (con dos DRC fusionados por un péptido *linker*), son efectores más potentes que las Gals monoméricas. Se ha reportado previamente que la forma activa de Gal-1 (con un único DRC) es el homodímero, y que las formas monomérica y dimérica se encuentran en equilibrio reversible con un K_D aproximado de 7 μM (Cho and Cummings 1995a; Perillo et al. 1995; Cho and Cummings 1995b). Dada esta baja afinidad, se necesitan grandes cantidades de esta proteína para alcanzar la concentración crítica para la formación de dímeros activos lo que se vería reflejado en la alta concentración que se necesita de Gal-1 para alcanzar los niveles de respuesta inducidos por Gal-8 en la co-estimulación de la respuesta T. Se

ha demostrado previamente que dos moléculas de Gal-1 unidas covalentemente inducen apoptosis entre 3-10 veces más potente que la forma monomérica, tanto en timocitos como en linfocitos T CD8 activados (Bättig et al. 2004). Sin embargo, en nuestra experiencia, la estabilización permanente del dímero de Gal-1 mediante el péptido *linker* de Gal-8 (Gal-1-8-1) no indujo una mayor co-estimulación que Gal-1 monomérica sobre los T CD4 *naïve* (**Figura 4 D**), indicando que la estructura no es el único factor determinante. Más bien, las diferencias observadas pueden estar relacionadas con la especificidad de los distintos DRC.

En cuanto a la relevancia de la estructura, en nuestro laboratorio se ha descrito que el efecto co-estimulador inducido por Gal-8 no es dependiente de su estructura en tándem; pero sí es esencial su estructura bivalente para disparar la proliferación de células T en ausencia de antígeno (Cattaneo et al. 2011). En concordancia con estos resultados previos, en esta Tesis se muestra que Gal-1 co-estimula la respuesta T en presencia del péptido de OVA, pero es incapaz de inducir la proliferación T antígeno independiente, inclusive a altas concentraciones (20 μ M) (**Figura 4 A**). Con la estabilización del dímero de Gal-1, este resultado se revierte; y así la quimera Gal-1-8-1 es capaz de inducir la proliferación T, aunque fue necesario usar una concentración 10 veces mayor para igualar el efecto de Gal-8 (**Figura 4 C**). Nuevamente, es de destacar que las diferencias en la potencia con que las distintas Gals ejercen sus efectos sobre la respuesta T, pueden estar relacionadas a la especificidad de sus DRC. En relación a esto, los cultivos de esplenocitos mostraron fenotipos diferentes cuando son cultivados con estas Gals: en presencia de Gal-8 las células se observaron adheridas y extendidas; mientras que en presencia de Gal-1-8-1 se observaron fuertemente aglutinadas (**Figura 5**).

El bloqueo de las vías de señalización establecidas del TCR (Lck, PI3K, PKC, MAPK p38, y ERK) inhibió la co-estimulación inducida tanto por Gal-1 como Gal-8, lo cual indica que en realidad estas Gals actúan potenciando las señales débiles de respuestas *bordeline* del TCR, como es en presencia de dosis subóptimas de antígeno (**Figura 3**). CD45 es una mucina muy abundante de la superficie celular, que está fuertemente glicosilada, y es un ligando común para Gal-1 y Gal-8 (Perillo et al. 1995;

Tribulatti et al. 2009). Ha sido demostrado que su actividad de PTPasa está implicada en la proliferación y en la co-estimulación inducidas por Gal-8. Es muy probable que la interacción entre Gal-8 y CD45 disminuya el umbral de activación del TCR por desfosforilación del sitio inhibitorio Tyr505 de Lck (Tribulatti et al. 2009). Como se muestra en la **Figura 3 A**, la actividad PTPasa de CD45 también participa en la co-estimulación inducida por Gal-1. A pesar que el CD45 es un receptor bien establecido de Gal-1, su participación en la apoptosis inducida por Gal-1 sigue siendo controvertido. Earl et al., reportaron que la unión de Gal-1 a CD45 en las células T y la posterior inducción de muerte celular son eventos controlados por los cambios en la glicosilación, la cual está regulada durante el desarrollo, así como también por la expresión de glicoformas específicas del CD45 (Earl et al. 2010). Resta aún dilucidar el mecanismo por el cual Gal-1 y Gal-8 modulan la actividad PTPasa del CD45 para inducir la co-estimulación de células T.

A pesar de que las células T CD4 constituyen las células blanco del efecto co-estimulador, tanto Gal-1 como Gal-8 tienen que unirse a las CPA y a las células T CD4 de manera simultánea para lograr la activación completa del TCR, en presencia de antígeno (**Figura 6**). Posiblemente, la unión de Gal-8 y Gal-1 estabilice la sinapsis inmunológica durante la presentación antigénica; fortaleciendo así la señalización del TCR, lo que resulta en un respuesta aumentada, particularmente cuando las señales de antígeno son débiles (*borderline*). Otra posibilidad es que Gal-8 y el antígeno deban estar presentes en silmultáneo al encontrarse con las CPA, y que ambos sigan la misma vía endocítica. Para probar esta hipótesis, realizaremos a futuro ensayos pre-tratando las CPA junto con Gal-8 y el antígeno, para luego enfrentarlas a los T CD4.

El hecho de que Gal-1 y Gal-8 estimulen las células T en reposo, pero que ejerzan un efecto anti-proliferativo luego de que éstas se activan (**Figura 2 D**), propone un rol dual para estas lectinas: por un lado aumentando las respuestas inmunes normales o fisiológicas, especialmente cuando el estímulo es limitado; y por otro, restringiendo la fase efectora de las respuestas en curso o exacerbadas. De acuerdo con nuestros resultados, Perillo et al., demostraron que Gal-1 induce apoptosis de PBMCs activados

con PHA, pero que es incapaz de ejercer el mismo efecto sobre las células T periféricas humanas *naïve* (Perillo et al. 1995). Más aún, se demostró que, a pesar de que Gal-1 induce la apoptosis de células T pre-activadas en presencia de Con-A, también promueve la supervivencia de las células T en reposo sin inducir la proliferación (Endharti et al. 2005). En contraste con nuestras observaciones y las de otros grupos de investigación, Matarrese et al., observaron que Gal-1 sensibiliza los linfocitos T humanos en reposo a la muerte celular mediada por Fas y que, a altas dosis, es capaz de inducir apoptosis en estas células primarias (Matarrese et al. 2005). Estas discrepancias pueden reflejar las diferentes especies utilizadas (humano vs. ratón), diferentes preparaciones de proteínas, o el método utilizado para evaluar la muerte celular debido a que los autores miden exposición de fosfatidilserina, la cual no está necesariamente asociada con la apoptosis inducida por Gal-1 (Stowell et al. 2009b). En nuestro caso, el efecto anti-proliferativo que ejercen Gal-1 y Gal-8 sobre linfocitos T pre-activados no pudo ser asociado a la inducción de muerte celular, siendo necesarios nuevos estudios que permitan establecer fehacientemente el mecanismo por el cual estas Gals ejercen dicho efecto.

Cuando estudiamos la participación de ambas Gals en el inicio de la respuesta inmune *in vivo*, observamos que una única dosis de 25 µg de Gal-1 o Gal-8, administrada junto con una dosis subóptima de antígeno, fue suficiente para aumentar la respuesta celular T (**Figura 7 B**). Estos resultados nos llevaron a postular a estas lectinas como posibles adyuvantes para ser utilizados en preparaciones vacunales. Es por ello que con el objetivo de profundizar en el estudio de la capacidad inmunoestimuladora de estas Gals, utilizamos un antígeno complejo y bien caracterizado, tal como lo es el antígeno inactivo del virus de la fiebre aftosa (VFAi). Consideramos que este antígeno, utilizado en la vacunación contra la fiebre aftosa, es un modelo más genuino que el modelo transgénico DO11.10TCR_{OVA} para analizar de manera crítica el potencial como adyuvantes de Gal-1 y Gal-8. En este modelo donde la respuesta inmune protectora es humoral y neutralizante, los animales que son inmunizados solamente con el virus inactivo, en ausencia de adyuvante, ya desarrollan una respuesta *per se*, que les confiere una protección del 30-40% frente al desafío con el virus infectivo. La administración de Gal-8 en conjunto con

el virus inactivo aumentó los títulos de IgG totales específicas contra VFAi y de neutralizantes, lo cual se tradujo en un aumento en el porcentaje de protección, a niveles comparables a la vacuna comercial (Gnazzo et al. 2013) (**Figuras 8 a 10**). En el caso de la inmunización usando Gal-1, no se observaron diferencias en el título de anticuerpos específicos (incluso luego de la administración de un refuerzo al día 21 post-inmunización y el seguimiento hasta el día 35). Tal vez sea necesario usar una mayor concentración de Gal-1, ya que como se describió al comienzo de esta Tesis, se necesitaron 100 veces más Gal-1 que Gal-8 para lograr una co-estimulación T de igual magnitud. Esto podría explicarse dado que, a diferencia de Gal-8, Gal-1 debe dimerizar para alcanzar su forma activa, lo cual sólo ocurre a altas concentraciones de esta lectina (Cho and Cummings 1995a; Perillo et al. 1995; Cho and Cummings 1995b). Sin embargo, el hecho de que una misma dosis de Gal-8 y Gal-1 haya sido suficiente para estimular la respuesta celular T antígeno-específica en el modelo DO11.10TCR_{OVA}, nos lleva a plantear otras posibilidades; por ejemplo, considerar que las distintas especificidades entre los DRC sea suficiente para que tengan diferentes actividades. Otra posibilidad es que el efecto de las Gals tenga dependencia con el tipo de antígeno utilizado, ya que se sabe que distintos antígenos pueden dar respuestas diferentes. En este contexto, cabe destacar que si bien Gal-8 es capaz de montar una respuesta humoral en el modelo vacunal de VFA, esta Gal fue incapaz de incrementar el título de anticuerpos específicos cuando fue administrada junto con OVA en ratones BALBc/J e incluso DO11.10 (datos no mostrados en la Tesis). Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de la existencia de una dependencia con el tipo de antígeno utilizado en el efecto inmunoestimulador de las Gals. A partir de aquí, decidimos continuar exclusivamente con el estudio de la capacidad inmunoestimuladora de Gal-8. Encontramos que la respuesta humoral específica contra VFAi inducida por Gal-8 se encontraba acompañada por un aumento en la respuesta celular temprana, tal como se evidenció a través de la secreción de IL-6 e IFN- γ por parte de los esplenocitos de ratones inmunizados con VFAi/Gal-8, a las 48 h post-inmunización (**Figura 11**). También en este tiempo observamos como los esplenocitos provenientes de los animales del grupo inmunizado con antígeno y Gal-8 tienen

potenciada la respuesta proliferativa (**Figura 12**). La IL-6 es una citoquina pleiotrópica muy importante que interviene en la producción de inmunoglobulinas, promoviendo la diferenciación de células B a células plasmáticas (Hirano et al. 1986). Notablemente, Tsai et al., observaron que tanto Gal-8 como Gal-1 juegan un rol importante en la formación de células plasmáticas. Sin embargo, una diferencia importante entre las dos Gals es que Gal-1 no induce la secreción de IL-6 en células B, mientras que Gal-8 sí lo hace (Tsai et al. 2011). Esta diferencia también podría explicar, al menos en parte, el hecho de que la inmunización con Gal-1 en el modelo murino de aftosa no haya conducido a un aumento de la respuesta humoral, sobretodo teniendo en cuenta que la IL-6 constituye una citoquina importante para la producción de anticuerpos en el modelo de VFA (Ostrowski et al. 2007; Habiela et al. 2014). Según Ostrowski et al., la secreción de IL-6 por medio de las CD pulsadas *in vitro* con el virus inactivo es esencial para la producción de anticuerpos anti-VFA. Resaltan además la importancia de las células de bazo para la producción de anticuerpos y no así la de las células de los ganglios linfáticos (Ostrowski et al. 2007). Sin embargo, cuando nosotros estudiamos la activación de CD de bazo de animales, luego de 24 h post- inmunización, no encontramos diferencias en los niveles de madurez de estas células cuando se usó Gal-8 junto con el antígeno VFai (**Figura 13**). La elección de este tiempo temprano (24 h), se hizo en base a la suposición de que la activación de las CD debía anteceder al pico de IL-6 detectado a las 48 h. Sin embargo, dada la ausencia de diferencias con el grupo inmunizado con Gal-8 + VFai respecto al grupo que recibió sólo VFai, parecería que ambos efectos ocurriesen en simultáneo. Por lo tanto, nos proponemos a futuro analizar los niveles de expresión de moléculas coestimuladoras de las CD de bazo a las 48 h post-inmunización. En conjunto, nuestros hallazgos demuestran que una única dosis de antígeno VFai formulado con Gal-8 desata una respuesta inmune efectiva que protege contra el desafío con virus homólogo, lo cual permite postular esta Gal como potencial adyuvante en algunas preparaciones vacunales. Entre otras posibles ventajas de Gal-8 en esta aplicación, cabe destacarse la ausencia del granuloma asociado a vacunaciones de base oleosa. Por otra parte no se utiliza el tradicional *depot* antigénico dado que tanto el antígeno como Gal-8 se administran en

forma soluble y se extinguirían rápidamente. Además, como se describió anteriormente, en el laboratorio contamos con una Gal-8 mutada (Gal-8mut) que con la sustitución de un residuo canónico de arginina en cada DRC perdió la interacción con los glicanos de baja y media afinidad, pero conservó los de alta, principalmente polilactosaminas y antígenos de grupo sanguíneo; conservando su capacidad co-estimuladora de la respuesta T antígeno específica pero no su capacidad proliferativa, entre otras (Schroeder et al. 2016). Consideramos que el uso de esta proteína es una buena herramienta biotecnológica a ensayar a futuro en un modelo de inmunización, ya que en principio carecería de efectos pro-inflamatorios indeseados.

Hemos demostrado hasta aquí que una simple dosis de Gal-8 es capaz de estimular *in vivo* la respuesta inmune específica, tanto celular como humoral. Si bien estos efectos podrían estar mediados por el proceso co-estimulador que Gal-8 ejerce sobre células T CD4 *naïve in vitro* (Tribulatti et al. 2009), también se debe considerar que Gal-8 puede ejercer diferentes actividades sobre varios tipos celulares cuando es administrada *in vivo*. Por ejemplo, Gal-8 podría estar activando las distintas CPA, sosteniendo así la activación T luego del primer estímulo antigénico. Al respecto, existe una extensa bibliografía sobre Gal-1 y su efecto en células dendríticas. Fulcher et al., observaron que el agregado de Gal-1 recombinante en CD humanas induce un fenotipo maduro caracterizado por un marcado aumento de la expresión de moléculas coestimuladoras, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias tales como la IL-6, y una mayor capacidad para estimular la proliferación de células T. Estos mismos autores describen también que las CD tratadas con Gal-1 presentan una mayor migración a través de la matriz celular, sugiriendo su participación al inicio de la respuesta inmune (Fulcher et al. 2006; Fulcher et al. 2009). Por otro lado, Perone et al., observaron que la sobreexpresión de Gal-1 en CD transgénicas induce un aumento en su habilidad estimuladora de la respuesta T antígeno-específica; mientras que, por el contrario, inducen la apoptosis de células T pre-activadas (Perone et al. 2006). Cabe destacar que en este último artículo los autores ensayan la sobre-expresión de Gal-1 endógena, y sin embargo observan efectos similares a los que describen Fulcher et al. en sus trabajos con el agregado de Gal-1 exógena, tales como la

expresión de mensajeros de citoquinas (IL-6 e IL-12, entre otras). Por el contrario, Ilarregui et al., observaron un fenotipo distinto en CD diferenciadas en presencia de Gal-1, y proponen un rol crítico en la inducción de DC tolerogénicas productoras de IL-27 (Ilarregui et al. 2009). Sin embargo, es importante resaltar que, en este último trabajo, los autores diferencian las CD en presencia de pequeñas cantidades de Gal-1 recombinante, mientras que Fulcher et al., utilizan el agregado de Gal-1 en altas concentraciones y como un estímulo una vez que la CD se encuentran ya diferenciadas. Además, Gal-1 puede tener efectos diferentes dependiendo del contexto en que se encuentre; potenciando respuestas antígeno-específicas *borderline*, e inhibiendo la proliferación de células T activadas, tal como lo describimos en la **Figura 2**. A diferencia de Gal-1, no se contaba con ninguna información acerca de algún potencial efecto de Gal-8 sobre las CD.

En esta Tesis, describimos por primera vez un efecto activador de Gal-8 sobre CD, evidenciado por un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras, una mayor capacidad de presentación antigénica, el desarrollo de un fenotipo típico de una CD madura, y una fuerte producción de IL-6, entre otras citoquinas pro-inflamatorias. En el *array* de citoquinas de sobrenadante de CD tratadas con Gal-8, observamos múltiples citoquinas a destacar por su relevancia biológica. Sin embargo, llamó nuestra atención la ausencia de IL-12, una citoquina cuya secreción se potencia durante los distintos procesos de activación de CD (**Figura 18**). Esto sugiere *a priori*, que Gal-8 induce un mecanismo de activación específico y diferente al de otros estímulos, tales como el LPS. La citoquina pro-inflamatoria mayormente detectada fue la IL-6 (**Figura 19 y 20**). Rochman et al., demostraron que IL-6 juega un rol fisiológico importante en la regulación de la inducción de la respuesta T antígeno específica (Rochman et al. 2005). Estos resultados están en concordancia con los nuestros, donde observamos que el efecto de co-estimulación inducido por Gal-8 en células T está mediado por IL-6 (**Figura 21 y 22**). Además, la IL-6 sirve como un *link* central entre la respuesta celular T y la B (Hunter and Jones 2015), lo cual está en concordancia con el efecto adyuvante de Gal-8 sobre la respuesta inmune humoral en el modelo experimental de vacunación contra VFA. También, debemos resaltar la detección de IL-3, G-CSF y en menor medida GM-CSF.

Estas citoquinas regulan la supervivencia, proliferación, diferenciación y activación de células hematopoyéticas (Metcalf 2008). IL-3 es un factor de crecimiento hematopoyético mieloide (Thomson 1998). Se ha descrito que IL-3 es tan potente como GM-CSF generando CD mieloides humanas (Caux et al. 1993; Ebner et al. 2002), y en timo estimula el crecimiento de precursores de CD (Kelly et al. 2001). Además en cultivos de médula ósea de ratón en presencia de IL-3, se encuentra aumentada la producción de CD mieloides (Baumeister et al. 2003). En parte, este resultado podría explicar el efecto descrito del aumento de células CD11c⁺ en presencia de Gal-8 (**Figura 15**). En menor magnitud, también se detectó en el *array* la secreción de IL-13, MCP-1 y MCP-5. La IL-13 es una citoquina responsable de una gran variedad de efectos en distintos tipos celulares que van desde el incremento de MHC-II en monocitos, a la producción de IgG e IgM en células B (Joshi et al. 2006). MCP-1 y MCP-5 son quemoquinas involucradas en la migración e infiltración de monocitos, linfocitos T, células NK, entre otras (Sarafi et al. 1997; Deshmane et al. 2009). Anteriormente en el laboratorio, habíamos descrito que Gal-8 también induce en el endotelio la secreción de múltiples quemoquinas y citoquinas tales como CCL-2, CCL-5 e IL-6, entre otras; las cuales favorecen el reclutamiento de células involucradas en procesos inflamatorios (Cattaneo et al. 2014). En conjunto, los resultados presentados en esta Tesis demuestran un rol activador integral de Gal-8 sobre células dendríticas. En la **Figura 27**, se esquematiza un modelo teórico del efecto activador de Gal-8 en células dendríticas que lleva a una mayor respuesta T antígeno dependiente, donde se encuentra involucrada la secreción de IL-6. Además, se propone la participación de los linfocitos B, su diferenciación hacia células plasmáticas con la producción de inmunoglobulinas (Tsai et al. 2011). Este modelo propuesto, se encuentra en concordancia con la respuesta observada en la inmunización con Gal-8 en el modelo del virus de aftosa.

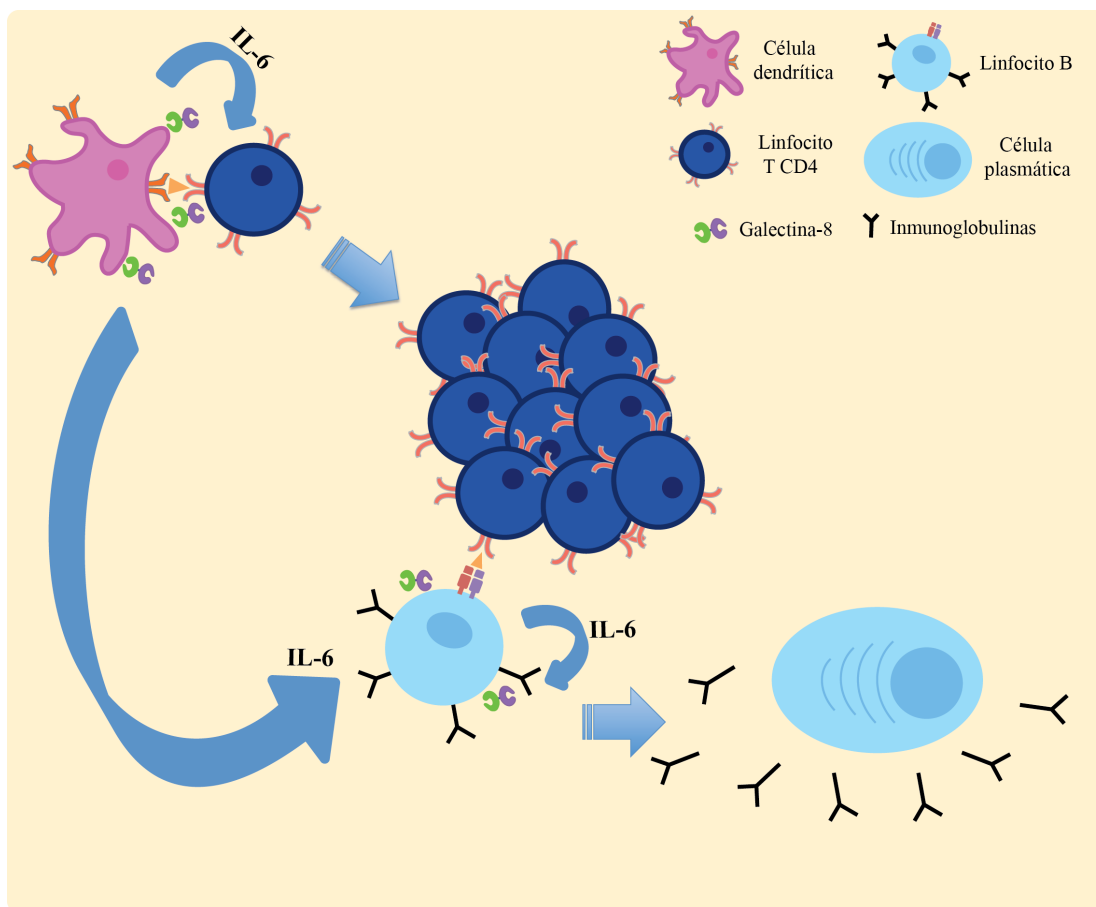


Figura 27. Modelo teórico sobre los efectos de Gal-8 en células dendríticas.

Ya desde hace algunos años, en el laboratorio estamos proponiendo la participación de Gal-8 en procesos inflamatorios. Apoyan esta hipótesis diversos hallazgos, principalmente el rol activador descrito sobre plaquetas, donde el agregado de Gal-8 induce el *spreading* y la liberación del contenido de los gránulos, la activación de linfocitos T CD4 *naïve*; y más recientemente, la activación de células endoteliales, caracterizada por la exposición del factor de von Willebrand, la secreción de moléculas pro-inflamatorias y la fosforilación de NFκB (Romaniuk et al. 2010; Cattaneo et al. 2014). A estos resultados se suma ahora el efecto activador de Gal-8 sobre las células dendríticas, descrito en esta Tesis. Estos hallazgos fueron observados mediante el agregado de Gal-8 recombinante, en un rango muy amplio de concentraciones que va desde 0,1 a 5 μM . Sin embargo, también hemos observado un incremento de Gal-8 endógena luego de la activación; por ejemplo, las plaquetas activadas con trombina exponen mayores niveles de

Gal-8 en su superficie, y el endotelio activado con LPS secreta mayores niveles de Gal-8, lo cual a su vez expande su acción a todo el organismo. Con respecto a las CD, observamos que éstas también expresan mayor cantidad de Gal-8 luego de su activación en presencia de LPS (**Figura 23**). El hecho de que existan niveles incrementados de Gal-8 en estos ambientes inflamatorios, apoya aún más la participación de Gal-8 endógena. Más aún, las CD provenientes de ratones KO Gal-8^{-/-} expresan menores niveles de CD86 luego de la activación, y además, son menos eficientes a la hora de estimular la proliferación de linfocitos T, que con su contraparte *wild-type* (**Figura 24 y 25**).

En conjunto, el aumento en la expresión de Gal-8, puede constituir un mecanismo endógeno para amplificar el inicio de la respuesta inmune en el sitio de inflamación.

Perspectivas futuras

- Realizaremos ensayos de co-estimulación para dilucidar la principal CPA efectora; y si actúan las CD solas o en conjunto con los linfocitos B. Para ello purificaremos las distintas CPA por separado para intentar recapitular el efecto co-estimulador. Además, complementaremos con ensayos depletando los esplenocitos de células CD11c⁺ y de linfocitos B.
- Analizaremos si las CPA endocitan al antígeno en conjunto con Gal-8, y si luego siguen la misma vía endocítica. Realizaremos ensayos de colocalización por microscopía confocal con Gal-8 y OVA marcadas con fluorocromos. También marcaremos en simultáneo los distintos compartimientos celulares (endosomas tempranos, tardíos, lisosomas) con anticuerpos específicos. De manera complementaria, repetiremos los ensayos de co-estimulación como se realizó en la **Figura 6**, pero con las CPA pre-tratadas en presencia de Gal-8 más el antígeno.
- Realizaremos ensayos de inmunización utilizando Gal-8 en la preparación vacunal en un modelo de Virus Sincicial Respiratorio Bovino. Incluiremos además un grupo inmunizado con antígeno y Gal-8mut.

REFERENCIAS

- Ahmed H, Banerjee PP, Vasta GR (2007) Differential expression of galectins in normal, benign and malignant prostate epithelial cells: Silencing of galectin-3 expression in prostate cancer by its promoter methylation. *Biochem Biophys Res Commun* 358:241–246.
- Amano M, Galvan M, He J, Baum LG (2003) The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1-induced CD45 clustering, phosphatase modulation, and T cell death. *J Biol Chem* 278:7469–7475.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, et al (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767–811.
- Bättig P, Saudan P, Gunde T, Bachmann MF (2004) Enhanced apoptotic activity of a structurally optimized form of galectin-1. *Mol Immunol* 41:9–18.
- Baum LG, Blackall DP, Arias-Magallano S, et al (2003) Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin Immunol* 109:295–307. doi: 10.1016/j.clim.2003.08.003
- Baum LG, Pang M, Perillo NL, et al (1995) Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J Exp Med* 181:877–87.
- Baumeister T, Röbner S, Pech G, et al (2003) Interleukin-3R α ⁺ myeloid dendritic cells and mast cells develop simultaneously from different bone marrow precursors in cultures with interleukin-3. *J Invest Dermatol* 121:280–288.
- Bianco GA, Toscano MA, Ilarregui JM, Rabinovich GA (2006) Impact of protein-glycan interactions in the regulation of autoimmunity and chronic inflammation. *Autoimmun Rev* 5:349–356.
- Bidon N, Brichory F, Bourguet P, et al (2001a) Galectin-8 : A complex sub-family of galectins (Review). *Int J Mol Med* 8:245–250.
- Bidon N, Brichory F, Hanash S, et al (2001b) Two messenger RNAs and five isoforms for Po66-CBP, a galectin-8 homolog in a human lung carcinoma cell line. *Gene* 274:253–262.
- Bidon-Wagner N, Le Pennec JP (2004) Human galectin-8 isoforms and cancer. *Glycoconj J* 19:557–563.

- Blaser C, Kaufmann M, Müller C, et al (1998) B-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol* 28:2311–2319.
- Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, et al (2010) Platelets amplify inflammation in arthritis via Collagen-dependent microparticle production. *Science* (80-) 327:580–583. doi: 10.1126/science.1181928.Platelets
- Cattaneo V, Tribulatti MV, Carabelli J, et al (2014) Galectin-8 elicits pro-inflammatory activities in the endothelium. *Glycobiology* 24:966–973.
- Cattaneo V, Tribulatti M V, Campetella O (2011) Galectin-8 tandem-repeat structure is essential for T-cell proliferation but not for co-stimulation. *Biochem J* 434:153–60.
- Caux BC, Durand I, Moreau I, et al (1993) Tumors Necrosis Factor α cooperates with Interleukin-3 in the recruitment of a primitive subset of human cd34+ progenitors. *177:1815–1820.*
- Cho M, Cummings RD (1995a) Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. *J. Biol. Chem.* 270:5198–5206.
- Cho M, Cummings RD (1995b) Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. II. Localization and biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 270:5207–5212.
- Dai S-Y, Nakagawa R, Itoh A, et al (2005) Galectin-9 Induces Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Immunol* 175:2974–2981.
- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE (2009) Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interf Cytokine Res* 29:313–326.
- Dus Santos MJ, Wigdorovitz A, Maradei E, et al (2000) A comparison of methods for measuring the antibody response in mice and cattle following vaccination against foot and mouth disease. *Vet Res Commun* 24:261–73.
- Dustin ML, Chan AC (2000) Signaling Takes Shape in the Immune System. *Cell* 103:283–294. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00120-3
- Earl LA, Bi S, Baum LG (2010) N- and O-Glycans modulate galectin-1 binding, CD45 signaling, and T cell death. *J Biol Chem* 285:2232–2244.

- Ebner S, Hofer S, Nguyen VA, et al (2002) A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern. *J Immunol* 168:6199–6207.
- Elola MT, Ferragut F, Cardenas Delgado VM, et al (2014) Expression, localization and function of galectin-8, a tandem-repeat lectin, in human tumors. *Histol Histopathol* 29:1093–1105.
- Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, et al (2007) Galectins: Matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci* 64:1679–1700.
- Endharti AT, Zhou YW, Nakashima I, Suzuki H (2005) Galectin-1 supports survival of naive T cells without promoting cell proliferation. *Eur J Immunol* 35:86–97.
- Eshkar Sebban L, Ronen D, Levartovsky D, et al (2007) The involvement of CD44 and its novel ligand galectin-8 in apoptotic regulation of autoimmune inflammation. *J Immunol* 179:1225–35.
- Fernandez F, Borca M V, Sadir AM, et al (1986) Adult mice are susceptible to experimental infection with foot-and- mouth disease virus (FMDV). *Vet Microbiol* 12:15–24.
- Fulcher J a, Hashimi ST, Levroney EL, et al (2006) Galectin-1-Matured Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Have Enhanced Migration through Extracellular Matrix. *J Immunol* 177:216–226.
- Fulcher JA, Chang MH, Wang S, et al (2009) Galectin-1 co-clusters CD43/CD45 on dendritic cells and induces cell activation and migration through syk and protein kinase C signaling. *J Biol Chem* 284:26860–26870.
- Galvan M, Tsuboi S, Fukuda M, Baum LG (2000) Expression of a specific glycosyltransferase enzyme regulates T cell death mediated by galectin-1. *J Biol Chem* 275:16730–16737.
- Garín MI, Chu C, Golshayan D, et al (2007) Galectin-1 : a key effector of regulation mediated by CD4 + CD25 + T cells Short title : Key role of galectin-1 in regulatory T

- cells. *Blood* 109:2058–2066.
- Gnazzo V, E. P, Quattrocchi V, et al (2013) Evaluation of vaccines against foot and mouth disease in the mouse model, correlation with efficacy in cattle. *Int. Congr. Immunol.* Milan, Italy.
- Habiela M, Seago J, Perez-Martin E, et al (2014) Laboratory animal models to study foot-and-mouth disease: a review with emphasis on natural and vaccine-induced immunity. *J Gen Virol* 95:2329–45.
- Haslam SM, Julien S, Burchell JM, et al (2008) Characterizing the glycome of the mammalian immune system. *Immunol Cell Biol* 86:564–573.
- Hernandez JD, Nguyen JT, He J, et al (2006) Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death. *J Immunol* 177:5328–5336.
- Hirabayashi J, Kasai KI (1994) Further evidence by site-directed mutagenesis that conserved hydrophilic residues form a carbohydrate-binding site of human galectin-1. *Glycoconj J* 11:437–442.
- Hirano T, Yasukawa K, Harada H, et al (1986) Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324:73–76.
- Hsu Y-L, Wang M-Y, Ho L-J, et al (2015) Up-regulation of galectin-9 induces cell migration in human dendritic cells infected with dengue virus. *J Cell Mol Med* 19:1065–76.
- Hunter C a, Jones S a (2015) IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 16:448–457.
- Illarregui JM, Bianco G a, Toscano M a, Rabinovich G a (2005) The coming of age of galectins as immunomodulatory agents: impact of these carbohydrate binding proteins in T cell physiology and chronic inflammatory disorders. *Ann Rheum Dis* 64:iv96–v103.
- Illarregui JM, Croci DO, Bianco G a, et al (2009) Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol* 10:981–991.

- Inagaki Y, Sohma Y, Horie H, et al (2000) Oxidized galectin-1 promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties. *Eur J Biochem* 267:2955–2964.
- Joshi BH, Hogaboam C, Dover P, et al (2006) Role of Interleukin-13 in Cancer, Pulmonary Fibrosis, and Other TH2-Type Diseases. *Vitam Horm* 74:479–504.
- Kelly KA, Lucas K, Hochrein H, et al (2001) Development of dendritic cells in culture from human and murine thymic precursor cells. *Cell Mol Biol* 47:43–54.
- Labeur MS, Roters B, Pers B, et al (1999) Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol* 162:168–175.
- Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, et al (2004) Introduction to galectins. *Glycoconj J* 19:433–440.
- Leskela S, Serrano A, De La Fuente H, et al (2015) Graves' disease is associated with a defective expression of the immune regulatory molecule galectin-9 in antigen-presenting dendritic cells. *PLoS One* 10:1–16.
- Levy Y, Arbel-Goren R, Hadari YR, et al (2001) Galectin-8 Functions as a Matricellular Modulator of Cell Adhesion. *J Biol Chem* 276:31285–31295.
- Liu FT, Patterson RJ, Wang JL (2002) Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1572:263–273.
- Liu FT, Rabinovich GA (2010) Galectins: Regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1183:158–182.
- Marth JD, Grewal PK (2008) Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol* 8:874–87.
- Matarrese P, Tinari A, Mormone E, et al (2005) Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission. *J Biol Chem* 280:6969–6985.
- Metcalf D (2008) ASH 50th anniversary review Hematopoietic cytokines. *Blood* 111:485–491.
- Miura T, Takahashi M, Horie H, et al (2004) Galectin-1 β , a natural monomeric form of

- galectin-1 lacking its six amino-terminal residues promotes axonal regeneration but not cell death. *Cell Death Differ* 11:1076–1083.
- Mobergslie A, Sioud M (2011) Galectin-1 and -3 gene silencing in immature and mature dendritic cells enhances T cell activation and interferon-gamma production. *J Leukoc Biol* 91:461–467.
- Nguyen JT, Evans DP, Galvan M, et al (2001) CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. *J Immunol* 167:5697–5707. doi: 10.4049/jimmunol.167.10.5697
- Nishi N, Shoji H, Seki M, et al (2003) Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin α M. *Glycobiology* 13:755–763.
- Ohtsubo K, Marth JD (2006) Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* 126:855–867.
- Ostrowski M, Vermeulen M, Zabal O, et al (2007) The Early Protective Thymus-Independent Antibody Response to Foot-and-Mouth Disease Virus Is Mediated by Splenic CD9⁺ B Lymphocytes. *J Virol* 81:9357–9367.
- Pace KE, Hahn HP, Pang M, et al (2000) Cutting Edge: CD7 Delivers a Pro- Apoptotic Signal During Galectin-1- Induced T Cell Death 1. *J Immunol* 2331–2334.
- Pace KE, Lee C, Stewart PL, Baum LG (1999) Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J Immunol* 163:3801–3811.
- Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG (1995) Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378:736–739.
- Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT, Baum LG (1997) Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J Exp Med* 185:1851–1858.
- Perone MJ, Larregina AT, Shufesky WJ, et al (2006) Transgenic galectin-1 induces maturation of dendritic cells that elicit contrasting responses in naive and activated T cells. *J Immunol* 176:7207–7220.
- Quattrocchi V, Langellotti C, Pappalardo JS, et al (2011) Role of macrophages in early

- protective immune responses induced by two vaccines against foot and mouth disease. *Antiviral Res* 92:262–270.
- Quattrocchi V, Molinari P, Langellotti C, et al (2013) Co-inoculation of baculovirus and FMDV vaccine in mice, elicits very early protection against foot and mouth disease virus without interfering with long lasting immunity. *Vaccine* 31:2713–2718.
- Rabinovich A, Modesti NM, Castagna LF, et al (1997) Specific Apoptosis Inhibition by of Lymphocyte a Proliferation and Induction of Key words: In multicellular organisms , homeostasis is maintained through a balance between cell proliferation and cell death. Cell proliferation is a highly regu. *J Biochem* 122:365–373.
- Rabinovich G a, Ramhorst RE, Rubinstein N, et al (2002) Induction of allogenic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms. *Cell Death Differ* 9:661–70.
- Rabinovich GA, Ariel A, Hershkovich R, et al (1999) Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology* 97:100–106.
- Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, et al (1998) Activated Rat Macrophages Produce a Galectin-1-Like Protein That Induces Apoptosis of T Cells: Biochemical and Functional Characterization. *J Immunol* 160:4831–4840.
- Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS, Vasta GR (2007) Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol* 17:513–520.
- Reed LJ, Muench HA (1938) A simple method of estimating fifty-percent endpoints. *Am J Hyg* 27:493–497.
- Rochman I, Paul WE, Ben-Sasson SZ (2005) IL-6 increases primed cell expansion and survival. *J Immunol* 174:4761–4767.
- Romaniuk MA, Tribulatti MV, Cattaneo V, et al (2010) Human platelets express and are activated by galectin-8. *Biochem J* 432:535–47.
- Rubinstein N, Ilarregui JM, Toscano MA, Rabinovich GA (2004) The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue Antigens* 64:1–12.

- Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, et al (2001) Glycosylation and the immune system. *Science* (80-) 291:2370–2376.
- Santucci L, Fiorucci S, Cammilleri F, et al (2000) Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 31:399–406.
- Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, et al (2003) Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 124:1381–1394.
- Sarafí MN, Garcia-Zepeda EA, MacLean JA, et al (1997) Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. *J Exp Med* 185:99–109.
- Satelli A, Rao PS, Gupta PK, et al (2008) Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines. *Oncol Rep* 19:587–594.
- Schroeder M, Tribulatti MV, Carabelli J, et al (2016) Characterization of a double - CRD - mutated Gal - 8 recombinant protein that retains costimulatory activity on antigen - specific T cell response. *Biochem J* Epub ahead of print.
- Stowell SR, Arthur CM, Dias-baruffi M, et al (2010) Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. *Nat Med* 16:295–301.
- Stowell SR, Cho M, Feasley CL, et al (2009a) Ligand reduces galectin-1 sensitivity to oxidative inactivation by enhancing dimer formation. *J Biol Chem* 284:4989–4999.
- Stowell SR, Karmakar S, Arthur CM, et al (2009b) Galectin-1 induces reversible phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 20:1408–1418.
- Thiemann S, Man JH, Chang MH, et al (2015) Galectin-1 regulates tissue exit of specific dendritic cell populations. *J Biol Chem* 290:22662–22667.
- Thijssen VL, Hulsmans S, Griffioen AW (2008) The Galectin Profile of the Endothelium. *Am J Pathol* 172:545–553.
- Thomson AW (1998) Chapter: 5. Interleukin-3. In: *The Cytokine Handbook*. BMC
- Thurston TLM, Wandel MP, von Muhlinen N, et al (2012) Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* 482:414–418.
- Toscano M a, Bianco G a, Ilarregui JM, et al (2007a) Differential glycosylation of TH1,

- TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 8:825–834.
- Toscano MA, Ilarregui JM, Bianco GA, et al (2007b) Dissecting the pathophysiologic role of endogenous lectins: Glycan-binding proteins with cytokine-like activity? *Cytokine Growth Factor Rev* 18:57–71.
- Tribulatti MV, Cattaneo V, Hellman U, et al (2009) Galectin-8 provides costimulatory and proliferative signals to T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 86:371–380.
- Tribulatti MV, Mucci J, Cattaneo V, et al (2007) Galectin-8 Induces apoptosis in the CD4^{high}CD8^{high} thymocyte subpopulation. *Glycobiology* 17:1404–1412.
- Tsai C-M, Guan C-H, Hsieh H-W, et al (2011) Galectin-1 and galectin-8 have redundant roles in promoting plasma cell formation. *J Immunol* 187:1643–52.
- Ueno H, Klechevsky E, Morita R, et al (2007) Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 219:118–142.
- van der Leij J, van den Berg A, Blokzijl T, et al (2004) Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: An important tool in the regulation of the immune response. *J Pathol* 204:511–518.
- Varki A, Cummings RD, Esko J, et al (1999) *Essentials of Glycobiology*.
- Walzel H, Schulz U, Neels P, Brock J (1999) Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45. *Immunol Lett* 67:193–202.
- Yamamoto H, Nishi N, Shoji H, et al (2008) Induction of cell adhesion by galectin-8 and its target molecules in Jurkat T-cells. *J Biochem* 143:311–324.
- Zamorano P, Quattrocchi V, Olivera C, et al (2010) Vaccination against foot-and-mouth disease, association between humoral immune response in cattle and mice.
- Zick Y, Eisenstein M, Goren RA, et al (2004) Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth. *Glycoconj J* 19:517–526.
- Zuñiga E, Rabinovich G a, Iglesias MM, Gruppi a (2001) Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. *J Leukoc Biol* 70:73–79.